



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Hanseniaspora vineae: caracterización
y su uso en la vinificación

TESIS DOCTORAL

Valentina Martín Russo

Programa de Posgrado de Doctorado en Biología
Facultad de Ciencias, Facultat de Enologia
Universidad de la República - Universitat Rovira i Virgili

Montevideo – Uruguay
Noviembre de 2016



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Hanseniaspora vineae: caracterización y su uso en la vinificación

TESIS DOCTORAL

Valentina Martín Russo

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Posgrado de Doctorado en Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Doctorado en Biología.

Directores:

D.Sc. Prof. Francisco Carrau

D.Sc. Prof. Albert Mas

Montevideo – Uruguay

Noviembre de 2016

Martín Russo, Valentina

Hanseniaspora vineae: caracterización y su uso en la vinificación / Valentina Martín Russo. - Montevideo: Universidad de la República, Universitat Rovira i Virgili, Facultat de Ciències, Facultat de Enologia, 2016.

XXXII, 214 p.: il.; 29, 7cm.

Directores:

Francisco Carrau

Albert Mas

Tesis de Doctorado – Universidad de la República, Programa de Doctorado en Biología, 2016.

Referencias bibliográficas: p. 151 – 180.

1. *Hanseniaspora vineae*, 2. no-*Saccharomyces*,
3. levaduras nativas, 4. caracterización, 5. fermentación.
I. Carrau, Francisco, Mas, Albert, . II. Universidad de la República, Programa de Posgrado de Doctorado en Biología. III. Título.

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

D.Sc. Prof. Patrick Moyna

D.Sc. Prof. Silvana Vero

D.Sc. Prof. Inés Ponce de León

Montevideo – Uruguay
Noviembre de 2016

A mis padres Edison y Rossana
por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

Durante la elaboración de éste trabajo conté con la colaboración y el apoyo de muchas personas. En primer lugar le agradezco a Emiliano su apoyo y compañía incondicional. A mis padres y mis hermanos por su soporte y contención durante el proceso de elaboración de este Tesis.

A mis tutores, los Doctores Francisco Carrau y Albert Mas quienes me guiaron durante el desarrollo de esta Tesis. A mis compañeros del laboratorio de Enología, Karina, Laura, los Eduardos Boido y Dellacasa, Gabriel, Bonini, Noe, Flor, Anita, Gio y Manuel, fundamentales a lo largo de todo el proceso. A los integrantes y responsables del grupo de investigación de Biotecnología Enológica de la Facultat de Enología de la Universitat Rovira i Virgili, especialmente a Jessica, Flor y Olga.

A Gastón Ares de área Sensometría y Ciencia del consumidor y a los distintos integrantes del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Facultad de Química por su colaboración en las distintas etapas de elaboración de mi trabajo.

A Carina Gaggero del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

A Pablo Aguilar, Valentina Salzman y Facundo Giorelo del Instituto Pasteur de Montevideo.

Y finalmente a las distintas instituciones que mediante su financiamiento colaboraron en la realización de este Tesis, PEDECIBA, ANII, CSIC y CAP.

*“No es la especie más fuerte, ni
la mas inteligente la que
sobrevive, sino la que mejor se
adapte al cambio”*

Charles Darwin

RESUMEN

Durante la elaboración de un vino ocurren complejas interacciones microbianas entre levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, y entre levaduras y bacterias. En los viñedos las levaduras y bacterias se ubican mayoritariamente sobre los granos de uva, e ingresan a la bodega en época de cosecha como flora nativa. Esta flora está compuesta principalmente por levaduras no-*Saccharomyces* y en un muy bajo porcentaje (menor al 1%) de levaduras *Saccharomyces*, levadura típica de la fermentación alcohólica y la vinificación. Entre las no-*Saccharomyces* las que se encuentran más comúnmente son levaduras de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia*.

La fermentación alcohólica es un proceso durante el cual, por acción de las levaduras, los azúcares presentes en el mosto se transforman principalmente en etanol y dióxido de carbono. Sin embargo, al mismo tiempo se forma otro conjunto de compuestos producto del metabolismo secundario de las levaduras, compuestos aromáticos y otros asociados al color y a la sensación del vino en boca, como por ejemplo, el glicerol. Por ello es importante comprender el comportamiento de distintas levaduras durante la fermentación y su influencia sobre estos productos secundarios que en definitiva serán el diferencial a la hora de elaborar un vino de calidad.

Conocer dicho comportamiento puede ser también útil para intentar resolver determinados problemas que puedan suscitarse, tal como pasa actualmente con la alta concentración de azúcares en las uvas en determinadas regiones, que genera la obtención de vinos de elevada graduación alcohólica, algo no deseado en vinos de alta gama.

En este trabajo de tesis se realiza la caracterización de once cepas distintas de levaduras de la especie *H. vineae* en cuanto a sus aptitudes enológicas. A partir de ésta caracterización, dos de ellas fueron seleccionadas, una, por su capacidad para la producción de fenilpropanoides de interés aromático en altas concentraciones (M12_196F), fue utilizada en ensayos que tenían como fin comprender con mayor profundidad los mecanismos y vías de producción de esos compuestos y los factores que la afectan. La otra para realizar fermentaciones en mostos naturales a escala semi-industrial (T02_05F).

Respecto de estos estudios, los resultados fueron los siguientes:

- Se determinó el efecto negativo del agregado de fosfato diamónico (DAP) sobre la producción, por parte de la cepa M12_196F *H. vineae*, de los alcoholes bencílico (BAL) y β -feniletílico (asociados a descriptores floral y dulce el primero y floral, rosa y miel el segundo) y sus ésteres.
- A su vez estos compuestos fueron producidos en 1-2 órdenes de magnitud superior por *H. vineae* frente a la *S. cerevisiae* utilizada como control bajo las mismas condiciones de fermentación.
- Cambios en la composición de medio en cuanto a su contenido de Phe, Trp y ρ -ABA, que mostraron un incremento en la producción de BAL, mientras que la Tyr y el amonio disminuyeron los niveles producidos de éste alcohol.
- Cambios en los diferentes componentes nitrogenados asimilables por las levaduras pueden aumentar o disminuir hasta unas 17 veces los niveles de BAL producidos por *H. vineae*. Al duplicar los niveles de Phe en el medio, aumenta significativamente la formación de BAL en *H. vineae*, comportamiento opuesto al que se pudo ver en *S. cerevisiae*.
- El comportamiento observado en la producción de BAL sugiere la posibilidad de que *H. vineae* utilice dos vías distintas para su producción.
- Se obtuvo un vino a escala semi-industrial de la variedad de uva blanca Macabeo, a partir de la cepa de *H. vineae* T02_05F en la región de Tarragona.
- Se demostró que si bien esta levadura no finaliza por sí misma la fermentación, logra predominar en ella prácticamente hasta la mitad del proceso, tiempo suficiente para lograr un producto diferente al obtenido a partir de *S. cerevisiae*.
- En el análisis de compuestos aromáticos, se vio una mayor producción de aquellos asociados a descriptores florales y frutados en el vino producido con *H. vineae*.
- En la prueba sensorial llevada a cabo por un panel entrenado logró diferenciarse notoriamente el vino inoculado con *H. vineae* de aquel fermentado con *S. cerevisiae* (control), siendo el primero preferido por el panel, destacándose por sus notas florales, lo cual coincide con lo obtenido en el análisis de compuestos aromáticos.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis permitieron ampliar el conocimiento acerca del comportamiento de la especie *H. vineae*. Si bien se observó diversidad entre las distintas cepas estudiadas, también se determinaron características compartidas entre todas las cepas analizadas, lo que permite considerarlas como características típicas de la especie, como son la actividad enzimática positiva (proteasa y β -glucosidasa a pH6) y la alta producción por parte de ésta especie de compuestos aromáticos deseables durante la fermentación, produciéndolos hasta en 50 órdenes más que la levadura de fermentación convencional *S. cerevisiae*. Su utilización a escala semi-industrial permitió demostrar que es viable su empleo para vinificación de vinos comerciales logrando éstos diferenciarse de vinos fermentados mediante levaduras tradicionales.

Palabras claves:

Hanseniaspora vineae, no-*Saccharomyces*, levaduras nativas, caracterización, fermentación.

Lista de figuras

2.1	Esquema general de los principales compuestos aromáticos producidos a partir del metabolismo de las levaduras durante la fermentación. Adaptado de Carrau (2003).	18
2.2	Principales levaduras y la ocurrencia de las mismas sobre el grano de uva. (Adaptado de Carrau (2003))	28
2.3	Esquema representativo del aporte de distintas levaduras al perfil organoléptico de los vinos (Adaptado de Pretorius (2000))	30
2.4	Se observa la morfología adoptada por diferentes especies de levaduras en WLN. <i>Hanseniaspora vineae</i> (superior, izquierda), <i>Metschnikowia pulcherrima</i> (superior derecha) y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (parte inferior)	33
2.5	Esquema general de la vía glicolítica, equilibrios del balance de ATP y de la situación redox, balance NADH/NAD y su relación con vías metabólicas de compuestos secundarios (Extraído de Carrau (2003))	40
2.6	Representación esquemática de los compuestos involucrados en la percepción sensorial de los vinos, formados o sintetizados por las levaduras durante la fermentación. Adaptado de Swiegers et al. (2005).	48
2.7	Esquema representativo de la conformación de la pared celular	56
3.1	Placa con medio EGA donde se evidencia actividad enzimática β -glucosidasa extracelular positiva	66
3.2	Erlenmeyers para fermentación semi-anaerobia con tapones de algodón y aluminio	68

3.3	Esquema del procedimiento de retención y elución de los distintos compuestos aromáticos del vino para el caso de cartuchos ISOLUTE® ENV+ 1 – Pretratamiento de la muestra. En el caso del vino no es necesario, se utiliza la muestra diluída al medio. 2/3 – La fase ENV+ puede ser usada para el vino sin realizar la etapa de solvatación y equilibrio, sin embargo es recomendable realizar un lavado de la fase con solventes miscibles en agua como el metanol, con lo cual se logra la eliminación de interferencias, debiendo realizar un posterior lavado con agua. 4 – Pasaje de la muestra, 4-5 mL/min. 5 – Elución de interferencias con agua. 6 – Elución de los compuestos volátiles libres con diclorometano, recuperándose para su análisis. 7 – Elución de los compuestos glicosidados con metanol, recuperándose para su análisis.	72
3.4	Estructura de la fase utilizada en los cartuchos ISOLUTE® ENV+ (Adaptado por Boido (2002))	73
3.5	Esquema de los mecanismos de retención y elución en el cartucho ISOLUTE® ENV+ (Adaptado por Boido (2002))	73
4.1	Perfiles de TtTRNA obtenidos para las diferentes levaduras de la especie <i>H. vineae</i> . Los resultados de las PCRs fueron obtenidos a partir de ADN de las mismas muestras y presentados en el mismo orden en A (combinación de primers, TtRNASc - ISSR - MB) y en B (combinación de primers, TtRNASc - 5CAG)	85
4.2	Análisis filogenético mostrando la diferenciación de las levaduras en 11 cepas distintas. Las columnas de la derecha indican la variedad de uva de donde se aislaron y el año de cosecha	86
4.3	Placa de Skim Milk con las levaduras T02_25F y T02_19F con actividad proteolítica extracelular positiva (formación de halo) y la levadura comercial <i>S. cerevisiae</i> M522 como control negativo (no hay formación de halo)	87
4.4	Placas con medio EGA y las 11 cepas de <i>H. vineae</i> a caracterizar (por duplicado), en ninguna formó precipitado por lo que no poseen actividad β - glucosidasa a pH 4.5	88

4.5	Cinética de fermentación de todas las levaduras en medio símil mosto, a 20°C, con una agitación diaria. La levadura M522 (<i>S. cerevisiae</i>) fue utilizada como control.	89
4.6	Valores finales de CO ₂ liberado al final de la fermentación por cada cepa de levadura. Las muestras con las mismas letras no presentan diferencias a un nivel de confianza del 95 %	90
4.7	Recuento de células vivas sobre el final de la fermentación. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	91
4.8	Concentración de glicerol en g/L producida por cada levadura. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	93
4.9	Densidad óptica (DO) registrada para cada levadura para las cuatro concentraciones de SO ₂ a 640nm. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	94
4.10	Polisacáridos cuantificados en el medio símil mosto a mitad de fermentación (gris oscuro) y al final de la misma (gris claro). Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	97
4.11	Producción aromática de cada levadura a partir de las microfermentaciones realizadas en el laboratorio, analizadas por grupos aromáticos. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	98
4.12	Composición de los grupos derivados de los descriptores aromáticos seleccionados durante la evaluación sensorial. Cada grupo fue seleccionado a partir del primer cambio grande de nivel	110
4.13	Análisis de citometría de flujo por fluorescencia. Fila superior de izquierda a derecha; cepas de <i>S. cerevisiae</i> control, derivadas de la cepa S288c: BY4742 (haploide, 12,1571 mb) y BY4743 (diploide, 24,31 Mb). Fila inferior de izquierda a derecha; Cepas de <i>H. vineae</i> : T02_05F y T02_19F.	112
4.14	Producción de acetato β-feniletílico por cepas de <i>H. vineae</i> y la <i>S. cerevisiae</i> (M522). Las muestras con las mismas letras no presentan diferencias a un nivel de confianza del 95 %	117

- 4.15 Producción de alcohol bencílico, alcohol β -feniletílico y sus acetatos por la cepa de *H. vineae* M12_196F y la *S. cerevisiae* M522 **118**
- 4.16 Producción de alcohol bencílico, alcohol β -feniletílico y sus acetatos a diferentes concentraciones de YAN ajustadas con fosfato diamónico por la cepa de *H. vineae* M12_196F. Las muestras con las mismas letras no presentan diferencias a un nivel de confianza del 95 % **119**
- 4.17 Formación de alcohol bencílico, benzaldehído, ρ -hidróxi alcohol bencílico, ρ -hidroxibenzaldehído por las cepa de *H. vineae* M12_196F en medio símil mosto con niveles de YAN diferentes (50, 75 y 250 mgN/L) obtenidos por el agregado de DAP. Las letras indican el nivel de significancia ($p \leq 0.001$) según test LSD ANOVA calculado para cada tratamiento. **121**
- 4.18 Formación de alcohol bencílico por *H. vineae* M12_196F (izquierda) y *S. cerevisiae* EC1118 (derecha) con un YAN constante de 100 mgN/L pero omitiendo (0), con concentración normal (1) o el doble (2) de los 3 aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptofano (Trp), fosfato diamónico (DAP) fue utilizado quitándolo o agregándolo según el caso para mantener el nivel constante de YAN. Para el caso del ácido ρ -aminobenzoico (ρ -ABA) solo se analizó quitándolo (0) o a concentración normal (1). Las letras indican el nivel de significancia ($p \leq 0.01$) según test LSD ANOVA calculado para cada tratamiento. . . . **123**
- 4.19 Formación de los compuestos ρ -hidroxi alcohol bencílico, benzaldehído, y ρ -hidroxi benzaldehído por *H. vineae* M12_196F (izquierda) y *S. cerevisiae* EC1118 (derecha) con un YAN constante de 100 mgN/L pero omitiendo (0) y con concentración normal (1) de los 3 aminoácidos fenilalanina (PHE), tirosina (TYR) y triptofano (TRP) y el ácido ρ -aminobenzoico (ρ -ABA). Fosfato diamónico (DAP) fue utilizado quitándolo o agregándolo según el caso para mantener el nivel constante de YAN. Las letras indican el nivel de significancia ($p \leq 0.01$) según test LSD ANOVA calculado para cada tratamiento. NQ indica que no pudo ser cuantificado. **124**

4.20	Vías propuestas para la formación de alcohol bencílico (BAL), benzaldehído (BD), ρ -hidroxi alcohol bencílico (ρ)-HBAL y ρ -hidroxi benzaldehído para <i>H. vineae</i> a través de la vía del co- rismato, con fenilpiruvato y ρ -hidroxi fenilpiruvato como inter- mediarios. La presencia de genes que codifican enzimas catali- zadoras de diferentes pasos de las vías fue confirmada mediante análisis genéticos de <i>H. vineae</i> en comparación con <i>S. cerevisiae</i> y con plantas (resaltados en amarillo).	128
4.21	Medidas de densidad de la cinética de fermentación de Macabeo (A) y de Merlot (B) en tanques inoculados con <i>H. vineae</i> (Gris) y <i>S. cerevisiae</i> (Negro)	132
4.22	Seguimiento de la población de levaduras en las fermentaciones de Macabeo (A) y Merlot (B) en tanques inoculados con <i>H.</i> <i>vineae</i> (Gris) y tanques inoculados con <i>S. cerevisiae</i> (Negro). En placas de agar lisina (punteada) y de YPD (sólida)	133
4.23	Seguimiento de la población de levaduras mediante QPCR, con primers generales para levaduras (punteado), específicos para <i>Hanseniaspora spp</i> (Gris) y específicos para <i>Saccharomyces</i> (Ne- gro), en las fermentaciones de Macabeo (A y B) y Merlot (C y D), en tanques inoculados con <i>H. vineae</i> (A y C) y tanques inoculados con <i>S. cerevisiae</i> (B y D)	135
4.24	Resultados de los test descriptivo (gráfico) y del triangular (ta- bla) de los vinos de Macabeo fermentados con <i>H. vineae</i> y <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	142

Lista de tablas

2.1	Principales terpenos encontrados en el vino, con su umbral de percepción en distintos medios (mg/L) y sus descriptores aromáticos asociados	13
2.2	Umbral de percepción (mg/L) y descriptores asociados de los alcoholes superiores encontrados en vinos. Adaptado de Carrau (2003) ; Swiegers et al. (2016)	20
2.3	Umbral de percepción (mg/L) y descriptores asociados de los ácidos grasos encontrados en vinos. Adaptado de Lambrechts and Pretorius (2000) ; Carrau (2003)	21
2.4	Umbral de percepción (mg/L) y descriptores asociados de los ésteres encontrados en vinos Carrau (2003)	22
2.5	Compuestos carbonílicos, azufrados, lactonas y fenoles volátiles junto a su umbral de percepción (mg/L) y los descriptores con los que se los asocia. (Adaptado de Carrau (2003))	25
2.6	Levaduras no- <i>Saccharomyces</i> reportadas en uvas y mostos en fermentación. * y ** indican la carencia de forma teleomórfica o anamórfica respectivamente. (Tomada de Medina (2014) , adaptada de Kurtzman et al. (2011a) ; Jolly et al. (2013))	31
3.1	Cepas de <i>H. vineae</i> a estudiar	63
3.2	Letra asignada a cada variedad de uva para la codificación de las levaduras	64
3.3	Boleta con los 67 descriptores aromáticos presentada al panel semi entrenado de jueces	75
3.4	Referencia de preparación de las 11 condiciones distintas del medio símil mosto	78
3.5	Boleta test triangular	81
3.6	Boleta de test descriptivo	82

4.1	Resultados obtenidos en los análisis de enzimas extracelulares en medios específicos para las 11 cepas de levaduras	86
4.2	Efecto del la concentración de SO ₂ sobre las levaduras, donde ++++ implica que no hay diferencia respecto el control y a medida que aumenta la diferencia disminuye el numero de cruces.	95
4.3	Valores promedio de los alcoholes identificados en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	102
4.4	Valores promedio de los acetatos etílicos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	104
4.5	Valores promedio de los ésteres etílicos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	105
4.6	Valores promedio de los ácidos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	106
4.7	Valores promedio de los isoácidos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	107
4.8	Valores promedio de los terpenos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	108
4.9	Valores promedio de los sesquiterpenos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)	109
4.10	Calculo del tamaño del genoma para las dos cepas analizadas de <i>H. vineae</i> (T02_05F y T02_19F)	111
4.11	Comparación de genes relacionados al metabolismo de bence- noides y fenílpropanoides en los genomas de <i>H. vineae</i> y <i>S. ce- revisiae</i> EC1118	125
4.12	Datos analíticos de los vinos realizados a partir de inóculos de <i>H. vineae</i> (T02_05F) y <i>S. cerevisiae</i> (QA23) sobre mostos de uvas Macabeo y Merlot. Con * se marcan las diferencias signifi- cativas analizadas mediante ANOVA entre fermentaciones sobre un mismo mosto inoculados con las distintas levaduras.	138

4.13 Concentración promedio de cada compuesto producido por ambas levaduras en Macabeo (\pm desvío estándar) en $\mu\text{g/L}$ 141

Tabla de contenidos

Lista de figuras	XIX
Lista de tablas	XXV
Lista de símbolos	XXVII
Lista de siglas	XXVII
1 Introducción	1
1.1 Introducción general, justificación y objetivos	1
1.1.1 Justificación del trabajo	4
2 Marco teórico	7
2.1 Composición química de la uva	7
2.2 Productos de la fermentación alcohólica	10
2.2.1 Compuestos aromáticos del vino	11
2.3 Las levaduras y su rol durante la fermentación	26
2.3.1 Generalidades de las levaduras	26
2.3.2 Identificación de levaduras	32
2.3.3 Metabolismo de los azúcares	37
2.3.4 Levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	41
2.3.5 Dinámica poblacional durante la fermentación	56
3 Metodología	63
3.1 Caracterización de levaduras	63
3.1.1 Aislamiento de microorganismos	63
3.1.2 Identificación molecular	64

3.1.3	Caracterización de actividad enzimática extracelular	65
3.1.4	Microvinificaciones	67
3.1.5	Producción de glicerol	69
3.1.6	Resistencia al SO ₂	69
3.1.7	Determinación de polisacáridos	69
3.1.8	Extracción e identificación de compuestos aromáticos . .	71
3.1.9	Evaluación sensorial	74
3.1.10	Determinación del tamaño del genoma y ploidía de <i>H.</i> <i>vineae</i>	76
3.2	Efecto de compuestos nitrogenados en la producción de bence- noides y fenilpropanoides	77
3.2.1	Fermentaciones a escala de laboratorio	77
3.2.2	Extracción y análisis de compuestos aromáticos	78
3.3	Vinificaciones a escala semi-industrial	79
3.3.1	Cepas de levaduras	79
3.3.2	Condiciones de fermentación	79
3.3.3	Seguimiento de las fermentaciones	80
3.3.4	Identificación de levaduras	80
3.3.5	Análisis químicos en WineScan	80
3.3.6	Análisis sensorial	80
3.3.7	Extracción y análisis de compuestos aromáticos	81
4	Resultados y discusión	83
4.1	Caracterización de las levaduras	83
4.1.1	Identificación molecular	84
4.1.2	Caracterización enzimática	85
4.1.3	Capacidad fermentativa	89
4.1.4	Producción de glicerol	92
4.1.5	Resistencia al SO ₂	93
4.1.6	Liberación de polisacáridos durante la fermentación alcohólica	95
4.1.7	Composición aromática de las fermentaciones	97
4.1.8	Evaluación sensorial	110
4.1.9	Determinación del tamaño del genoma y ploidía de <i>H.</i> <i>vineae</i>	111

4.1.10	Conclusiones	113
4.2	Efecto del nitrógeno sobre la composición de fenilpropanoides . .	116
4.2.1	Diferencias en la producción de fenilpropanoides entre <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. vineae</i>	116
4.2.2	Efecto del nitrógeno inorgánico sobre la síntesis de fenilpropanoides	119
4.2.3	Efecto de los aminoácidos sobre los compuestos bencenoides	121
4.2.4	Propuestas de vías metabólicas para la formación de fenilpropanoides	125
4.2.5	Conclusiones	130
4.3	Vinificaciones a nivel semi-industrial	131
4.3.1	Seguimiento de las fermentaciones	131
4.3.2	Determinaciones analíticas	138
4.3.3	Composición de compuestos volátiles	139
4.3.4	Análisis sensorial	142
4.3.5	Conclusiones	143
5	Consideraciones finales	145
	Referencias bibliográficas	151
	Glosario	180
	Apéndices	181
	Apéndice 1 Artículos publicados en el marco de éste trabajo de Tesis	183
	Anexos	213

Capítulo 1

Introducción

1.1. Introducción general, justificación y objetivos

El vino es un producto en el que durante su elaboración ocurren complejas interacciones microbianas. Estas ocurren tanto entre levaduras (*Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*) como con bacterias (lácticas y acéticas). En los viñedos, las levaduras y bacterias se encuentran principalmente sobre los granos de uva, e ingresan en la época de cosecha a la bodega como flora nativa, la cual esta conformada principalmente por levaduras no-*Saccharomyces* (mas de un 99%) y el resto son levaduras *Saccharomyces*, las típicas durante la fermentación alcohólica y la vinificación. Las fermentaciones pueden suceder de manera espontanea, partiendo de la microflora nativa Pretorius (2000). Estas fermentaciones no serian el resultado de la acción de una sola especie o cepa de levadura, sino de la acción de varias especies que son capaces de crecer durante el proceso de fermentación Esteve-Zarzoso et al. (1998); Pretorius (2000); Comitini et al. (2011a); Medina et al. (2012). Por lo tanto, la fermentación es llevada a cabo por una sucesión de diferentes poblaciones de levaduras, donde las etapas tempranas (hasta los días 2 o 3) se caracterizan por el crecimiento de ciertas levaduras no-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia* y *Pichia*) Pretorius (2000); Torija et al. (2001); Beltran et al. (2002); Gamero et al. (2016), mientras que hacia las etapas finales del proceso predominan cepas capaces de resistir las condiciones finales del medio, como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* que es capaz de tolerar concentraciones mayores de etanol, valores mas bajos de pH, mayor presión osmótica y bajos niveles de O₂

[Pérez-Nevado et al. \(2006\)](#).

Durante las primeras etapas de la fermentación, las levaduras con menor potencial fermentativo producen reacciones importantes en el mosto, entre otras cosas contribuyen en las reacciones enzimáticas, participan en la producción de glicerol, ésteres y alcoholes superiores a través de su metabolismo secundario, impactando así de manera positiva sobre las características sensoriales de los vinos [Fleet \(2003\)](#); [Romano \(2003\)](#); [Moreira et al. \(2005\)](#); [Jolly et al. \(2006\)](#); [Pérez-Nevado et al. \(2006\)](#); [Viana et al. \(2008\)](#); [Jolly et al. \(2013\)](#); [Carrau et al. \(2015\)](#); [Gamero et al. \(2016\)](#). La dinámica poblacional en la fermentación alcohólica está sujeta a la alta capacidad de *Saccharomyces* de modificar las condiciones ambientales incrementando la concentración de etanol y de ácidos orgánicos, disminuyendo el pH y consumiendo los nutrientes hasta agotarlos [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#); [Pérez-Nevado et al. \(2006\)](#)

El crecimiento significativo de no-*Saccharomyces* durante la fermentación era asociado a la producción de compuestos indeseables o a paradas de fermentación. Con el paso del tiempo distintos estudios han reportado la influencia beneficiosa de este tipo de levaduras y su potencial aplicación en la industria vitícola, mediante el desarrollo de cultivos mixtos junto con *Saccharomyces* [Pretorius \(2000\)](#); [Ciani et al. \(2010\)](#); [Zott et al. \(2011\)](#); [Sadoudi et al. \(2012\)](#); [Jolly et al. \(2013\)](#); [Medina et al. \(2013\)](#); [Carrau et al. \(2015\)](#). En las fermentaciones mixtas algunas características enológicas de no-*Saccharomyces* pueden no ser expresadas o bien, verse modificadas como consecuencia de la presencia de *Saccharomyces*, ya que en este tipo de fermentaciones las levaduras no coexisten de manera pasiva sino que interactúan entre sí.

El uso de estas fermentaciones mixtas controladas es recomendable para lograr las ventajas de la fermentación espontánea y a la vez, evitar los riesgos de parada de fermentación. Su implementación es importante ya que pueden obtenerse distintas características según las cepas que se utilicen. También pueden generarse diversas interacciones entre las levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*, dependiendo de las características que se quieran expresar en un determinado vino. Es decir que se pueden seleccionar distintas “parejas” de levaduras capaces de potenciar la tipicidad del vino que se desea obtener.

En la actualidad la mayoría de las bodegas utilizan iniciadores de fermentación comerciales, formulados casi en su totalidad a partir levaduras del tipo *Saccharomyces*, ya que aseguran un correcto desarrollo del proceso de fermentación.

Por eso, la gran diversidad presente dentro de las levaduras autóctonas, no se ve reflejada debido al control que ejercen las levaduras comerciales sobre el proceso de fermentación. Es así que, en la enología ocurre una situación paradójica: la biodiversidad de cepas de levaduras nativas presentes en las uvas y en la bodega es amplia, mientras que a nivel industrial existe una limitada disponibilidad de cepas comerciales para su aplicación industrial. Normalmente se utilizan las mismas levaduras para fermentar distintos vinos en distintas bodegas y regiones. Esto tiene como resultado una disminución de la tipicidad, lo que lleva a la estandarización de los vinos. Como consecuencia, varios estudios se han dedicado a investigar el aporte de distintas levaduras durante la vinificación así como la interacción entre levaduras en fermentaciones mixtas y el momento óptimo de inoculación de cada levadura durante la fermentación:

- en el trabajo realizado por [Esteve-Zarzoso et al. \(1998\)](#) hicieron una descripción de las enzimas involucradas en procesos que aportan características positivas para la calidad el vino que ocurren durante las primeras etapas de la fermentación, donde las levaduras involucradas son las no-*Saccharomyces* (actividades proteasa, β -glucosidasa, esterasa, pectinasa, lipasa, etc).

- en el artículo publicado por [Pérez-Nevedo et al. \(2006\)](#) estudiaron la interacción de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*, donde vieron que la muerte temprana de las no-*Saccharomyces* no es únicamente consecuencia de su poca tolerancia al etanol, sino que *S. cerevisiae* libera al medio sustancias tóxicas que influyen sobre la permanencia de no-*Saccharomyces* en el medio.

- [Viana et al. \(2008\)](#) evaluaron el potencial de cepas de no-*Saccharomyces* para la producción de compuestos aromáticos (ésteres de acetato), donde se destacaron *Hanseniaspora* y *Pichia* (levaduras generalmente presentes en la flora nativa de la uva).

- [Zott et al. \(2011\)](#) confirmaron que algunas cepas de no-*Saccharomyces* son capaces de contribuir positivamente en la liberación de tioles volátiles en vinos producidos a partir de variedades que contengan conjugados de S-cisteína, siendo esta contribución dependiente de la cepa utilizada.

- En un trabajo realizado por [Comitini et al. \(2011a\)](#) se determinó que es po-

sible obtener diferentes resultados dependiendo de la asociación de levaduras y de la cantidad de inóculo utilizado.

- En el trabajo desarrollado por [Sadoudi et al. \(2012\)](#) hicieron un estudio comparativo de los cambios inducidos por fermentaciones mixtas sobre el perfil de los compuestos aromáticos en comparación con una fermentación de cultivo puro, donde se evidenciaron 2 tipos de interacciones, activas y pasivas, y dentro de las activas aquellas positivas (aumentaron el perfil aromático) y negativas (disminuyeron el perfil).

- En el trabajo realizado por [Medina et al. \(2012\)](#) fue posible ver que, para las cepas estudiadas, la inoculación secuencial (la cepa de no-*Saccharomyces* se inocula antes que la *S. cerevisiae*) determina que la no-*Saccharomyces* consume antes los nutrientes y eventualmente conduce a un enlentecimiento o parada de fermentación ya que disminuye la disponibilidad de nutrientes para *S. cerevisiae*. Este efecto se revierte con el agregado de nitrógeno asimilable (YAN) en combinación con vitaminas. En este caso se logra incrementar la población de *S. cerevisiae* y se aumenta la tasa de fermentación.

En este trabajo nos enfocaremos particularmente en las levaduras de la especie *Hanseniaspora vineae*, ya que en estudios previos realizados por el grupo del Área Enología [Medina et al. \(2012\)](#) se constató que es una especie con buen potencial de aplicación en bodega tanto por su capacidad fermentativa como por las posibles características que aporta al vino [Carrau et al. \(2012\)](#). Así mismo son necesarios estudios más detallados acerca del porqué de sus aportes.

1.1.1. Justificación del trabajo

Este trabajo de tesis tratara de lograr una mayor comprensión sobre el comportamiento de levaduras de la especie *Hanseniaspora vineae*, sobre la cual se han realizado estudios preliminares y éstos han evidenciado que dentro de las levaduras nativas uruguayas son las que realizan los mejores aportes durante el proceso de vinificación al vino final. A partir de este trabajo podrá lograrse una profunda caracterización de la especie en cuanto a sus características enológicas, haciendo especial énfasis en el aumento de complejidad aromática y sensorial del vino, factor de compra fundamental en los principales países importadores.

Él plan de trabajo presentado está basado en el planteo estratégico de seleccionar las mejores cepas de *Hanseniaspora vineae* de la colección del Área de Enología y Biotecnología de Fermentaciones de Facultad de Química aisladas de viñedos uruguayos, las cuales estarán mejor adaptadas a los mostos a nivel industrial que las levaduras comerciales, y conocer así la diversidad de cepas dentro de esta especie y su potencial.

Mediante el estudio de estas levaduras nativas y su utilización en la vinificación podrá lograrse una diferenciación de los vinos que el uso extensivo de la escasa diversidad de levaduras comerciales no permite, uniformizando los vinos de diferentes regiones y países del nuevo mundo.

Este tipo de estudios a nivel de la vinificación contribuyen a buscar identidad propia al Uruguay y desarrollar una marca país más diferenciada en el ambiente del vino. El vino uruguayo es hoy considerado por algunos como uno de los principales productos promotores de la marca país. La vinificación constituye un punto clave y el uso de levaduras diferentes que nuestros competidores permite desarrollar productos más autóctonos.

La aplicación de los conocimientos adquiridos en el marco de esta tesis de Doctorado permitirán identificar las cepas nativas de *Hanseniaspora vineae* mejor adaptadas a la vinificación y dependiendo de las características enológicas que éstas aporten, se podrá conocer a qué tipo de vinos puede favorecer en mayor medida. Así mismo esta tesis se encuentra dentro del marco de uno de los grupos del programa CSIC I+D 656 (Facultad de Química, IIBCE e INIA) que tiene como objetivo aplicar mayor biodiversidad microbiana en la industria de alimentos, buscando procesos de mínima intervención con respecto a las fermentaciones convencionales del vino. En los países del Nuevo Mundo (USA, Australia, Nueva Zelanda) que hoy producen vinos finos de exportación y compiten con los mejores productores tradicionales se ha invertido sistemáticamente en investigación biotecnológica como forma de mejorar todas las etapas de producción. Los objetivos presentados impactaran en la estrategia comercial del sector vitivinícola uruguayo (PACC Vitivinícola 2008) que es lograr vinos de exportación, diferenciados, de alta calidad y precio, apuntando a un mercado internacional de consumidores exigentes y alto nivel de formación que se sabe aprecian el desarrollo de conocimientos como los que se proponen en esta tesis.

Hipótesis

Este trabajo se basa en el supuesto de que el conocimiento sobre el comportamiento (durante la fermentación) de las levaduras no-*Saccharomyces* nativas de la vid, brindara a los enólogos una variedad de opciones para fermentar según sus necesidades y permitirá la diversificación de los vinos. Con este fin el presente trabajo se plantea realizar la caracterización de *Hanseniaspora vineae* nativas de viñedos uruguayos y estudiar su impacto sobre la calidad de los vinos.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo principal de éste trabajo es intentar comprender el comportamiento de una selección de levaduras nativas de la especie *H. vineae* aisladas de viñedos uruguayos y seleccionarlas según sus habilidades para utilizar en fermentaciones a nivel de bodega.

Objetivos específicos

- Discriminar genética y químicamente las cepas de la misma especie, *H. vineae*, pertenecientes a la colección, seleccionando aquellas que muestren mejores aptitudes y/o que aporten buenas características durante la fermentación.

-Estudiar las vías de formación de compuestos típicos de la especie y el efecto de nutrientes nitrogenados sobre la producción de estos aromas de interés enológico por su aporte a la calidad organoléptica de los vinos.

- Estudiar el comportamiento de estas levaduras a escala industrial en comparación con fermentaciones realizadas a partir de levaduras comerciales.

Capítulo 2

Marco teórico

El vino por definición es jugo fermentado de uvas frescas, pero desde un punto de vista científico, el vino es una solución acuosa de etanol, con mas o menos trazas de azúcares, ácidos, ésteres, acetatos, lactatos y otras sustancias presentes en el jugo de uva o derivadas de éste durante la fermentación [Johnson and Diéguez \(2005\)](#). Por lo que se entiende que la materia prima fundamental para la elaboración de un vino de calidad sean las uvas (su composición y el estado de las mismas).

2.1. Composición química de la uva

La uva es la baya fruto de la vid. La especie de vid utilizada casi exclusivamente para la elaboración de vinos es *Vitis vinifera*.

El conjunto de procesos metabólicos que ocurren durante la maduración de la uva tendrán como resultado la formación de los principales componentes de la misma, que serán, en parte, los responsables de la calidad de vino. Por ello una correcta maduración del fruto es esencial para obtener una vinificación de calidad [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#).

Los principales componentes químicos presentes en la uva son: agua, sales inorgánicas, hidratos de carbono, ácidos, fenoles, compuestos nitrogenados, lípidos y terpenoides.

Las sales inorgánicas (aniones y cationes) provienen principalmente del suelo e ingresan a las bayas por su sistema circulatorio (xilema y floema), entre ellos se encuentran, potasio, calcio, magnesio, nitratos, fosfatos y hierro. Estos

constituyen parte de los nutrientes necesarios para la vida y se hallan en diferentes concentraciones en la baya según la etapa de maduración de la misma. La distribución y proporción de éstos componentes en la uva tiene consecuencias sobre la composición del mosto. A modo de ejemplo, la suma de los ácidos (principalmente el tartárico) y cationes (potasio) determinará el pH del mosto, el cual, como veremos más adelante, influye sobre la capacidad de fermentación de las levaduras [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#); [Fugelsang and Edwards \(2007\)](#).

La glucosa y fructosa son los principales hidratos de carbono encontrados en la uva. Éstos se acumulan en la baya al momento de la maduración. Previo al envero, predomina la glucosa, alcanzando luego de la maduración una relación glucosa/fructosa igual a 1. Si bien se pueden encontrar otros hidratos de carbono, la acumulación de estos azúcares es fundamental para un correcto desarrollo de la fermentación, y de ellos dependerá, casi exclusivamente, la graduación alcohólica del vino obtenido [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#); [Fugelsang and Edwards \(2007\)](#).

Dentro de los ácidos orgánicos que se pueden encontrar en la uva, el tartárico y el málico abarcan el 90 % del contenido de ácidos totales. En concentraciones más bajas están los ácidos cítrico y láctico y, finalmente, en trazas los ceto ácidos y el ácido succínico. Estos últimos aumentan su concentración en el vino producto del proceso de fermentación [Boulton et al. \(1995\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#). La relación entre los ácidos principales de la uva (tartárico y málico) cambia según la variedad de *Vitis*, las condiciones de maduración y factores climáticos, pero ambos se encuentran en mayor concentración previo al envero de la uva y disminuyen a medida que avanza el proceso de maduración de la baya [Jackson et al. \(1993\)](#); [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#). Durante la fermentación, el ácido tartárico permanece prácticamente estable, (puede sufrir cambios menores), sin embargo el ácido málico puede ser degradado, en parte, por algunas *S. cerevisiae* y degradado en su totalidad para producir alcohol y CO₂ por levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *malidevorans* [Radler \(1993\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#).

Otro grupo de los compuestos que tienen gran incidencia en la calidad del vino, son los compuestos fenólicos. Estos son extraídos principalmente de la piel y semillas de la uva. Son los principales responsables de la diferenciación entre vinos blancos y tintos. Entre ellos, podemos encontrar a los antocianos (principales responsables de la coloración de vinos tintos) y los taninos (responsables del sabor amargo y la sensación de astringencia). A estos compuestos

también se les adjudican propiedades bactericidas y antioxidantes mediante la captura de radicales libres Carrau (2003). El rango y la concentración en que se encuentran estos compuestos serán fundamentales en la determinación del “flavor” de los vinos Jackson et al. (1993); Ribereau-Gayon et al. (2003).

Dentro del grupo de compuestos nitrogenados se encuentran el amonio (mayoritario mientras el fruto aun esta verde) y los aminoácidos (comienzan a incrementar su concentración a partir del envero, llegado a representar entre el 50 y 90 % del nitrógeno total en la uva madura). Estos compuestos son de vital importancia para el correcto desarrollo de la fermentación, ya que son parte de los nutrientes esenciales de la levadura y el déficit o exceso de estos, puede llevar al enlentecimiento o paradas de fermentación Bisson and Maynard (1999); Carrau (2003) y repercuten en la calidad organoléptica de los vinos. En menor proporción, se encuentran péptidos y proteínas, que se concentran mayoritariamente antes de la maduración de la uva y disminuyen sobre el final de la misma. Estos compuestos no pueden ser asimilados por las levaduras Ribereau-Gayon et al. (2003); Blouin (2004).

Los lípidos se dividen en tres grupos: neutros, glicolípidos y fosfolípidos, éstos últimos se encuentran en mayor proporción en la baya madura. No se encuentran grandes variaciones entre las distintas variedades de *V. vinifera*. La presencia de éstos compuestos es importante ya que favorecen el crecimiento y desarrollo de levaduras en el mosto Blouin (2004).

Los terpenos (linalol, citronelol, geraniol, nerol y α -terpineol) pueden encontrarse en elevada concentración sobre todo en las variedades blancas Moscatel, Riesling y Gewürztraminer y constituyen (para éstas variedades) los componentes principales de su “flavor” característico y su tipicidad Jackson et al. (1993)

Si bien de estos compuestos descritos muchos son característicos de la variedad de uva, el clima, el suelo y manejo que se realice del viñedo, tendrán gran incidencia sobre la formación de los mismos y por consiguiente en la calidad final de las uvas Jackson et al. (1993); Ribereau-Gayon et al. (2003); Swiegers and Pretorius (2005); González-Barreiro et al. (2015).

2.2. Productos de la fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica, es la transformación de los azúcares del jugo de uva, fundamentalmente en alcohol y CO₂, junto a una serie de otros compuestos, para formar lo que conocemos como vino. Todos esos compuestos que se formaran, principalmente debido al metabolismo secundario de las levaduras contribuirán a dar sabor y aroma al vino terminado [Peynaud \(1996\)](#); [Soden \(1999\)](#); [Boido \(2002\)](#); [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#); [Carrau \(2003\)](#); [Mostert \(2013\)](#). La fermentación alcohólica es conducida normalmente por levaduras del género *Saccharomyces*.

Etanol

Luego del agua, es el constituyente, cuantitativamente hablando, más importante del vino. Proviene mayormente de la fermentación alcohólica del azúcar del mosto, por lo que la concentración de azúcar presente en la uva es un factor limitante para su producción. Sin embargo, algunas células de la uva son capaces de formar pequeñas cantidades de este compuesto, en condiciones de anaerobiosis [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#); [Carrau \(2003\)](#). Como su producción depende casi exclusivamente del metabolismo de las levaduras, el contenido de etanol dependerá, además de la concentración inicial de azúcares, de la levadura que se utilice para su fermentación. Si bien las levaduras *Saccharomyces* poseen gran eficiencia para producir y tolerar etanol, hay levaduras no-*Saccharomyces* (nativas de la uva), capaces de iniciar una fermentación alcohólica de manera espontánea (sin haber sido inoculadas), que no tienen tanta eficiencia ni tolerancia, por lo que la producción de etanol en vinos fermentados con estas otras levaduras puede verse afectada [Lambrechts and Pretorius \(2000\)](#); [Pretorius \(2000\)](#); [Fugelsang and Edwards \(2007\)](#); [Fleet \(2008\)](#); [Swiegers et al. \(2016\)](#). El etanol, es ligeramente dulce, tiene acidez moderada, un poco de amargor y además actúa como solvente o transportador de otros compuestos [Soden \(1999\)](#).

Glicerol

El glicerol le sigue en importancia al agua y al etanol en cuanto a su presencia en el vino. Es el primero de los productos secundarios de la fermentación alcohólica. Es formado por la levadura en las primeras etapas de la fermentación, a través de la vía de la fermentación gliceropirúvica. Al igual que para el etanol, la producción de éste compuesto es dependiente de la levadura que se utilice y en algunas ocasiones pueden llegar a detectarse hasta 20 g/L [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#), pero normalmente se encuentra en un rango entre los 5-8 g/L [Scanes et al. \(1998\)](#). Si bien no tiene impacto directo sobre el aroma del vino, éste le aporta dulzor y untuosidad [Swiegers et al. \(2016\)](#).

2.2.1. Compuestos aromáticos del vino

Los compuestos responsables del aroma del vino, se pueden clasificar en cuatro categorías de acuerdo al momento de su formación durante el proceso de vinificación. De ésta forma tendremos:

Aromas varietales: provienen de la uva, son parte de lo que se conoce como el potencial aromático y en gran parte, son los responsables de la tipicidad de los vinos. Éstos se pueden dividir en:

- Compuestos aromáticos libres: podrán ser directamente detectados por el olfato, y están constituidos esencialmente por terpenoles. En algunas cepas como Cabernet pueden encontrarse pirazinas.
- Compuestos precursores de aroma: no son odoríferos y son mucho más abundantes que los anteriores.

Aromas prefermentativos: se forman en el período desde que se colecta la uva hasta el momento de la fermentación. Esencialmente se producen por reacciones enzimáticas o químicas con precursores presentes en la uva.

Aromas fermentativos: se forman durante la fermentación, a partir del metabolismo secundario de las levaduras o eventualmente de las bacterias lácticas en el caso de la fermentación maloláctica.

Aromas de crianza: el “bouquet”, resulta de la transformación del aroma durante la crianza del vino. Se produce como consecuencia de la formación de nuevos compuestos o rearrreglo de componentes presentes por medio de reaccio-

nes químicas o bioquímicas durante el estacionamiento de los vinos. Se pueden obtener resultados distintos, lo que dependerá de si el proceso es llevado a cabo en un ambiente como la botella (sin presencia de oxígeno) [Peynaud \(1996\)](#) o en la bodega, la cual tendrá presencia de oxígeno, generando un ambiente oxidativo.

Aromas Varietales

Los componentes aromáticos provenientes de la uva son característicos de la variedad y cumplen un rol fundamental en la calidad y tipicidad de los vinos. No necesariamente coincidirá el aroma que se percibe en la uva con el que finalmente tendrá el vino, ya que no todos los aromas varietales estarán en estado libre en la uva, éstos pueden encontrarse en forma de precursores aromáticos, los cuales tienen capacidad aromática siempre y cuando ocurran determinadas reacciones durante la fermentación para liberarse. Éste tipo de aromas son los más abundantes.

Varietales en estado libre

Terpenos

Los compuestos terpénicos encontrados con mayor frecuencia en la uva son los monoterpenos mono-oxigenados o di-oxigenados. Los primeros se forman en cantidad relativamente elevada en su forma libre en los mostos Moscatel (Moscatel de Alejandría, Muscat Ottonel, Moscatel de Hamburgo, etc.) y en otras variedades aromáticas o florales (Gewüztraminer, Viognier y Albariño), pero también se encuentran presentes en menores cantidades en otras variedades [Versini et al. \(1994\)](#); [Boido \(2002\)](#); [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#). Los alcoholes monoterpénicos como el linalol, geraniol, nerol y citronelol, son los más abundantes en la naturaleza y constituyen la base de muchos aceites esenciales. En las uvas, el linalol está acompañado por sus óxidos furánicos y piránicos. Otros óxidos constituyentes de las uvas son el óxido de nerol y el de rosa, que también son ingredientes del aceite esencial de rosa. En la **Tabla 2.1** se pueden ver los principales terpenos encontrados en vinos, con sus respectivos umbrales de percepción en medios distintos y sus descriptores asociados.

Los polioles monoterpénicos y sesquiterpénicos (dioles y trioles) presentes en las uvas en concentraciones superiores a 1 mg/L, son poco odoríferos. Pueden, sin embargo, formar otros monoterpenos a veces odoríferos, por hidrólisis a pH ácido. De esta forma, por ejemplo, la hidrólisis ácida del 3,7-dimetilocta-1,5-dien-3,7-diol permite obtener el ho-trienol [Strauss et al. \(1986\)](#). Finalmente, es posible encontrar aldehídos de los alcoholes terpénicos correspondientes como son el geranial, neral y citronelal, los cuales son muy aromáticos pero poseen notas no tan florales como dioles terpénicos, que al poseer dos funciones alcohol, son más solubles pero menos aromáticos [Rapp and Mandery \(1986\)](#).

Tabla 2.1: Principales terpenos encontrados en el vino, con su umbral de percepción en distintos medios (mg/L) y sus descriptores aromáticos asociados

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Medio	Descriptor
Linalol	0,01	sim. vino	floral, coriandro
	0,05	vino	lavanda, bergamota
α -terpineol	0,40	vino	floral, pino
Citronelol	0,10	sim. vino	dulce, floral
	0,018	vino	
Nerol	0,4	vino	lima, rosa jacinto
Geraniol	0,03	sim. vino	frutado,
	0,13	vino	floral

Pirazinas

Las metoxipirazinas son compuestos heterociclos nitrogenados. El origen de estos compuestos no es bien conocido en la uva ni en otros vegetales en general. Son citados como posibles precursores algunos aminoácidos como la leucina, isoleucina, valina y el glioxal. Si bien las concentraciones encontradas son muy bajas (0,5 a 50 ng/L) [Lacey et al. \(1991\)](#); [Allen and Lacey \(1993, 1998\)](#), las mismas son muy superiores a los umbrales de percepción. Se ha demostrado que su concentración presenta una correlación positiva con las notas herbáceas (aromas descritos como ‘morrón verde’, ‘espárrago’, ‘notas terrosas’) [Heymann et al. \(1986\)](#); [Harris et al. \(1987\)](#); [Bayonove et al. \(1998\)](#). Las uvas y los vinos obtenidos a partir de *V. vinífera* cv. Cabernet Sauvignon y Sauvignon blanc frecuentemente poseen aromas herbáceos, vegetativos o verdes que han sido

atribuidos a estos compuestos [Boido \(2002\)](#).

Precusores aromáticos

Muchas variedades no aromáticas de uvas producen vinos de alta calidad, que se distinguen por sus características aromáticas bien diferenciadas. Esta particularidad aromática parece provenir, en la mayoría de los casos, de precursores no aromáticos propios de cada variedad [Bayonove et al. \(1998\)](#)

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos (cafeico, p-cumárico, ferúlico) están presentes en las vacuolas de las células de la cáscara y de la pulpa de la uva, donde básicamente todos se encuentran en su forma esterificada con ácido tartárico [Ribéreau-Gayon et al. \(1975\)](#). Estos compuestos son abundantes pero de contenido variable dependiendo del ácido, la variedad, la zona de cultivo y el año de cosecha [Nagel et al. \(1979\)](#); [Ong and Nagel \(1978\)](#); [Romeyer \(1984\)](#); [Boursiquot \(1987\)](#). Algunas cepas de levadura pueden hidrolizar y descarboxilar estos ésteres en el curso de la fermentación, dando origen a vinilfenoles volátiles. A su vez el contenido de estos compuestos puede aumentar al utilizar durante la fermentación preparados enzimáticos con actividad esterasa secundaria [Albagnac \(1975\)](#); [Thurston et al. \(1981\)](#); [Chatonnet et al. \(1993a,b\)](#); [Dugelay et al. \(1993\)](#). Estos ácidos de por si no tienen aroma, pero pueden sufrir diversas reacciones enzimáticas que los transforman en fenoles volátiles [Di Stefano \(1985\)](#). A modo de ejemplo, durante la fermentación, por acción de enzimas descarboxilasas provenientes de las levaduras o de la actividad de las bacterias lácticas, se producen cantidades importantes de 4-vinil y 4-etil fenol, 4-vinil y 4-etilguayacol y vainillato de etilo [Di Stefano \(1985\)](#); [Baumes et al. \(1986\)](#). A su vez, los vinil fenoles pueden encontrarse como precursores glicosidados en la uva, y pueden ser liberados en el curso de la vinificación. Existen también otros fenoles provenientes de la uva presentes en su forma libre como es el caso del eugenol (asociado a notas especiadas, como el clavo), y otros que se encuentran glicosidados como la vainillina, propiovainillina o la zingerona [Boido \(2002\)](#). Muchos de los compuestos de éste grupo son pasibles de modificar el aroma del vino y determinar su tipicidad [Nicolini et al. \(2001\)](#).

Carotenoides

Los carotenoides (C40) son pigmentos fotosintéticos, presentes en las uvas maduras, que, por degradación foto-química o enzimática (polioxigenasas, lipooxigenasas), dan origen a compuestos aromáticos de 9, 10, 11 o 13 átomos de carbono (norisoprenoides) que son poco solubles en agua, volátiles y frecuentemente responsables de notas aromáticas propias de la variedad [Enzell \(1981\)](#); [Schreier \(1984\)](#); [Enzell \(1985\)](#); [Bayonove et al. \(1998\)](#). Se ha observado que según la intensidad de la luz que recibe la fruta en la madurez, en especial en las últimas etapas, varían las cantidades formadas de los distintos norisoprenoides y las relaciones de concentración entre ellos [Boido \(2002\)](#). La mayoría de los norisoprenoides no existen en estado libre en la uva, pero se encuentran en cantidades relativamente abundantes como precursores en sus formas glicosidadas [Williams et al. \(1992\)](#); [Winterhalter and Skouroumounis \(1997\)](#).

Compuestos azufrados (Precursores cisteínicos)

Los compuestos azufrados en los vinos son generalmente considerados como responsables de defectos organolépticos. Sin embargo, desde hace varios años se ha demostrado la importancia de algunos compuestos que poseen una función tiol en la calidad del aroma de ciertos frutos, plantas aromáticas y alimentos, como el cassis, el pomelo y la guayaba [Bayonove et al. \(1998\)](#); [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#). Los precursores no glicosídicos de compuestos azufrados han sido puestos en evidencia en mostos de la variedad Sauvignon blanc por [Tominaga et al. \(1998\)](#). Se trata de precursores cisteínicos S-conjugados. La cisteína es uno de los aminoácidos más notables desde el punto de vista químico. La función tiol transportada por la cadena lateral es adecuada para formar unidades de dímeros por formación de puentes de azufre o disulfuro en la estructura terciaria de las proteínas. En mostos y vinos, la cisteína está presente en cantidades variables y es más o menos metabolizada por los diversos microorganismos. Durante el curso de la fermentación alcohólica se produce la liberación de tioles volátiles debido a la actividad β -liasa (azufre-carbón-liasa) de las levaduras [Tominaga et al. \(1998\)](#)

Compuestos glicosidados

Algunos metabolitos volátiles que contribuyen al aroma de los vinos se encuentran en baja concentración en las uvas, pero son acumulados en mayor concentración en forma ligada, mediante su glicosidación [Sefton et al. \(1993\)](#). En la uva se han encontrado cuatro clases de glicósidos y se podrían clasificar como:

- β -D-glucopiranosidos: (unión de una aglicona a una molécula de glucosa).
- 6-O-(α -L-arabinofuranosil)- β -D-glucopiranosidos (unión de una aglicona a un diglicósido) [Williams et al. \(1982\)](#).
- 6-O-(α -L-ramnopyranosil)- β -D-glucopiranosidos (unión de una aglicona a un diglicósido) [Williams et al. \(1982\)](#).
- 6-O-(α -L-apiopiranosil)- β -D-glucopiranosidos (unión de una aglicona a un diglicósido) [Voirin et al. \(1990\)](#).

En la mayoría de las cepas estudiadas las formas glicosidadas se consideran mas importantes que sus formas libres, ya que poseen un mayor potencial aromático [Bayonove et al. \(1998\)](#); [Versini et al. \(1999\)](#). En estos glicósidos, la aglicona puede ser polifuncional y se puede unir a la molécula de azúcar por una función alcohol, fenol o ácido. En la uva los glicósidos son encontrados en mayor proporción en la cáscara que en la pulpa y el jugo, y su distribución entre pulpa y cáscara varía de una cepa a otra [Gunata et al. \(1985a,b\)](#). La hidrólisis de estos compuestos, para liberar la aglicona correspondiente, se puede dar por medio de enzimas β -glicosidasas, o por hidrólisis química. Los compuestos que pueden encontrarse glicosidados en uvas y vinos son: alcoholes alifáticos (C4, C5, C6, C8), alcoholes terpénicos, norisoprenoides y derivados del metabolismo del ácido shiquímico.

Aromas prefermentativos

Estos aromas se producen durante los tratamientos realizados a la uva desde el momento de la cosecha hasta el inicio de la fermentación (cosecha, transporte, descobajado, estrujado, prensado). Los efectos mecánicos de estos tratamientos producen una ruptura a nivel celular que permite a los sistemas enzimáticos entrar en contacto con los sustratos presentes en el grano. Por otra parte, la mayoría de estos tratamientos incorpora oxígeno en el medio, facilitando de esta forma la disponibilidad del segundo sustrato implicado en las reacciones de oxidación enzimática [Cordonnier \(1989\)](#); [Bayonove et al. \(1998\)](#). De esta forma a partir de los ácidos linoléico y linolénico, se producen sustancias que van a participar en el aroma prefermentativo como los alcoholes y aldehídos con 6 átomos de carbono. El estado de madurez de la uva es un factor influyente en la formación de éstos compuestos, obteniéndose una mayor producción en cosechas realizadas antes de la madurez. Otro factor a tener en cuenta es el manejo de la fruta en las etapas de transporte y recepción, ya que el manejo mecánico intenso aumentará su concentración [Joslin and Ough \(1978\)](#); [Cordonnier \(1989\)](#). La etapa prefermentativa adquiere un rol preponderante en las vinificaciones por maceración carbónica, técnica que consiste en mantener la uvas enteras en una atmósfera de CO₂, induciendo de esta forma a un metabolismo anaerobio del grano previo a la extracción de jugo y fermentación alcohólica. Entre los distintos fenómenos prefermentativos que ocurren en este tipo de vinificación se encuentra la formación de ciertos compuestos aromáticos que harán que se diferencien de vinos vinificados en forma tradicional. Estos compuestos aromáticos, principalmente derivados del metabolismo del ácido shiquímico, han sido reportados por varios autores, encontrándose entre ellos el cinamato de etilo, salicilato de etilo, y otros como el estireno y el octanol [Versini and Tomasi \(1983\)](#); [Versini et al. \(1984\)](#); [Dell'Oro and Di Stefano \(1990\)](#).

Aromas fermentativos

Durante la fermentación alcohólica las levaduras no sólo convierten los azúcares en etanol y dióxido de carbono, también producen una gama de metabolitos volátiles menores, pero sensorialmente importantes que dan al vino su carácter vinoso [Schreier \(1979\)](#); [Rapp and Mandery \(1986\)](#); [Etievant \(1991\)](#); [Guth \(1997\)](#); [Lambrechts and Pretorius \(2000\)](#); [Romano \(2003\)](#); [Swiegers et al.](#)

(2005); Carrau et al. (2015); Swiegers et al. (2016); Padilla et al. (2016). Algo similar ocurre durante la fermentación maloláctica. Las bacterias no solamente favorecen la desacidificación de los vinos cuando es necesario, también pueden potenciar el perfil aromático de un vino Henick-Kling (1993); Henschke and Jiranek (1993); Laurent et al. (1994); Henschke et al. (2002); Boido (2002).

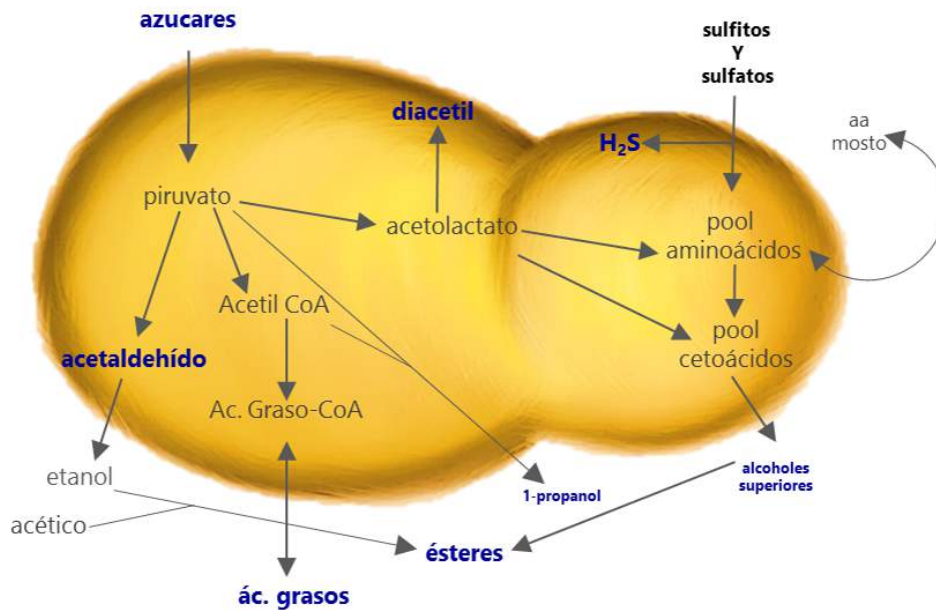


Figura 2.1: Esquema general de los principales compuestos aromáticos producidos a partir del metabolismo de las levaduras durante la fermentación. Adaptado de Carrau (2003).

Alcoholes superiores

La capacidad de producir alcoholes superiores es una característica general de todas las levaduras. Es el grupo de compuestos aromáticos mayoritario dentro de las bebidas alcohólicas Swiegers et al. (2005). Se caracterizan por tener olor y sabor fuerte y picante/caliente por lo que tienen una gran incidencia en el carácter del vino Rapp and Mandery (1986). Estos compuestos se dividen en dos categorías, alifáticos y aromáticos. Dentro de los alifáticos se encuentran, 1-propanol, alcohol isoamílico y el alcohol isobutílico. Dentro de los aromáticos encontramos el alcohol β -feniletílico y el tirosol. Los alcoholes superiores son producidos anabólicamente a partir de glucosa o catabólicamente a partir de aminoácidos presentes en el medio, posiblemente sintetizados incorporando nitrógeno amoniacal a esqueletos de cetoácidos por transaminación, y

con fines varios como la edificación de proteínas estructurales. Los principales compuestos producidos dentro de este grupo de alcoholes superiores son el 2- y 3- metilbutanol, propanol, 2-metilpropanol, butanol, pentanol, 2-feniletanol (alcohol β -feniletílico) y 3-metiltio-1-propanol [Etievant \(1991\)](#). Cuando están presentes en el vino en concentraciones menores a 300 mg/L contribuyen favorablemente a la complejidad del vino, pero en concentraciones superiores a los 400 mg/L, su influencia sobre la calidad del vino sera negativa. Los alcoholes superiores son importantes precursores de ésteres [Swiegers et al. \(2005\)](#). Varios factores influyen en la concentración y el perfil de éstos compuestos en el vino, entre ellos la cepa de levadura utilizada durante la fermentación. La concentración de aminoácidos en el medio es también un factor que determinará la producción de éstos alcoholes [Swiegers et al. \(2005\)](#), como podremos ver en los resultados presentados en el capítulo 4 (**4.3.3**) donde se evidencia la influencia de ciertos aminoácidos sobre la producción de alcohol bencílico (BAL). En la **Tabla 2.2** se nombran los principales alcoholes superiores encontrados en vino, su umbral de percepción en mg/L y el o los descriptores asociados.

Otros alcoholes

Durante la fermentación también se producen: 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,2-etanodiol y 2,3-butanodiol. Sin embargo su presencia no es relevante en el aroma final del vino [Bayonove et al. \(1998\)](#).

Tabla 2.2: Umbral de percepción (mg/L) y descriptores asociados de los alcoholes superiores encontrados en vinos. Adaptado de Carrau (2003); Swiegers et al. (2016)

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Descriptor
1-pentanol	2,5-64	desagradable, químico, aceite de fusel
1-butanol	0,50-10	aceite de fusel químico
Alcohol isobutílico	0,565-228	aceite de fusel químico
Alcohol isoamílico	0,25-310	alcohólico, en baja concentración frutado y vinoso
3-metil-1-pentanol	-	frutado, verde, hojas, notas a geranio
4-metil-1-pentanol	-	verde grasoso penetrante
3-etoxi-1-propanol	-	frutado
Tirosol	200	amargo químico
Alcohol bencílico	159-900	floral dulce
Alcohol β -feniletílico	0,75-200	caliente, floral rosa, miel

Ácidos grasos

Los ácidos orgánicos en general no son lo suficientemente volátiles como para modificar el perfil aromático de los vinos, con la lógica excepción del ácido acético que es volátil y tiene un umbral de percepción lo suficientemente bajo como para que ejerza un papel preponderante en los aromas vínicos. La formación de los ácidos transcurre, bien por descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico e incorporación de coenzima A, o de manera simultánea a la formación de ácido fórmico, también a partir de ácido pirúvico y coenzima A. En general los ácidos de número par de átomos de carbono, y entre C6 a C12, presentan aromas lácteos, que recuerdan a ciertos quesos, aunque se encuentran en los vinos en concentraciones muy bajas. Las levaduras producen también ácidos grasos ramificados de cadena corta a partir de cetoácidos provenientes del anabolismo o catabolismo de los aminoácidos. Es el caso del ácido propanoico, 2-metilpropanoico y los ácidos 2 y 3-metil butanoico. Du-

rante la fermentación, los ácidos de cadena corta aumentan su concentración en el medio mientras que los de cadena larga disminuyen. Estos ácidos tienen un efecto sensorial con notas a jabón, que según la concentración pueden ser negativas. A su vez, los ácidos grasos de cadena media, como el hexanoico, octanoico y decanoico pueden combinarse con esterés y como resultado de esa unión aportarán aromas frutales.

En la **Tabla 2.3** se nombran los principales ácidos grasos encontrados en vino, su umbral de percepción en mg/L y el o los descriptores asociados

Tabla 2.3: Umbral de percepción (mg/L) y descriptores asociados de los ácidos grasos encontrados en vinos. Adaptado de [Lambrechts and Pretorius \(2000\)](#); [Carrau \(2003\)](#)

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Descriptor
Ácido acético	150-700	vinagre, pungente
Ácido propiónico	20	rancio, algo pungente
Ácido butírico	2,2-4,0	pungente
Ácido isobutírico	8,1	pungente, transpiración, agrio
Ácido valérico	-	desagradable
Ácido isovalérico	0.7	queso, transpiración
Ácido hexanoico	3-8	transpiración, queso, cabra
Ácido octanoico	13	rancio, cabra jabonoso, aceitoso
Ácido decanoico	10-15	rancio, jabonoso, ceroso, desagradable

Ésteres

En la fermentación alcohólica se forman dos grupos principales de ésteres. Los ésteres de ácidos grasos y los acetatos de alcoholes superiores [Carrau \(2003\)](#). Constituyen uno de los grupos mas grandes e importantes de compuestos que afectan el perfil aromático en bebidas fermentadas [Swiegers et al. \(2005\)](#). En la **Tabla 2.4** se pueden ver alguno de los ésteres mayormente encontrados en vinos, con su umbral de percepción (mg/L) y sus descriptores. Los ésteres mas significativos son el acetato de etilo, el acetato de isoamilo, el acetato de isobutilo, el hexanoato de etilo y el acetato β -feniletílico [Thurston et al. \(1981\)](#); [Lambrechts and Pretorius \(2000\)](#); [Carrau \(2003\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#). La síntesis de ésteres es un proceso intracelular y es un proceso dependiente de cepa. Los ésteres de ácidos grasos de cadena corta aportan mas al aroma del vino que los de cadena larga y los ésteres de acetato son mas variables y son los que dependen mas de la cepa que se utilice y de la concentración de azúcares en el medio [Henschke and Jiranek \(1993\)](#).

Tabla 2.4: Umbral de percepción (mg/L) y descriptores asociados de los ésteres encontrados en vinos [Carrau \(2003\)](#)

Compuesto	umbral de percepción (mg/L)	Descriptor
Acetato de isobutilo	0,073-1,6	frutado, banana, manzana, frambuesa
Acetato de etilo	12,3	Frutado o solvente
Acetato de isoamilo	0,26	frutado, banana, pera
Acetato β -feniletílico	0,25	rosa, miel, fruta, floral
Hexanoato de etilo	0,005-0,2	manzana, banana, violetas
Octanoato de etilo	0,002-0,58	vinoso, durazno, ananá, pera
Decanoato de etilo	0,5	floral, avellana, vinoso

Compuestos carbonílicos

Los principales compuestos carbonílicos presentes durante la fermentación son el acetaldehído y el diacetilo. Tienen un gran impacto a nivel sensorial por los descriptores a los que se los asocia (manzana, cítricos, nuez y manteca) [Bartowwsky et al. \(2002\)](#). La concentración de estos compuestos disminuye debido a la actividad reductora de las levaduras y por la presencia de anhídrido sulfuroso y etanol, que reaccionan con estos compuestos para dar compuestos azufrados y acetales [Bayonove et al. \(1998\)](#).

Compuestos azufrados

Estos compuestos son formados principalmente por acción de las levaduras, por lo general poseen olores intensos y poco agradables por el efecto negativo que tiene el grupo funcional azufre en la percepción olfativa [Schneider et al. \(2003\)](#). Los compuestos azufrados se dividen en dos grupos. El primero de ellos formado por los llamados “ligeros” (alta volatilidad) entre los que se encuentra: ácido sulfhídrico, sulfuro de carbono, disulfuro de carbono, metil y etil mercaptanos. Estos en general están asociados a aromas desagradables, generalmente descritos como “huevo podrido”. Los mostos pobres en nitrógeno son más susceptibles a la formación de altos niveles de éstos compuestos [Swiegers et al. \(2016\)](#). El segundo grupo (baja volatilidad) es el formado por los compuestos azufrados superiores: 2-mercapto etanol, 3-metiltio-1-propanol, ácido 3-metiltiopropánico y sus ésteres, cis- y trans-2-metiltiofan-3-ol, 4-metiltiobutan-1-ol y otros [Rapp et al. \(1985\)](#); [Rapp and Mandery \(1986\)](#). La formación de estos compuestos está ligada al metabolismo del nitrógeno y azufre de la levadura. Aunque en vinos excepcionalmente sobrepasan el umbral de percepción, participan globalmente de su aroma y en general su aporte es negativo [Swiegers and Pretorius \(2005\)](#).

Lactonas

Son compuestos producidos por las levaduras durante la fermentación, y se forman por esterificación intramolecular de hidroxiaácidos. Las más abundantes en el vino son las γ -lactonas, donde se encuentran la γ -butirolactona, 4-carboetoxi- γ -butirolactona en mayor concentración. En concentraciones menores se encuentran la 2-hidroxi-3,3-dimetil- γ -butirolactona y la 2-hidroxi-3-metil-2-penteno- γ -lactona. Estos compuestos tienen muy poca incidencia en el aroma de los vinos [Etievant \(1991\)](#), exceptuando la γ -nonalactona, cuyo umbral de percepción es de 0,03 mg/L y la 2-hidroxi-3,3-dimetil- γ -butirolactona en los vinos de jerez y otras vinificaciones oxidativas (umbral de percepción 0.001-0.015 mg/L).

Fenoles volátiles

Durante la maduración de la uva la mayoría de los fenoles volátiles identificados se encuentran esencialmente en su forma glicosidada. Mientras que durante la fermentación, por acción de las levaduras se liberan 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol, con aromas a caucho y elastómero, el primero y especiado y clavo de olor el segundo. Estos compuestos se producen por descarboxilación de los ácidos cumárico y felúrico los cuales se encuentran en forma libre en muy baja concentración, y deben ser hidrolizados a partir de su esterificación con ácido tartárico y formas glicosidadas [Grando et al. \(2015\)](#). En los vinos blancos es más frecuente encontrar este tipo de compuestos ya que en los tintos, la concentración total de fenoles puede inhibir la actividad cinamildescarboxilasa de la levadura [Chatonnet et al. \(1993b\)](#).

En la **Tabla 2.5** se presentan algunos de los compuestos carbonilo, azufrados, lactonas y fenoles volátiles junto a su umbral de percepción en mg/L y los descriptores a los cuales están asociados.

Tabla 2.5: Compuestos carbonílicos, azufrados, lactonas y fenoles volátiles junto a su umbral de percepción (mg/L) y los descriptores con los que se los asocia. (Adaptado de [Carrau \(2003\)](#))

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Descriptor
Compuesto carbonílicos		
Acetaldehído	100	manzana verde oxidada
Diacetilo	0,15-5	manteca
Compuestos azufrados		
Sulfhídrico	0,05	huevo podrido
3-metiltio-1-propanol	0,05-1,2	repollo fermentado
Lactonas		
γ -butirolactona	-	caramelo
Fenóles volátiles		
4-vinil fenol	0,085-0,18	caucho, elastómero flor de datura
4-vinil guayacol	0,11	ahumado, vainilla, clavo

Aromas postfermentativos

Finalmente, durante la crianza de los vinos se producen modificaciones del aroma que conducen al llamado “bouquet” o aroma postfermentativo. Se supone que al finalizar esta etapa, el vino ha alcanzado un equilibrio final caracterizado por aromas delicados y penetrantes. Este equilibrio se logra a través de la transformación de compuestos volátiles durante la conservación, en la cual se da la disminución de los aromas frutados característicos de los vinos jóvenes evolucionando hacia aromas más complejos [Gonzalez-Viñas et al. \(1998\)](#); [Pérez-Coello et al. \(1999\)](#).

Todos los compuestos vistos en este capítulo tendrán influencia sobre la calidad del vino resultante. La mayoría de ellos se producen durante el proceso de fermentación debido a la acción de las levaduras, por lo que la correcta selección de la levadura a utilizar será determinante en la calidad del vino obtenido.

2.3. Las levaduras y su rol durante la fermentación

Hace 150 años los estudios realizados por Louis Pasteur evidenciaron el rol fundamental de las levaduras como responsables de la fermentación alcohólica. Desde entonces se han dedicado innumerables estudios para comprender la microbiología asociada a la vinificación. Como resultado de éstos años de estudios, se ha revelado la complejidad de la ecología microbiana implicada durante el proceso de la vinificación [Fleet \(1993\)](#).

2.3.1. Generalidades de las levaduras

Son organismos unicelulares pertenecientes al reino Fungi. Algunos hongos pluricelulares, que durante su ciclo biológico pasan por una etapa unicelular, son también considerados dentro del grupo de las levaduras [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#).

El primer nivel de clasificación de éstos microorganismos se basa en la falta de fase sexual en su ciclo de vida o en ciertos aspecto de ésta fase [Jolly et al. \(2006\)](#). Es así que se diferencian tres grupos: Ascomicetes, Basidiomicetes y Deuteromicetes (hongos imperfectos). Los Ascomicetes se caracterizan por poseer esporas (ascosporas) contenidas dentro de un “saco” nombrado asco, el cual se forma a partir de la célula vegetativa [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#); [Kirk et al. \(2008\)](#). En los Basidiomicetes las esporas (basidiosporas), están contenidas dentro de una estructura alargada, en forma de botella, llamada basidia [Madigan et al. \(2003\)](#). No se ha evidenciado aun el mecanismo de reproducción sexual para los Deuteromicetes [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#). En general, las levaduras implicadas en el proceso de vinificación son del tipo Ascomicota, aunque también se encuentran algunos hongos imperfectos [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#).

Las siguientes subdivisiones dentro de la taxonomía de las levaduras (orden, familia, genero y especie) están basadas en las propiedades morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas que presentan las distintas levaduras [Kurtzman et al. \(2011a\)](#).

Ecología de las levaduras

Las levaduras se encuentran en hábitat específicos, donde forman comunidades. Las diferentes especies que se encuentran en cada hábitat pueden ser autóctonas (componentes esenciales de la comunidad) o bien alóctonas (están ahí transitoriamente o por casualidad).

A su vez aquellas presentes en muchos hábitat son consideradas generalistas mientras que las que se encuentran en un único hábitat se conocen como especialistas [Starmer and Lachance \(2011\)](#).

El entorno donde se da el proceso de vinificación puede ser considerado un hábitat, donde se pueden dividir dos ecosistemas diferentes, el ecosistema de viñedo (superficie de las uvas), donde encontraremos una comunidad determinada de levaduras, y el ecosistema de bodega (superficie de equipamientos y mosto), donde encontraremos otra comunidad de levaduras. La población del ecosistema de viñedo puede variar según el grado de madurez y/o sanidad de la uva (cuanto mas maduro esté el fruto mas disponibilidad de azúcar tendrán las levaduras, y si las uvas están dañadas, los nutrientes serán mas accesibles), variedad de la uva (grosor de la piel de la baya), y factores externos como el clima (temperatura, lluvias, humedad) y el manejo del viñedo (manejo de la canopia, fertilización, riego, uso de fungicidas o pesticidas) [Bisson and Kunkee \(1991\)](#); [Longo et al. \(1991\)](#); [Regueiro et al. \(1993\)](#); [Boulton et al. \(1995\)](#); [Epifanio et al. \(1999\)](#); [Cabras and Angioni \(2000\)](#); [Pretorius \(2000\)](#); [Jolly et al. \(2006\)](#). Por otra parte, la comunidad dentro del ecosistema de bodega se vera afectada por la higiene con la que se mantenga la bodega y el equipamiento, mientras que en el mosto influirán sus características (pH, concentración de azúcares), así como del manejo del mosto (agregado de SO₂, agregado de enzimas, filtrado, maceración en contacto con pieles de uvas) [Fleet \(1993\)](#); [Pretorius \(2000\)](#).

Levaduras de la vinificación

Las levaduras involucradas en el proceso de vinificación se pueden discriminar en dos grupos, *Saccharomyces* y no -*Saccharomyces*.

El primer grupo es representado principalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura típica de la fermentación alcohólica. Si bien no suele aislarse en viñedos o la superficie de las uvas (ver **Figura 2.2**), es frecuentemente encontrada en el ambiente de bodega (prensas, tanques, herramientas, etc) y

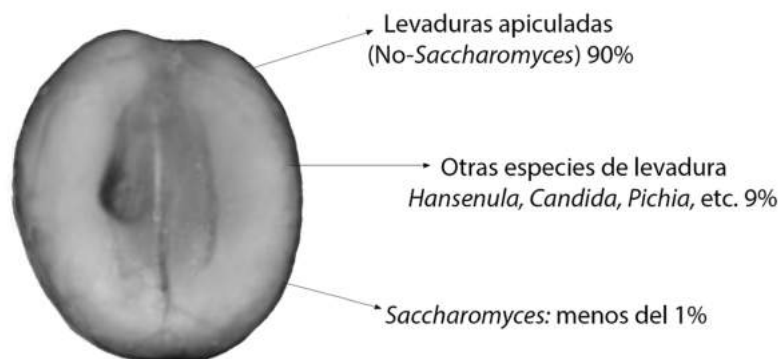


Figura 2.2: Principales levaduras y la ocurrencia de las mismas sobre el grano de uva. (Adaptado de Carrau (2003))

mostos Peynaud and Domercq (1959). Las levaduras del grupo de las no - *Saccharomyces*, conocidas como levaduras nativas o autóctonas, son las que están presentes en las uvas y mostos, donde representan más del 99 % de la población total Fleet (1993); Pretorius (2000); Fugelsang and Edwards (2007). Recientemente se pudieron identificar por primera vez especies de *Hanseniaspora* en mosto, provenientes del ecosistema de bodega Grangeteau et al. (2015), lo que permite pensar que tal vez estas levaduras puedan mantenerse durante una año en la bodega y luego volverse dominantes durante la fermentación, como suele suceder con *S. cerevisiae* Padilla et al. (2016).

Saccharomyces cerevisiae

Ha sido la principal levadura utilizada para el proceso de fermentación alcohólica a lo largo de los años. Esto se debe a que ésta levadura es capaz de consumir los azúcares del mosto convirtiéndolos en etanol, CO₂ y pequeñas cantidades de metabolitos secundarios, que contribuirán a la calidad sensorial de los vinos. A su vez, esa conversión la realiza incluso en presencia de oxígeno (O₂) Coghlan (2006), lo que las hace eficientes y competitivas frente a otros microorganismos. Este fenómeno, a través del cual la levadura *S. cerevisiae* produce alcohol en condiciones aerobias, con una gran concentración de glucosa externa, en lugar de producir biomasa mediante el ciclo de Krebs (lo que suelen realizar el resto de las levaduras), es conocido como efecto Crabtree

Gonzalez et al. (2012). De hecho, *Saccharomyces* prefiere fermentar antes que respirar, aunque les implique obtener una cantidad de energía 18 veces inferior para cumplir sus requerimientos metabólicos y de crecimiento Pronk et al. (1996). Este comportamiento asumido por *S. cerevisiae* es considerado como una estrategia competitiva, ya que el etanol es tóxico para la mayoría de los microorganismos y al producirlo a partir del azúcar del medio, en presencia de O_2 , *Saccharomyces* será sumamente competitiva frente a otros microorganismo en medios ricos en azúcar Swiegers et al. (2016).

Las condiciones iniciales que se encuentran en el mosto (bajo pH y alta concentración de azúcares), sumado al agregado de anhídrido sulfuroso (como agente antioxidante y antimicrobiano), ejercen presión selectiva sobre la carga microbiana inicial Henschke (1997). Luego de iniciada la fermentación, el oxígeno y los nutrientes presentes en el medio se agotan al mismo tiempo que se eleva la concentración de etanol, tornándose en un ambiente tóxico para gran parte de los microorganismos. Estas presiones selectivas que se dan durante el proceso de vinificación favorecerán a aquellas levaduras altamente especializadas en la fermentación alcohólica y con mayor tolerancia al etanol, como *S. cerevisiae*. Por éstos motivos es que *S. cerevisiae* es la preferida por los enólogos y por lo que se la conoce como la “levadura del vino” Henschke (1997); Swiegers et al. (2016).

Sin embargo, si la fermentación ocurre de manera espontánea, en las primeras etapas, las levaduras presentes serán del tipo no-*Saccharomyces* donde las que se encuentran en mayor proporción son las pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora* y *Candida*, seguidas por *Metschnikowia* y *Pichia* en las etapas intermedias de la fermentación Fleet (1993); Pretorius (2000); Torija et al. (2001); Beltran et al. (2002); Ribereau-Gayon et al. (2003); Zott et al. (2008); Swiegers et al. (2016). Finalmente será *S. cerevisiae* quien domine las últimas etapas de la fermentación gracias a su alta especialización.

Debido a la amplia utilización de las levaduras *S. cerevisiae* es que la tendencia general ha sido hacia la uniformización de los vinos, ya que finalmente son las levaduras las principales responsables de dar carácter diferencial a los vinos a partir de la producción de metabolitos secundarios, como compuestos aromáticos durante la fermentación. Por lo que el uso de diferentes levaduras favorecerá a la diferenciación de los vinos (Figura 2.3) Swiegers et al. (2005).

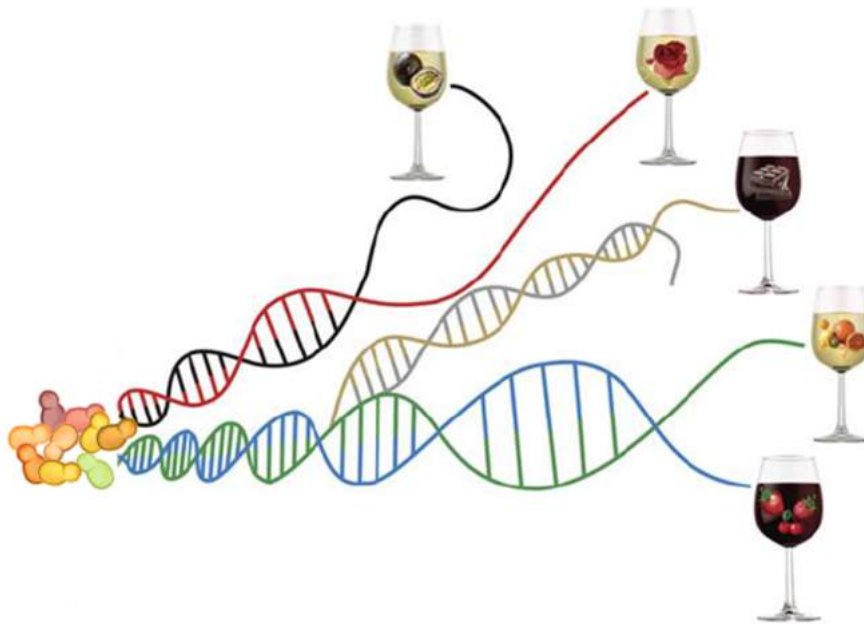


Figura 2.3: Esquema representativo del aporte de distintas levaduras al perfil organoléptico de los vinos (Adaptado de Pretorius (2000))

Dentro de las levaduras no-*Saccharomyces* se han identificados 149 géneros Kurtzman et al. (2011a), conformados aproximadamente por 1500 especies, mas de 40 de éstas fueron aisladas a partir de mosto de uva Jolly et al. (2006); Ciani et al. (2010); Jolly et al. (2013).

Normalmente, cada levadura posee dos nombres o denominaciones; la teleomórfica, que se refiere a su estado sexual (cuando produce esporas) y la anamórfica, que se refiere al estado asexual de la levadura (cuando no esporula). Esto implica que la clasificación taxonómica de las levaduras se torne un tanto engorrosa, ya que algunas no esporulan fácilmente o pierden temporalmente su capacidad para producir ascosporas Kurtzman et al. (2011a); Jolly et al. (2013). Algunos ejemplos de doble nomenclatura para algunas levaduras serian: teleomórfica/anamórfica (sexual/asexual) *Dekkera/Brettanomyces*, *Metschnikowia pulcherrima/Candida pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum/Kloeckera apiculata*, y *Torulaspora delbrueckii/Candida colliculosa* Jolly et al. (2006); Fungelsang and Edwards (2007); Kurtzman et al. (2011a); Comitini et al. (2011b). En la **Tabla 2.6** se presentan algunas de las levaduras que suelen encontrarse mas comunmente en mostos y vino en sus 2 formas de denominación (teleomórficas y anamórficas) y los nombres con que se solía nombrar a alguna de ellas.

Tabla 2.6: Levaduras no-*Saccharomyces* reportadas en uvas y mostos en fermentación. * y ** indican la carencia de forma teleomórfica o anamórfica respectivamente. (Tomada de Medina (2014), adaptada de Kurtzman et al. (2011a); Jolly et al. (2013))

Forma teleomórfica (sexuada)	Forma anamórfica (asexuada)	Denominación antigua
<i>Hanseniaspora vineae</i>	<i>Kloeckera africana</i>	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Kloeckera apis</i>	
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Kloeckera corticis</i>	
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	<i>Kloeckera javanica</i>	
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	*	
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	*	
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	*	
<i>Pichia terrícola</i>	*	<i>Issatchenkia terrícola</i>
<i>Kluyveromyces</i>	*	
<i>thermotolerans</i>	*	
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	*	
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	*	<i>Saccharomyces bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Candida sorbosa</i>	<i>Pichia farinosa</i>
<i>Milleronzyma farinosa</i>	*	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Candida colliculosa</i>	
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Candida famata</i>	<i>Saccharomyces rosei</i>
<i>Torulospora delbrueckii</i>	<i>Candida globosa</i>	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	
<i>Citeromyces matritensis</i>	<i>Candida hellenica</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Candida lambica</i>	
<i>Zigoascus meyeriae</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Hansenula anomala;</i> <i>Pichia anomala</i>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Candida reukaufii</i>	<i>Torulopsis pulcherrima</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Candida bombicola</i>	
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	*	<i>Torulopsis bombicola</i>
<i>Starmerella bombicola</i>	<i>Candida stellata</i>	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Candida valida</i>	<i>Torulopsis stellata</i>
**	*	
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Candida zemplinina</i>	<i>Hansenula kluyveri</i>
<i>Pichia kluyveri</i>	<i>Candida californica</i>	<i>Candida stellata</i>
**	<i>Candida azyma</i>	
**	*	
**	*	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>Lachancea kluyveri</i>	*	<i>Kluyveromyces thermotolerans;</i> <i>Candida dattlia</i>

Como vimos hasta ahora, tanto las uvas en el viñedo como el equipamiento de bodega y mostos constituyen fuentes de microorganismos, sobre todo levaduras, que como veremos mas adelante, pueden intervenir durante el proceso de fermentación. Por ésta razón se hace necesario poder identificar y conocer los microorganismos presentes para poder prever las acciones a tomar para el correcto desarrollo de la fermentación [Renouf et al. \(2007\)](#).

2.3.2. Identificación de levaduras

Los métodos de identificación tradicionalmente utilizados han sido la observación microscópica, el análisis de características fisiológicas como la asimilación de distintas fuentes de carbono, y medios de cultivos selectivos y/o diferenciales, como WLN y agar lisina (los mas utilizados). En el medio WLN es posible diferenciar las levaduras presentes en mosto y vino por genero/especie de acuerdo a su morfología. [Pallmann et al. \(2001\)](#) vieron que la morfología que adoptan ciertas levaduras en éste medio es lo suficientemente única como para permitir diferenciar unas de otras. Pudieron identificar miembros de los géneros *Pichia*, *Issatchenkia*, y *Candida*, incluso cuando se encontraban a baja concentración en el medio. En la **Figura 2.4** se pueden ver algunos ejemplos de la morfología adoptada por levaduras de especies diferentes en medio WLN. Se puede ver como *H. vineae* adopta colonias de color verde oscuro con poco brillo, de tamaño medio/chico, y aplanadas. *M. pulcherrima*, en cambio, presenta colonias claras, de tamaño medio/chico, aplanadas, mas bien opacas. Se observa la formación de un halo anaranjado alrededor de las colonias. Las colonias características formadas por *S. cerevisiae* son de color crema opacas, mantecosas y con forma cónica.

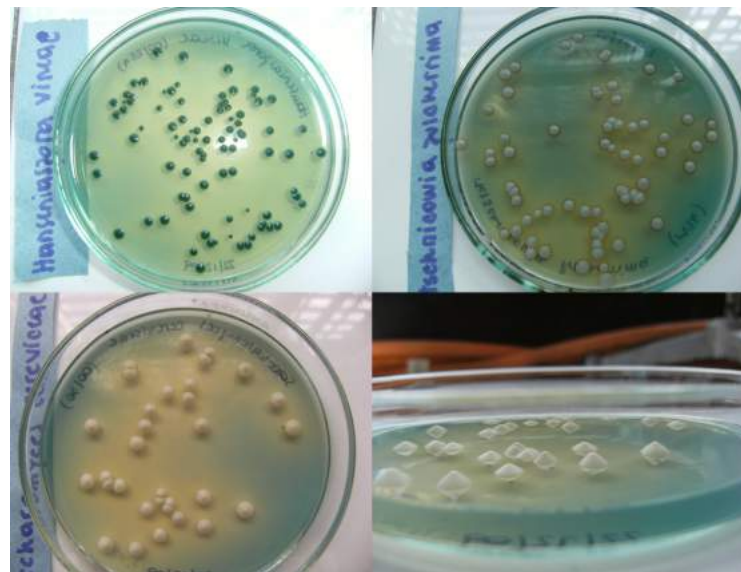


Figura 2.4: Se observa la morfología adoptada por diferentes especies de levaduras en WLN. *Hanseniaspora vineae* (superior, izquierda), *Metschnikowia pulcherrima* (superior derecha) y *Saccharomyces cerevisiae* (parte inferior)

El medio agar lisina permite diferenciar entre levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. El principio de éste medio diferencial es la fuente nitrogenada. En éste medio la única fuente de nitrógeno presente es la lisina, la cual no es asimilada por las levaduras *Saccharomyces* lo que las imposibilita de crecer. Es por ésto que las levaduras que crecen en éste medio son consideradas como no-*Saccharomyces* [Heard and Fleet \(1986\)](#).

Éstos son métodos económicos y accesibles para utilizar en bodega. Pero las técnicas moleculares representan un método mas eficiente y preciso a la hora de identificar las levaduras.

Las técnicas moleculares pueden diferenciarse en 2 categorías:

- Técnicas dependientes de cultivo. Como su nombre lo indica, para poder realizar éste tipo de identificación es necesario aislar colonias de los individuos en un medio sólido para obtener el ADN.
- Técnicas independientes de cultivo. En ellas no es necesario aislar previamente al microorganismo, se extrae el ADN directo de la muestra a analizar.

Técnicas dependientes de cultivo

Métodos basados en la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Dentro de las técnicas dependientes de cultivo la mas utilizada es a partir de amplificación por PCR es RFLP-PCR. Esta técnica permite diferenciar especies de levadura mediante el amplificado de una región específica del genoma (en general de los genes ribosomales) comprendida entre regiones muy variables (ITS) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De ésta forma se obtendrán fragmentos con una alta variación de longitud entre diferentes especies de levaduras. Estos fragmentos se cortaran mediante enzimas endonucleasas de restricción (reconocen sitios específicos en el ADN y cortan) generando distintos patrones a partir de los fragmentos generados por PCR. Estos patrones en general son específicos para cada especie de levadura, con la excepción de los diferentes estados (anamórfico/teleomórfico) para los que se obtienen patrones idénticos [Esteve-Zarzoso et al. \(1999\)](#); [Esteve-Zarzoso et al. \(2001\)](#). A veces los patrones de diferentes especies cuando se analizan muestras diversas se pueden superponer llevando a confusiones [Renouf et al. \(2007\)](#).

También se han utilizado técnicas menos especificas, donde no hay que tener un conocimiento previo del genoma de lo que se va a identificar. Mediante RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), se amplifican regiones cortas, al azar. Así se obtendrán distintos patrones de regiones cortas de ADN por especie. Una de las preocupaciones sobre el uso de técnicas de identificación basadas en patrones es la reproducibilidad entre diferentes laboratorios, ya que pequeñas diferencias en las condiciones de realización de la PCR pueden afectar los patrones especie-específicos que sirven de referencia. El cariotipo con electroforesis en campo pulsado y RAPD en ADN mitocondrial también pueden servir en la caracterización inicial e identificación de especies de levadura, pero la interpretación del patrón de franjas cromosómicas y los fragmentos de restricción mitocondriales con propósitos taxonómicos puede tornarse compleja debido al alto grado de polimorfismos, tales como reordenamientos cromosómicos dentro de algunos taxones levadura. [Kurtzman et al. \(2011b\)](#); [Quesada and Cenis \(1995b\)](#).

Se han reportado distintos métodos para la discriminación a nivel de cepas, que utilizan diferentes tipos de cebadores para amplificar por PCR regiones

polimórficas presentes en múltiples copias en los genomas eucariotas. El método Interdelta reportado por [Legras and Karst \(2003\)](#), amplifica regiones de ADN entre los elementos delta de retrotransposones Ty presentes en múltiples copias en el genoma de *S. cerevisiae*. En el trabajo realizado por [Jubany et al. \(2008\)](#) se diferenciaron levaduras de la especie *S. cerevisiae* autóctonas. A partir de éste trabajo se evidenció la variabilidad de las levaduras nativas uruguayas y se determinó que las muestras con diferentes patrones obtenidos a partir de los microsatélites analizados, seguramente correspondan a diferentes cepas. Sin embargo si dos o más muestras de ADN presentan el mismo patrón, sólo podemos decir que no se pueden discriminar a partir esos microsatélites y será necesario un análisis más exhaustivo.

Dado que hasta el momento prácticamente no se cuenta con los genomas completamente secuenciados de las principales especies de levaduras seleccionadas a partir de la uvas o mostos (*Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplinina*). (En el caso de *H. vineae*, recientemente se secuenció su genoma [Giorello et al. \(2014\)](#)), y se desarrolló un método simple y reproducible de PCR para discriminar cepas de levaduras no-*Saccharomyces* a nivel de subespecies [Barquet et al. \(2012\)](#). Para esto se diseñaron cebadores basados en repetidos en tándem de trinucleótidos, solos o en combinación con cebadores basados en secuencias conservadas de ARNts, específicos para Ascomycetes.

Otra técnica para la cual se necesita el aislamiento previo de las levaduras es la secuenciación de la región variable D1/D2 del ADN ribosomal 26S, para la cual ha sido demostrado que proporciona suficiente variabilidad para distinguir entre la mayoría de especies de levaduras debido a su valor taxonómico [Kurtzman and Robnett \(1998\)](#); [Kurtzman et al. \(2011a\)](#). Dado los altos costos y el tiempo que insume la secuenciación, no es una técnica que pueda utilizarse aun como práctica común para el control de calidad de los mostos y vinos [Arias et al. \(2002\)](#).

Métodos sin amplificación mediante PCR

Técnicas independientes de cultivo

En estas técnicas se extrae el ADN directamente de la muestra a analizar. A partir de éste tipo de técnicas se pudo comprobar que a lo largo del proceso fermentativo las levaduras menos adaptadas a las condiciones que se generan durante la fermentación (en general las no-*Saccharomyces*) no están muertas, sino que se encuentran en estado viable, pero no cultivable [Andorrà et al. \(2010, 2011\)](#).

La electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE) es una técnica prometedora, que ha sido utilizada para la identificación y cuantificación de poblaciones de especies de levadura en los alimentos y bebidas [Meroth et al. \(2003\)](#). La técnica se basa en la separación de fragmentos de ADN con secuencias de nucleótidos diferentes (Por ejemplo, especie-específico), usando la disminución de la movilidad electroforética de amplicones de ADN bicatenario parcialmente fundidos en un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente lineal de desnaturizante de ADN (una mezcla de urea y formamida). Se basa en las diferencias de comportamiento del ADN frente a la desnaturización, que dependerá de la secuencia de ADN. Al tener diferentes secuencias de ADN entre las distintas especies, tendrán diferentes tiempos de corrida por el gel. Una técnica relacionada es la electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE), en el que el gradiente de gel de DGGE se sustituye por un gradiente de temperatura. Los niveles de detección son a menudo alrededor 10^3 ufc/ml, pero se ha informado que a partir de las 10^2 ufc/ml se compara favorablemente con los métodos de recuento en placas estándar [Kurtzman et al. \(2011b\)](#). Esta técnica es muy útil para estudiar ecología microbiana cuando no se sabe previamente que microorganismos están presentes en la muestra, ya que en principio cada banda es un individuo.

La técnica de PCR en tiempo real esta llegando a ser ampliamente utilizada para el análisis de alimentos y bebidas, y se ha utilizado para la detección y cuantificación de las levaduras presentes en fermentaciones [Cocolin et al. \(2001\)](#); [Hierro et al. \(2006a, 2007\)](#); [Zott et al. \(2010\)](#). Esta técnica se basa en el amplificado por PCR con primers específicos de especie o genero, y el producto de la amplificación se detecta por fluorescencia, (y se utiliza el agente intercalante SYBR green) que fluoresce cuando se vuelve a armar la doble

hebra de ADN. El aumento de fluorescencia en cada ciclo, sera proporcional al numero de amplificadores, lo que se traduce en el numero de células, lo que permite identificar y cuantificar. En el trabajo realizado por [Zott et al. \(2010\)](#) pudieron analizar la dinámica poblacional de objetivos (por genero o especie) de levaduras. Observaron que las levaduras no-*Saccharomyces* como las especies *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* estuvieron presentes durante todo el proceso de fermentación. Algunas fueron detectadas incluso luego de 300 horas de fermentación, a pesar de que las levaduras predominantes en el medio eran las *Saccharomyces*. En este trabajo de tesis se utilizó ésta metodología para realizar el seguimiento de las poblaciones de levaduras durante la fermentación realizada a escala semi industrial (**Capítulo 4, parte 4.2.1**).

2.3.3. Metabolismo de los azúcares

En función de las condiciones de aerobiosis las levaduras podrán optar por dos vías metabólicas para obtener energía a partir de la degradación de los azúcares presentes en el mosto: fermentación alcohólica o respiración. Ambos procesos comenzaran de la misma manera, degradando los azúcares mediante la glicólisis [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#).

Los principales azúcares presentes en el mosto son glucosa y fructosa. Ambas hexosas se encuentran en concentraciones similares en el mosto [Fleet \(1993\)](#). Generalmente la glucosa es el azúcar preferido por *S. cerevisiae* [Bertels et al. \(2004\)](#) y lo utiliza en primera instancia para luego pasar a la fructosa. Hay otras especies de levaduras donde se observa una mayor afinidad hacia la fructosa, *Candida stellata* y *Zygosaccharomyces bailii* muestran una clara inclinación hacia la utilización esta última [Sousa-Dias et al. \(1996\)](#); [Romano and Suzzi \(1992, 1993\)](#), al igual que *Saccharomyces pombe* [Magyar and Panyik \(1989\)](#).

La utilización preferencial de la glucosa está influenciada por diferentes factores entre ellos, la levadura utilizada. Un ejemplo es la levadura *C. stellata* que consume fructosa preferentemente [Soden et al. \(2000\)](#); [Magyar and Tóth \(2011\)](#), por lo que los cultivos mixtos con levaduras *Saccharomyces* (glucofilicas) resultan ser una buena combinación, produciéndose, según se ha observado, un consumo complementario de los azúcares del mosto, y obteniéndose así vinos con muy bajo contenido de azúcar residual, altos niveles de glicerol,

ácido succínico y baja concentración de ácido acético y de alcoholes superiores [Ciani and Ferraro \(1998\)](#). El nivel de etanol presente en el mosto también afectara el metabolismo de los azúcares, ya que este tiene un efecto inhibitor sobre la utilización de la fructosa mayor que sobre la utilización de glucosa [Flood et al. \(1996\)](#). Finalmente, la tasa de utilización de nitrógeno que poseen las diferentes cepas [Berthels et al. \(2004\)](#), ya que se ha observado que el consumo de fructosa aumenta cuando se suplementa un medio con nitrógeno. Esto confirma el hecho de que el nitrógeno es un activador de paradas de la fermentación de la fructosa presente en el mosto [Berthels et al. \(2004\)](#). En cuanto a la fermentación de las pentosas presentes en el mosto, se ha observado que *S. cerevisiae* no las utiliza, pero especies de levaduras no-*Saccharomyces*, como *Candida*, *Pichia* y *Metshnikowia* son capaces de fermentar la xilosa [Rose \(1987\)](#); [Kurtzman et al. \(2011a\)](#).

Glicólisis

Es una sucesión de reacciones donde se transforma la glucosa en piruvato con formación ATP. Ésta es una vía prácticamente universal para todos los sistemas biológicos. La entrada de los azúcares del mosto a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma se da desde el medio exterior concentrado al interior diluido, por lo que no implica un gasto de energía. Ya en el citoplasma de la levadura, estos azúcares serán rápidamente metabolizados. Un primer paso supone la transformación de glucosa en fructosa-1,6-bisfosfato, necesitando la intervención de dos moléculas de ATP. Esta transformación comprende en sí misma tres etapas: una primera fosforilación de la glucosa en glucosa-6-fosfato, la isomerización de este último en fructosa-6-fosfato y por último, una segunda fosforilación que lleva a fructosa-1,6-bisfosfato. Estas tres reacciones son catalizadas respectivamente por la hexoquinasa, la fosfoglucosa isomerasa y la fosfofructoquinasa.

S. cerevisiae posee dos hexoquinasas (PI y PII) capaces de fosforilar la glucosa y la fructosa. La hexoquinasa PII es constitutiva y mayoritariamente se expresa durante la fase de crecimiento de las levaduras en un medio rico en azúcar. La hexoquinasa PI, parcialmente reprimible por la glucosa, sólo se expresa a partir de la fase estacionaria.

El segundo estadio de la glicólisis es la formación del gliceraldehído-3-

fosfato. Bajo la acción catalítica de la aldolasa, la fructosa-1,6-fosfato es fragmentada en dos triosa fosfatos isómeros: la dihidroxiacetona fosfato y la gliceraldehído-3-fosfato. La isomerización de esos dos compuestos es catalizada por la triosa fosfato isomerasa. Aunque en equilibrio la forma cetosa sea más abundante que la forma aldosa, la transformación de la dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído-3-fosfato es rápida pues este compuesto es eliminado permanentemente por las reacciones siguientes de la glicólisis. Por ello una molécula de glucosa conduce a la formación de dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato.

La tercera fase de la glicólisis incluye dos etapas que intentan recuperar una parte de la energía del gliceraldehído-3-fosfato.

En primer lugar, aquel es convertido en 1,3-bifosfoglicerato (1.3 BPG), reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Se trata de una oxidación acoplada a una fosforilación a nivel del sustrato. El cofactor de la deshidrogenación es la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) bajo forma oxidada, cuya parte reactiva es el núcleo nicotinamida. Simultáneamente, se establece una unión esterfosfórica rica en energía entre el carbono oxidado del sustrato y el fosfato inorgánico. El NAD^+ acepta dos electrones y un átomo de hidrógeno perdidos por el sustrato oxidado. Luego, la fosfogliceratoquinasa cataliza la transferencia del grupo fosforilo del acilfosfato del 1,3 BPG al ADP. Se forman tres fosfoglicerato y ATP.

La última fase de la glicólisis consiste en una transformación del 3-fosfoglicerato en piruvato. La fosfogliceromutasa cataliza la conversión del 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato. La deshidratación de este último, catalizado por la enolasa, conduce a fosfoenolpiruvato. Este compuesto posee un alto potencial de transferencia del grupo fosforilo, se forma por la fosforilación del ADP, del ácido pirúvico y del ATP en una reacción catalizada por la piruvato quinasa. Así se forman cuatro moléculas de ATP durante la glicólisis, pero dos son utilizadas de inmediato para activar una nueva molécula de hexosa ; por lo que la ganancia neta de la glicólisis es de dos moléculas de ATP por molécula de hexosa metabolizada. En éste estadio se marca el fin de la glicólisis y a partir de éste punto se diferencian la fermentación alcohólica, la fermentación gliceropirúvica y la respiración. En la **Figura 2.5** se aprecia la vía de la glicólisis y de la fermentación alcohólica.

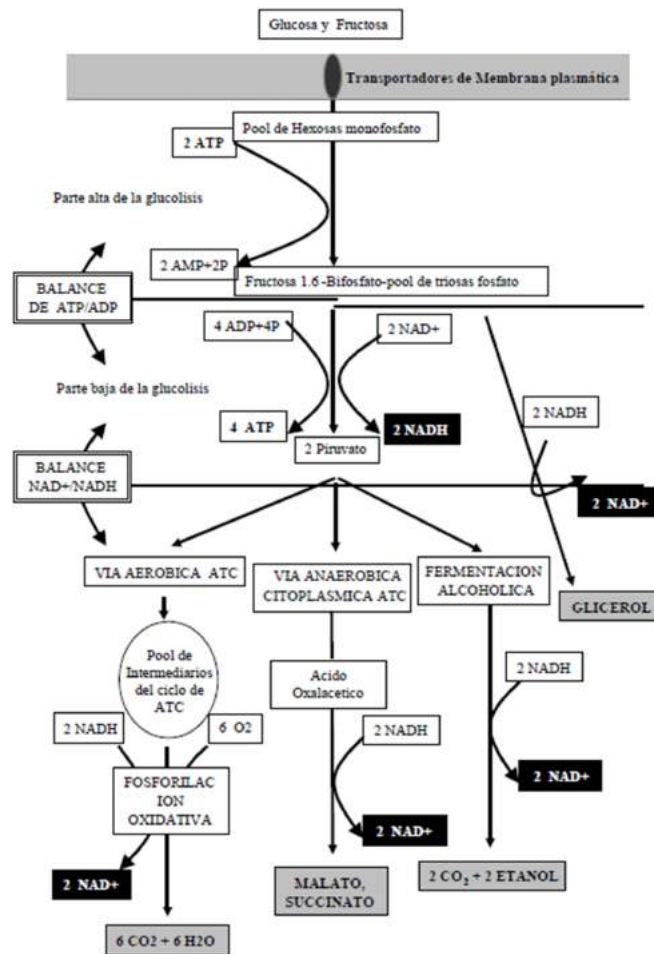


Figura 2.5: Esquema general de la vía glicolítica, equilibrios del balance de ATP y de la situación redox, balance NADH/NAD y su relación con vías metabólicas de compuestos secundarios (Extraído de Carrau (2003))

Fermentación Alcohólica

El poder reductor producido por la glicólisis, bajo forma de NADH, debe ser transferido a un receptor de electrones para regenerar el NAD⁺. En la fermentación alcohólica no es el piruvato sino su producto de descarboxilación, el acetaldehído, el que sirve de aceptor final de electrones.

Con relación a la glicólisis, la fermentación alcohólica involucra dos reacciones enzimáticas suplementarias. La primera es la descarboxilación del ácido pirúvico, catalizada por la piruvato descarboxilasa, cuyo cofactor es el pirofosfato de tiamina (TTP).

La segunda etapa es la reducción del acetaldehído a etanol por el NADH, reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa, cuyo sitio activo contiene

ion Zn^{2+} . La piruvato descarboxilasa (PDC) de *S. cerevisiae* comprende dos isoenzimas: una forma mayor PDC1, que representa el 80% de la actividad descarboxilasa, y una forma menor PDC5.

Desde el punto de vista energético, la glicólisis provee a la levadura de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada, es decir 14.6 Kcal biológicamente utilizables por mol de glucosa fermentada. En consecuencia, desde un punto de vista termodinámico la variación de energía libre en el curso de la degradación de un mol de glucosa en etanol y en CO_2 es de -40 Kcal, y la diferencia de 25.4 Kcal, es disipada bajo forma de calor.

Fermentación Gliceropirúvica

En presencia de sulfito la fermentación de la glucosa por la levadura conduce a cantidades equivalentes de glicerol, dióxido de carbono y acetaldehído bajo forma bisulfítica. Mediante la fermentación gliceropirúvica, el acetaldehído combinado con el sulfito no puede ser reducido a etanal; el aceptor final de los electrones que provienen de la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato es la dihidroxiacetona-1-fosfato, que es reducida a glicerol-3-fosfato que de esta forma es reducida a glicerol-3-fosfato y éste es desfosforilado a glicerol.

En esta fermentación se producen dos moléculas de ATP (necesariamente utilizadas para activar la glucosa en la primera etapa de la glicólisis) por molécula de hexosa degradada. De esta manera la fermentación gliceropirúvica, en la que la ganancia neta de ATP es nula, no provee energía biológicamente asimilable por la levadura. Esta fermentación no solo interviene en medios altamente sulfitados sino también al inicio de la fermentación alcohólica del mosto de la uva cuando las levaduras presentes se desarrollan en presencia de oxígeno donde la piruvato decarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa están en muy baja cantidad.

2.3.4. Levaduras no-*Saccharomyces*

Estas levaduras fueron inicialmente asociadas a procesos de deterioro de los vinos, dado que se hallaban frecuentemente en alta concentración cuando ocurrían paradas o enlentecimiento de fermentación así como en vinos defectuosos [Toit and Pretorius \(2000\)](#).

Actualmente esta ampliamente aceptado que levaduras no-*Saccharomyces* debidamente seleccionadas, afectan positivamente la calidad de los vinos debido a la producción de metabolitos secundarios durante la fermentación alcohólica [Jolly et al. \(2003\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#); [Jolly et al. \(2006, 2013\)](#); [Padilla et al. \(2016\)](#); [Varela \(2016\)](#). La gran variedad de levaduras presentes dentro del grupo de las no-*Saccharomyces* permite que se puedan seleccionar distintas cepas y diseñar diferentes iniciadores de fermentación (en conjunto con *S. cerevisiae*) que se adapten a diversos estilos de vinos. Así mismo, esta diversidad permitirá a los enólogos poder adaptarse al gusto cambiante de los consumidores [Pretorius \(2000\)](#). Como se mencionó anteriormente estas levaduras son sensibles a las condiciones adversas del mosto en relación a su competidora *S. cerevisiae*, por lo que es necesario comprender los factores que afectan el correcto desarrollo y capacidad fermentativa de éstas levaduras para realizar una adecuada selección.

Factores que afectan el desarrollo de las levaduras y la fermentación.

Son varios los factores que tienen impacto sobre el desarrollo y posterior capacidad fermentativa de éstas levaduras. El efecto de éstos factores pueden derivar en paradas o el enlentecimiento de la fermentación. Los mas importantes son: nutrientes limitantes, agentes antimicrobianos, factor killer, temperatura, pH, oxígeno y toxicidad de compuestos producidos durante la fermentación (etanol y ácidos grasos) [Bisson and Maynard \(1999\)](#).

Nutrientes limitantes

Las condiciones mas estudiadas responsables de paradas o enlentecimiento de la fermentación son falta de nutrientes [Bisson and Maynard \(1999\)](#), ya que si bien el mosto de uva es considerado un medio rico, capaz de cubrir los requerimientos nutricionales para que las levaduras puedan completar el proceso de fermentación, su composición varia según la variedad de uva y las condiciones climáticas de cada cosecha [Kunkee et al. \(1993\)](#). Los dos macronutrientes frecuentemente implicados en paradas de fermentación cuando se encuentran en baja concentración, son el nitrógeno y el fosfato [Henschke and Jiranek \(1993\)](#). Los micronutrientes como vitaminas y minerales se asocian al enlentecimiento del proceso fermentativo [Bisson and Maynard \(1999\)](#).

Las levaduras no-*Saccharomyces* o bien están presentes en el mosto (en fermentaciones espontáneas), o se inoculan previo a las levaduras *Saccharomyces* (en fermentaciones mixtas controladas). Se ha observado que disminuyen la disponibilidad de nutrientes en el medio, afectando el desarrollo posterior de *Saccharomyces* y provocando paradas o enlentecimientos en la fermentación alcohólica Fleet (1993); Bataillon et al. (1996), resultando en el desarrollo de defectos en los vinos producidos Carrau (2003); Wang et al. (2003).

En el estudio efectuado por Medina et al. (2012) con cultivos mixtos entre levaduras *H. vineae*:*Saccharomyces*, y *M. pulcherrima*:*Saccharomyces* se pudo observar enlentecimiento y paradas de la fermentación asociados a la disponibilidad limitada de nutrientes. El efecto fue más notorio en las fermentaciones realizadas con *M. pulcherrima*, sugiriendo que ésta levadura es más eficiente en el consumo de nutrientes o tiene requerimientos mayores de los mismos. A su vez, observaron que el crecimiento celular fue más demandante de nitrógeno que la fermentación, contrario a lo reportado anteriormente por Backhus et al. (2001). De acuerdo a los autores esto pudo deberse a que las levaduras no-*Saccharomyces* están mejor adaptadas a condiciones aeróbicas, al encontrarse éstas sobre la superficie de la baya, por lo cual su capacidad fermentativa puede verse disminuida.

El enlentecimiento del proceso fermentativo es más acentuado cuando las levaduras se inoculan de manera secuencial. En estos casos, las levaduras no-*Saccharomyces*, inoculadas en primer instancia, consumen los nutrientes del mosto para crecer, reduciendo así la posibilidad de que *Saccharomyces* crezca y fermente luego de ser inoculada. Cuando el inóculo de ambas levaduras se realiza de forma simultánea, la levadura *Saccharomyces* afecta negativamente el crecimiento de no-*Saccharomyces*, ya que es más eficiente en el consumo de los nutrientes Medina et al. (2012).

Por otro lado, la falta de fosfato repercute sobre la formación de biomasa y el rendimiento fermentativo, ya que es necesario para mantener el nivel de ciertas moléculas (Pi, ATP, ADP) indispensables para el normal desarrollo de la glicólisis. De la misma manera, la falta de minerales como Zn y Mg, que funcionan como co-factores durante ésta vía metabólica, llevarán también al enlentecimiento de la fermentación Díaz-Montaña and de Jesús Ramírez Córdova (2009).

También es importante conocer el efecto de las vitaminas sobre el crecimiento celular y el proceso de fermentación. Se ha estudiado la influencia del ácido pantoténico y la tiamina en fermentaciones con *S. cerevisiae* [Bataillon et al. \(1996\)](#) [Wang et al. \(2003\)](#). En un estudio realizado con *K. apiculata/H. uvarum* demostraron que la tasa de remoción de vitaminas del medio fue mas rápida para las no-*Saccharomyces* que para *S. cerevisiae*. *K. apiculata* consumió la tiamina del mosto durante las primeras horas de la fermentación, limitando la disponibilidad para *Saccharomyces*, lo que condujo a una parada de la fermentación [Bataillon et al. \(1996\)](#).

Volviendo al trabajo realizado por [Medina et al. \(2012\)](#), se vio que una mezcla de nitrógeno asimilable junto con vitaminas afecta significativamente el desarrollo de la fermentación en cultivos mixtos. Se observaron diferencias significativas en la proporción de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, con un incremento en el porcentaje de cepas *Saccharomyces* luego de la adición de nutrientes, provocando incremento de la tasa de fermentación.

La ventaja competitiva usualmente encontrada para *Saccharomyces* en cultivos mixtos dependerá de la disponibilidad de nutrientes presentes en el mosto, los que muchas veces pueden ser consumidos o retenidos por las levaduras no-*Saccharomyces*. Es por ésto que es importante llevar un control del nivel de nutrientes en el medio, ya que la ventaja de la fermentación mixta es principalmente el impacto de las levaduras no-*Saccharomyces* sobre la calidad organoléptica de los vinos (como puede observarse en la sección 4.2 de ésta Tesis) y ésto puede verse afectado por un mal manejo de los nutrientes durante la fermentación.

Agentes antimicrobianos

Ciertos compuestos afectan el crecimiento y/o el normal desarrollo de las levaduras en el mosto. Algunos, como los pesticidas o fungicidas se utilizan en el manejo del viñedo, y su uso puede afectar a las levaduras. Algunos pueden aumentar su fase de latencia [Bisson and Fleet \(1993\)](#). Otros presentan gran actividad antiséptica capaz de afectar la población de levaduras nativas presentes en las uvas [Cabras and Angioni \(2000\)](#).

El anhídrido sulfuroso (SO₂) en cambio, se agrega al mosto habitualmente como agente antioxidante y para reducir la carga inicial de las levaduras nativas presentes en las uvas [Amerine \(1980\)](#). Este compuesto ingresa a las

células por difusión simple disminuyendo el pH intracelular [Díaz-Montaña and de Jesús Ramírez Córdova \(2009\)](#). El efecto sobre las distintas levaduras ha sido estudiado y se ha determinado que las levaduras no-*Saccharomyces* son más sensibles [Heard and Fleet \(1985, 1986\)](#) [Heard and Fleet \(1988b\)](#) que las *Saccharomyces*. De todas maneras si la concentración es muy alta también se verán afectadas las *Saccharomyces*.

La susceptibilidad de no-*Saccharomyces* al SO₂ dependerá de la especie de levadura. En este trabajo se muestra que las levaduras *H. vineae* son resistentes a niveles de SO₂ normalmente utilizados en bodega (50 mg/L), en cambio [Romano and Suzzi \(1993\)](#) mostraron que *K. apiculata* (*H. uvarum*) es susceptible concentraciones inferiores a 5 mg/L de SO₂ libre, mientras que *C. guilliermondii* y *Zygosaccharomyces* spp. resisten hasta 10 veces ese valor.

Carácter Killer

Algunas levaduras (killer), tienen la capacidad de producir y secretar al medio sustancias de naturaleza proteica que pueden ser tóxicas para otras levaduras (sensibles). Las killer son inmunes a sus propias toxinas pero pueden ser sensibles a las secretadas por otras levaduras. También hay especies que no producen toxinas pero son resistentes (neutras).

Este fenómeno fue reportado en primera instancia para levaduras *S. cerevisiae*, y luego se encontró que levaduras no-*Saccharomyces* de los géneros *Candida*, *Cryptococos*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Picchia* y *Rhodotorula* también eran capaces de producir toxinas [Shimizu \(1993\)](#); [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#).

Saccharomyces produce las proteínas killer K₁, K₂, K₃ y K₂₈, mientras que las no-*Saccharomyces* secretan las proteínas que van de la K₄ a K₁₁.

La mayoría de las levaduras *Kloeckera/Hanseniaspora* son del tipo neutras por lo que no afectan a otras levaduras y serán capaces de resistir las toxinas killer que se liberen al medio [Díaz-Montaña and de Jesús Ramírez Córdova \(2009\)](#). En cambio para *P. kluyveri* se constató que produce zimocinas, un tipo de toxina killer, capaz de inhibir el crecimiento de ciertas cepas de *Saccharomyces* [Middelbeek et al. \(1980\)](#).

Por otra parte, se ha reportado un tipo de antagonismo entre *M. pulcherrima* y otras cepas de levaduras, incluyendo a *S. cerevisiae* que provoca enlentecimiento del proceso de fermentación. Según se ha podido observar, este fenómeno

se da por la presencia de un pigmento producido por esta especie de levadura que actúa de una manera similar al factor killer [Nguyen and Panon \(1998\)](#).

Temperatura, pH y oxígeno

Además de lo anteriormente descrito, el crecimiento y permanencia de las levaduras en el mosto dependerá también de factores como temperatura, pH y niveles de oxígeno [Fleet \(1993\)](#).

La temperatura es una de las variables que afecta directamente la tasa de crecimiento de los microorganismos [Charoenchai et al. \(1998\)](#) y, por lo tanto, la composición final de vino [Torija et al. \(2003\)](#). Generalmente las levaduras no-*Saccharomyces* soportan mejor la fermentación a bajas temperaturas, entre los 10 a 20°C [Soden \(1999\)](#), por lo que bajas temperaturas al inicio de la fermentación favorecerán la permanencia de éstas levaduras. *Saccharomyces* en cambio es más eficiente fermentando a partir de los 20°C [Fleet \(1993\)](#). La razón de este comportamiento diferencial entre cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* se debe al aumento de la tolerancia al etanol de las levaduras no-*Saccharomyces* a bajas temperaturas [Heard and Fleet \(1988b\)](#).

El pH del mosto ronda entre 2,75 y 4,25, y se considera como un factor importante a tener en cuenta para la sobrevivencia de las levaduras [Arroyo-López et al. \(2009\)](#). Se ha observado que levaduras pertenecientes a los géneros *Candida* y *Kloeckera*, específicamente *K. apiculata*, crecen mejor a pH elevados [Gao and Fleet \(1988\)](#). Su contribución a la calidad organoléptica fue superior a pH 3.5 que a pH 3.0 [Heard and Fleet \(1988a\)](#). Por su parte, *Saccharomyces* parece no verse afectada por cambios en los niveles de pH [Bisson and Kunkee \(1991\)](#). Según datos reportados por [Jolly et al. \(2006\)](#), la población celular de *Hanseniaspora/Kloeckera* es mayor en mostos tintos que en blancos, y se piensa que esto es debido a que el pH de los mostos tintos les resulta más favorable para su crecimiento.

El oxígeno es un factor limitante que afecta el crecimiento de las levaduras. *S. cerevisiae* es capaz de crecer rápidamente en ausencia total de oxígeno, mientras que la mayoría de las no-*Saccharomyces*, incluyendo aquellas típicamente encontradas en uvas y mostos, como *Hanseniaspora*, *Kloeckera* y *Torulasp-*

ra, tienen dificultades para crecer en ausencia O_2 , o lo hacen alcanzando una población celular baja. El oxígeno aumenta el tiempo de vida celular de las no-*Saccharomyces*, disminuyendo la tasa de mortalidad, sin afectar el comportamiento de *S. cerevisiae*. La presencia de oxígeno, al menos en las primeras etapas de la fermentación, permitirá una coexistencia mayor entre ambos tipos de levaduras [Díaz-Montaña and de Jesús Ramírez Córdoba \(2009\)](#).

T. delbrueckii junto con *Lachancea thermotolerans* son las levaduras no-*Saccharomyces* más sensibles a los niveles bajos de oxígeno (afecta notoriamente su crecimiento provocando la muerte celular), siendo más afectadas por la carencia de oxígeno que por la toxicidad frente al etanol [Jolly et al. \(2013\)](#).

Toxicidad de compuestos producidos durante la fermentación

Durante la fermentación alcohólica se producen ciertos compuestos que, dependiendo de la concentración en la que se encuentren, serán tóxicos para algunas levaduras.

Como se mencionó anteriormente, el etanol (principal compuesto producido durante la fermentación) es uno de ellos. El nivel de tolerancia que las distintas levaduras tendrán al etanol dependerá de la composición de la membrana plasmática, sobre todo de la presencia de ácidos grasos saturados, y de la fluidez de la misma [Pina et al. \(2004a\)](#); [Díaz-Montaña and de Jesús Ramírez Córdoba \(2009\)](#). El etanol actúa modificando los sistema de transporte activo de la membrana [Henschke and Jiranek \(1993\)](#). El efecto del este compuesto sobre las levaduras dependerá de diversos factores como la cepa, temperatura y aereación.

En general, las levaduras no-*Saccharomyces* presentan menor tolerancia a este compuesto. Por ejemplo se observó que *Hanseniaspora/Kloeckera* resiste niveles entre 5-6 % v/v de etanol, mientras que *Saccharomyces* puede resistir hasta 20 % v/v [Suárez Lepe \(1997\)](#). En cambio, en un estudio realizado mas recientemente por [Pina et al. \(2004a\)](#), observaron que *H. guilliermondii* pudo tolerar niveles similares de etanol que *S. cerevisiae*. Los niveles de tolerancia dependerán de la cepa y de la temperatura y a medida que esta aumenta, disminuye el nivel de tolerancia, En *K. apiculata* se vio que la resistencia disminuyó a partir de los 15°C. En *S. cerevisiae* el efecto de la temperatura comienza a partir de los 30°C.

Los ácidos grasos de cadena media (C6, C8 y C10) producidos durante la fermentación actúan conjuntamente con el etanol e inhiben la multiplicación celular, ya que afectan la capacidad de absorción y retención de vitaminas de las levaduras [Bisson and Maynard \(1999\)](#), lo que puede conducir a paradas de fermentación [Suárez Lepe \(1997\)](#). Este efecto es aún mayor a altas temperaturas y a concentraciones elevadas de etanol [Bisson and Maynard \(1999\)](#). Se ha comprobado el efecto tóxico de éstos compuestos sobre *S. cerevisiae* y se especula que también sobre otras especies de levadura [Fleet \(2003\)](#); [Viana et al. \(2008\)](#).

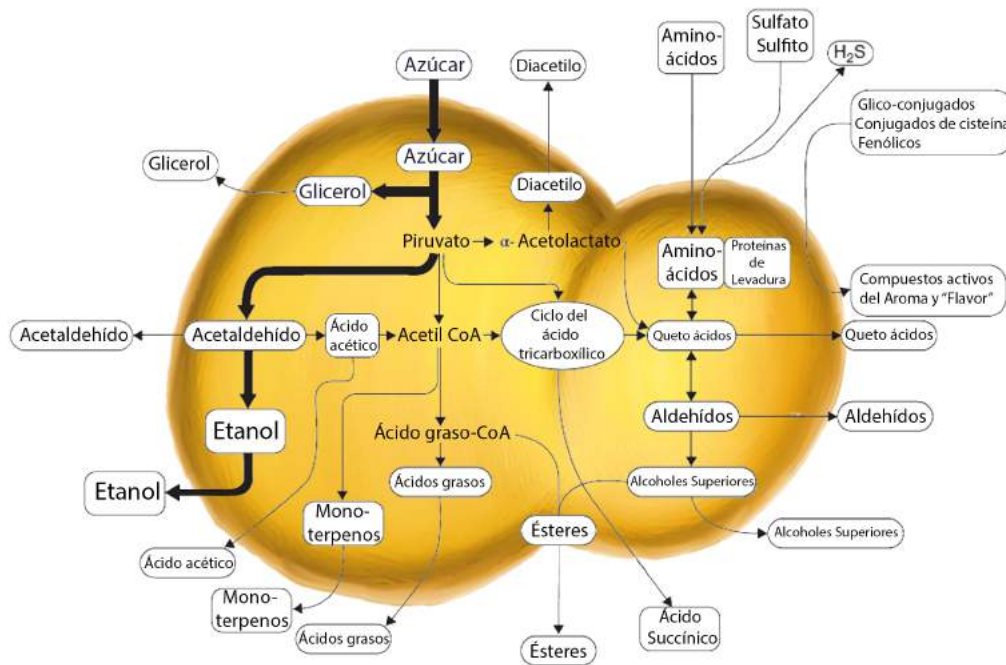


Figura 2.6: Representación esquemática de los compuestos involucrados en la percepción sensorial de los vinos, formados o sintetizados por las levaduras durante la fermentación. Adaptado de [Swiegers et al. \(2005\)](#).

Aportes de las distintas levaduras durante vinificación

El aporte de las distintas levaduras no-*Saccharomyces* a la vinificación va a estar dado, sobre todo, por la capacidad de producir metabolitos secundarios y la concentración que produzcan de los mismos. En la **Figura 2.6** se muestra un esquema de la formación o síntesis por parte de la levadura de los distintos compuestos involucrados en el “flavor” de los vinos [Pretorius \(2000\)](#); [Jolly et al. \(2003\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#); [Swiegers and Pretorius \(2005\)](#); [Jolly](#)

et al. (2006); Suárez-Lepe and Morata (2012); Jolly et al. (2013); Padilla et al. (2016); Swiegers et al. (2016).

Producción de etanol

En la actualidad la demanda de consumidores y del mercado esta enfocada a un consumo de vinos con menor contenido de etanol, lo que impulsa a la búsqueda de estrategias que permitan reducir la concentración de este compuesto en los vinos [Gonzalez et al. \(2012\)](#); [Ciani et al. \(2016\)](#); [Varela \(2016\)](#). Como hemos visto hasta ahora, *S. cerevisiae* es la levadura mas eficiente en la producción de etanol a partir de azúcar, prácticamente bajo cualquier circunstancia, por lo que seria razonable pensar que se puedan buscar alternativas dentro de las levaduras no-*Saccharomyces* para satisfacer la demanda y obtener vinos con reducido contenido alcohólico. *C. stellata* junto con *C. zemplinina* han sido estudiadas por [Magyar and Tóth \(2011\)](#), quienes observaron una gran diferencia entre ambas especies en cuanto a la producción de etanol, generando *C. zemplinina* un contenido alcohólico de aproximadamente la mitad que *C. stellata* (4.54 V/v % y 8.54 V/v % respectivamente). Otros autores [Rantsiou et al. \(2012\)](#); [Tofalo et al. \(2012\)](#) también encontraron rendimientos reducidos en etanol para *C. zemplinina*, y, según se ha visto, puede existir para esta especie de levadura un fenómeno de respiración asociado al bajo rendimiento en etanol [Gonzalez et al. \(2012\)](#). En la misma línea [Contreras et al. \(2014\)](#) identificaron una levadura *M. pulcherrima*, capaz de reducir el contenido alcohólico entre 0.9 % y 1.6 % cuando se co-inocula junto con *S. cerevisiae*. En los últimos años, distintas cepas de *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *Zygosaccharomyces sapae*, *Z. bailii*, *Z. bisoprus* y *Starmerella bombicola* fueron reportadas por lograr reducir el contenido alcohólico en vinos obtenidos a escala de laboratorio y también a escala semi-industrial [Ciani et al. \(2016\)](#); [Canonico et al. \(2016\)](#); [Rossouw and Bauer \(2016\)](#).

Producción de enzimas

En contraste a lo observado para *Saccharomyces*, las levaduras no-*Saccharomyces* pueden producir y secretar al medio diferentes enzimas, que entre otras cosas, pueden interactuar con compuestos precursores de aromas provenientes de las uvas, jugando un papel preponderante para determinar

el aroma varietal de un vino [Charoenchai et al. \(1997\)](#); [López et al. \(2015\)](#). La presencia de éstas enzimas depende en parte de las fuentes de carbono y nitrógeno presentes en el mosto. En el trabajo realizado por [Buerth et al. \(2011\)](#) se detectaron que pequeños cambios en la concentración de éstos nutrientes, pueden afectar la naturaleza, cantidad y diversidad de las enzimas secretadas.

Las enzimas mas comúnmente estudiadas por su rol durante la vinificación son las proteasas, β -glucosidasas y pectinasas ya que intervienen en atributos sensoriales como color, aromas y estabilidad de los vinos [Mostert \(2013\)](#).

La mayoría de las levaduras no-*Saccharomyces* posee algún tipo de actividad enzimática [Ganga and Martínez \(2004\)](#). En las últimas revisiones realizadas sobre el aporte de las levaduras no-*Saccharomyces* a la calidad organoléptica de los vinos se aprecia que las levaduras con mayor actividad enzimática reportada son *C. stellata*, *H. uvarum* y *M. pulcherrima* [Jolly et al. \(2013\)](#) [Padilla et al. \(2016\)](#).

Proteasas

Éstas enzimas son responsables de la hidrólisis de proteínas presentes en mostos y vinos. Estos compuestos pueden afectar la estabilidad y turbidez de los vinos [Waters et al. \(1994, 2005\)](#), y su hidrólisis a péptidos pequeños y aminoácidos, permitirá que éstos se puedan consumir fácilmente por las levaduras como fuente de nitrógeno. De ésta manera favorecen el enriquecimiento de nutrientes en el medio, evitando así paradas o enlentecimiento de fermentaciones que puedan suceder debido a una posible deficiencia de nitrógeno en el mosto.

Las levaduras que presenten este tipo de actividad se podrán tener en cuenta como una posible solución para afrontar los problemas asociados a la clarificación, estabilización y filtración de los vinos [Mostert \(2013\)](#).

En el capítulo 4 de esta Tesis se mostrará que las levaduras de la especie *H. vineae* estudiadas presentaron actividad extracelular proteasa aunque con diferencia de comportamiento entre cepas.

β -glucosidasas

Como vimos anteriormente en éste capítulo, algunos de los compuestos que

afectan la calidad organoléptica de los vinos se encuentran en el mosto en forma conjugada, unidos a una molécula de glucosa en forma de β -glucósidos. Esto implica, para el caso de los compuestos aromáticos volátiles, no estar en ese estado aún [Cordonnier and Bayonove \(1974\)](#); [Williams et al. \(1982\)](#).

En el caso de moléculas colorantes como las antocinidinas, la unión a la glucosa se realiza como β -D-glucopiranosidos, dando como resultado la estabilización de la molécula colorante. La hidrólisis de las antocianidinas glicosiladas resultará en una disminución en la estabilidad de éstas moléculas, provocando pérdida en intensidad colorante [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#).

En cuanto a los precursores de compuestos aromáticos, su hidrólisis determinará la tipicidad de ciertas variedades como los Moscateles [Ribereau-Gayon et al. \(1975\)](#); [Bayonove and Cordonnier \(1971\)](#), Cabernet sauvignon y Merlot [Francis et al. \(1998a\)](#) y algunas variedades de origen italiano [Nicolini et al. \(1994\)](#). Los enlaces glicosídicos β -(1-4) son característicos de los precursores de aromas que están presentes en los mostos de uva y resultan ser los de ruptura más frecuente por parte de las levaduras [Arévalo et al. \(2007\)](#). Los precursores más importantes ligados a moléculas de azúcar son terpenoles, C13-norisoprenoides y los precursores no volátiles de tioles volátiles conjugados a cisteína o glutatión [Padilla et al. \(2016\)](#). Comercialmente se ofrecen preparados con enzimas producidas por hongos o bacterias para el procesamiento de los vinos. Al ser formulados a partir de enzimas exógenas no son específicos, por lo tanto pueden generar efectos secundarios que vayan en contra de la composición sensorial de los vinos, como la producción de metanol u oxidación de compuestos fenólicos, además de no ser tan eficientes por no estar esas enzimas adaptadas a las condiciones de los mostos [Mostert \(2013\)](#).

En el jugo de uva, la actividad β -glucosidasa es casi nula debido al bajo pH y la presencia de glucosa, ambos inhibidores de ésta actividad. [Ayran et al. \(1987\)](#); [Williams \(1993\)](#); [Günata et al. \(1990\)](#); [Lecas et al. \(1991\)](#); [Günata et al. \(1998\)](#).

Varias levaduras no-*Saccharomyces* han demostrado poseer actividad β -glucosidasa aunque con gran inhibición frente a la concentración de glucosa [Vasserot et al. \(1989\)](#); [Gueguen et al. \(1995\)](#); [Charoenchai et al. \(1997\)](#). En la revisión realizada por [Padilla et al. \(2016\)](#) se enumeran las levaduras hasta ahora reportadas con actividad glucosidasa comprobada entre las que se encuentran *Debaryomyces* y *Candida* [Rosi et al. \(1994\)](#); [Gueguen et al. \(1996\)](#); [Yanai and Sato \(1999\)](#), *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeck-*

ra, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* [Ferreira et al. \(2001\)](#); [Pérez et al. \(2011\)](#); e *Issatchenkia* [González-Pombo et al. \(2011\)](#). Para éste ultimo caso en particular se purifico e inmovilizó una enzima extracelular β -glucosidasa (en Eupergit C) que resultó ser activa en presencia de glucosa (100g/L), etanol (18%), metabisulfito (60 mg/L), y estable a pH 3.0. La enzima inmovilizada fue utilizada en vinificaciones con Muscat. Los compuestos aromáticos liberados fueron analizados por GC-MS, y se observó un aumento significativo en el contenido de monoterpenos y norisoprenoides libres [González-Pombo et al. \(2011\)](#).

Recientemente se reporto actividad β -glucosidasa positiva en levaduras *W. anomalus* y *S. ludwigii* [López et al. \(2015\)](#).

Pectinasas

Los polisacaridos estructurales interfieren en el proceso de clarificado, en la estabilización y filtrado de vinos y mostos. La pectina en particular entelece el proceso de clarificación, por lo tanto, la actividad de enzimas que puedan hidrolizar pectinas a fragmentos mas solubles favorecerá este proceso, acelerándolo [Mostert \(2013\)](#); [Bautista-Ortín et al. \(2005\)](#).

El agregado de preparados de enzimas comerciales durante la maceración es una practica enológica habitual. Las enzimas disponibles, son preparaciones llamadas pectinasas, que contienen principalmente poligalacturonasas, pectinesterasas y pectinliasas, con el agregado de pequeñas cantidades de celulasas y hemicelulasas con la finalidad de lograr una completa ruptura de las células y mejorar así la extracción de color de los granos de uva [Romero-Cascales et al. \(2012\)](#). Estos preparados tienen la desventaja de incrementar los costos de producción [Varela \(2016\)](#). Las enzimas pectinasas son producidas principalmente por hongos filamentosos [Kashyap et al. \(2001\)](#) que atacan las células de las bayas, pero a su vez secretan otras enzimas que pueden resultar indeseables para la industria vitivinícola [Whitaker \(1984\)](#).

Dentro de la flora nativa de la vid se han podido identificar levaduras capaces de producir este tipo de enzimas (*Brettanomyces clausenii*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Candida oleophila*, *C. stellata*, *H. uvarum*, *M. pulcherrima*) [Jolly et al. \(2006\)](#). Mas recientemente se han reportado *Cryptococcus saitoi*, *Rhodotorula dairenensis* y *Aureobasidium pullulans* [Padilla et al. \(2016\)](#).

Aporte a la complejidad aromática

Como se explicó anteriormente, no solo se forma etanol durante la fermentación alcohólica. Como productos del metabolismo secundario de las levaduras se producen una variedad de metabolitos (ver Figura 2.6) como 2,3-butanediol, etanal, acetoina, ácidos acético, láctico y succínico [Swiegers et al. \(2005, 2016\)](#). Estos compuestos pueden derivar en otros con característica aromáticas con diferente funcionalidad, como alcoholes, ácidos grasos y sus ésteres, compuestos azufrados, lactonas, compuestos carbonílicos, nitrogenados y fenoles volátiles. Todos estos compuestos formaran parte de lo que se conoce como el fenotipo del sabor. Actualmente existen mas de 1300 compuestos volátiles que pueden determinarse en un vino [Cordente et al. \(2012\)](#). En la primera parte de éste capítulo se realizó un análisis de los diferentes compuestos aromáticos y su importancia en el “flavor” de los vinos. A continuación se presentan algunos ejemplos de lo que se conoce hasta ahora del aporte de este tipo de levaduras a la composición aromática de los vinos.

C. zemplinina, en cultivos mixtos con *S. cerevisiae*, incrementa significativamente la concentración de terpenos durante la vinificación, mientras que disminuye la concentración de aldehidos y ésteres de acetatos [Sadoudi et al. \(2012\)](#). Por otro lado, puede reducir el ácido acético producido por *S. cerevisiae* durante vinificaciones de vinos dulces [Rantsiou et al. \(2012\)](#).

Los estudios realizados con *M. pulcherrima* muestran que produce altas concentraciones de terpenos y tioles volátiles [Jolly et al. \(2013\)](#), así como de ésteres [Bisson and Kunkee \(1991\)](#), específicamente octanoato de etilo (asociado al descriptor pera) [Lambrechts and Pretorius \(2000\)](#); [Clemente-Jimenez et al. \(2005\)](#).

Para la especie *Pichia fermentans*, se reportó la producción de alcohol β -feniletílico, el cuál confiere notas a rosa, características en vinos jóvenes. Para ésta levadura se observó que la producción de este compuesto aumenta a mayor biomasa durante la fase inicial de la fermentación, alcanzando el máximo de la producción luego de las 16 horas de comenzada la fermentación alcohólica [Huang et al. \(2001\)](#). Esta especie de levaduras también fue estudiada en cultivos mixtos con *S. cerevisiae*, donde se encontró un aumento de algunos compuestos aromáticos tales como acetaldehído, acetato de etilo, 1-propanol, n-butanol, 1-hexanol, caprilato de etilo, 2,3-butanodiol y glicerol [Clemente-](#)

[Jimenez et al. \(2005\)](#).

El acetato β -feniletílico, compuesto importante por su aporte en cuanto a notas florales y frutales, ha sido estudiado y se ha reportado una gran producción del mismo por parte de levaduras del genero *Hanseniaspora* [Viana et al. \(2008\)](#), *H. vineae* se ha destacado por la producción de este compuesto [Viana et al. \(2011\)](#); [Medina et al. \(2013\)](#), así como *H. osmophila* y *H. guilliermondii* [Rojas et al. \(2003\)](#); [Viana et al. \(2008\)](#).

En cultivos mixtos realizados con *Issatchenkia orientalis* y *S. cerevisiae*, se observó una disminución en el contenido de ácido málico [Kim et al. \(2008\)](#), al mismo tiempo que se observó una reducción en el acetaldehído, propanol, 2-butanol y alcohol isomálico [Kim et al. \(2008\)](#).

Una levadura descubierta recientemente, *Kazachstania gamospora*, se destacó por su alta producción de ésteres frente a un control con *S. cerevisiae* [Padilla et al. \(2016\)](#).

Compuestos que influyen en la estructura del vino

El aroma y el sabor no son las únicas características que influyen en la percepción sensorial de los vinos. Hay compuestos que al estar presentes en el vino ayudan a aumentar el volumen y la estructura en boca. De éstos compuestos los que tienen mayor influencia son el glicerol y los polisacaridos.

Glicerol

Desde el punto de vista sensorial, el glicerol confiere a los vinos sabor dulce. Debido a la viscosidad de éste compuesto, su presencia aumenta el cuerpo de los vinos generando la sensación de untuosidad y suavidad en boca. Como se menciono previamente en éste capitulo, en vinos suelen encontrarse en concentraciones que rondan los 5 y 8 g/L [Scanes et al. \(1998\)](#) aunque en determinadas condiciones puede alcanzar los 15-20 g/L. La formación de éste compuesto dependerá de la concentración inicial de azucares en el mosto, de la temperatura de la fermentación, de la concentración de ácido pantoténico, de la cepa de levadura y, de la concentración de células en el medio [Suárez-Lepe and Morata \(2012\)](#). Este último punto coincide con lo presentado en los resultados de esta Tesis donde la cepa de *H. vineae* que produjo mayor concentración de glicerol fue la que presentó un conteo superior de células en el medio. Hasta el mo-

mento las cepas que se han reportado por la destacada producción de glicerol son *S. uvarum* Favale et al. (2007) y *S. kudriazevii* la cual alcanza su óptimo de producción a temperaturas más bajas y alta concentración de azúcares Arroyo-López et al. (2010). Dentro de las levaduras no-*Saccharomyces* se ha reportado que las especies *Candida stellata* y *Candida zemplinina* se caracterizan por producir cantidades elevadas de glicerol Ciani and Picciotti (1995); Soden et al. (2000); Comitini et al. (2011a). En algunos casos se ha llegado a reportar cantidades superiores a los 14 g/L Ciani and Picciotti (1995); Ciani and Maccarelli (1998), superando ampliamente los 8 g/L promedio que se suele encontrar en vinos Scanes et al. (1998). En el trabajo realizado por Clemente-Jimenez et al. (2005) estudiaron el comportamiento en fermentaciones mixtas con *Pichia fermentans* obteniendo también una mayor producción de glicerol. Una cepa *Starmerella bombicola* fue reportada por Ciani and Comitini (2011) por producir grandes concentraciones de glicerol. Finalmente en el trabajo realizado en el Laboratorio de Enología, Medina et al. (2013) observaron que mediante fermentaciones mixtas con *H. vineae* y *S. cerevisiae* se obtenía una mayor producción de glicerol que en fermentaciones llevadas a cabo solamente con la levadura *Saccharomyces*.

Polisacáridos

Las levaduras son la segunda fuente de polisacáridos del vino, los polisacáridos son componentes de la pared celular y pueden ser liberados al medio durante la fermentación alcohólica o luego de finalizada la misma. Las manoproteínas son el principal polisacárido encontrado en la pared celular. Las mismas están compuestas por manosa en un 80-95 % y el resto por proteínas. En la **Figura 2.7** se puede ver una representación esquemática de la conformación de la pared celular.

La liberación de estos compuestos se da normalmente durante el proceso celular conocido como autólisis, que ocurre durante la crianza de los vinos sobre las borras Alexandre et al. (2001); Alexandre and Guilloux-Benatier (2006); Escot et al. (2001); Giovani and Rosi (2007). El impacto de la liberación de éstos compuestos durante el proceso de autólisis ha sido estudiado, principalmente por su influencia en la calidad de vinos espumosos Feuillat and Charpentier (1982); Lubbers et al. (1994a,b); Alexandre and Guilloux-Benatier (2006) Martí-Raga et al. (2016). Se ha observado que la presencia de polisa-

caridos aumenta la persistencia aromática en nariz, incrementa el volumen en boca, aumentan la estabilidad polifenólica y del color de los vinos, disminuye la astringencia [Escot et al. \(2001\)](#) [Dupin et al. \(2000\)](#), promueve la fermentación maloláctica [Rosi et al. \(1999\)](#) y aumenta la estabilidad tartárica y proteica [Dupin et al. \(2000\)](#).

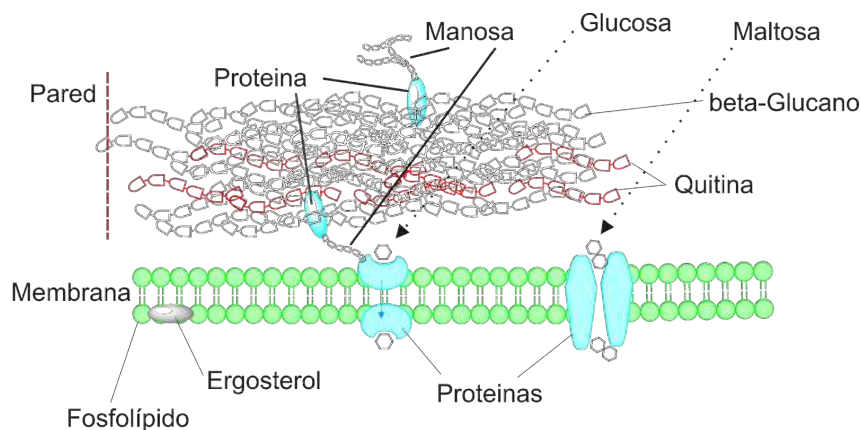


Figura 2.7: Esquema representativo de la conformación de la pared celular

Las levaduras no-*Saccharomyces* han sido reportadas como capaces de afectar la concentración de polisacáridos en el vino, produciendo aumento en la concentración de los mismos [Giovani et al. \(2012\)](#).

P. fermentans en fermentación mixta junto con *S. cerevisiae* mostró una mayor liberación de éstos compuestos [Domizio et al. \(2011\)](#).

En los resultados de esta Tesis se muestra como ciertas cepas de la especie *H. vineae* liberan una concentración superior de polisacáridos al medio a la obtenida con *S. cerevisiae*.

2.3.5. Dinámica poblacional durante la fermentación

Se han realizado diversos estudios con el fin de comprender e identificar la diversa dinámica poblacional que se da durante las primeras etapas de la fermentación en los casos en que esta sucede de manera espontánea o previo a la inoculación con una levadura *S. cerevisiae* comercial [Torija et al. \(2001\)](#); [Cocolin et al. \(2001\)](#); [Beltran et al. \(2002\)](#); [Combina et al. \(2005\)](#); [Zott et al. \(2008, 2010\)](#); [Ciani and Comitini \(2011\)](#). Como se mencionó anteriormente, las uvas entran a la bodega con una carga importante de levaduras nativas, no-*Saccharomyces*, por lo que si no se inocula desde un primer momento con

una levadura *Saccharomyces*, la fermentación comenzará mediante la actividad de otras levaduras. Esto implica que no sea una única levadura la responsable de llevar a cabo la fermentación, sino una sucesión de diferentes especies a lo largo del proceso. La variabilidad de especies que componen la flora nativa de la vid durante las primeras etapas de la fermentación podría explicarse por la diversidad de factores por la que se ve afectada, que como se presento a lo largo de este capítulo va desde las condiciones climáticas, pasando por prácticas de manejo de viñedo, aplicación de pesticidas, sanidad y modo de recolección de las uvas, a la composición química de las mismas.

En los primeros años la identificación de éstas levaduras se realizaba mediante métodos basados en sus características morfológicas, sexuales y bioquímicas Fleet (1993); Kurtzman et al. (2011a), pero éstos resultados estaban sujetos a las condiciones del cultivo, por lo que la identificación obtenida era poco precisa Yamamoto et al. (1991). Con el correr de los años se han adoptado técnicas de identificación moleculares (descritas anteriormente), desarrolladas específicamente para la identificación de especies y cepas de levaduras. La aplicación de estas técnicas ha demostrado que hay una amplia diversidad genética entre especies y cepas vínicas de *S. cerevisiae* Querol et al. (1992); Versavaud et al. (1993); Quesada and Cenis (1995a); Jubany et al. (2008) y de no-*Saccharomyces* Hierro et al. (2006a,b); Andorrà et al. (2010, 2011); Barquet et al. (2012).

Mediante la utilización de éstas técnicas se han podido identificar las levaduras presentes durante las distintas etapas de la fermentación, ya que la población va cambiando a medida que se van modificando las condiciones del medio como consecuencia natural del proceso de fermentación.

Parte de los estudios realizados hasta ahora han podido demostrar que durante la fermentación alcohólica, los géneros de levaduras no-*Saccharomyces* que se encuentran con mayor frecuencias son generalmente *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Metschnikowia* y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula* y Querol et al. (1990); Longo et al. (1991); Fleet (1993); Schutz and Gafner (1994). Las levaduras hasta ahora reportadas por presentar una mayor tolerancia al etanol y por lo tanto, se mantienen mejor durante la fermentación y son *Candida stellata* Combina et al. (2005), *Zygosaccharomyces bailii* Peynaud and Domercq (1959), *Pichia* Bisson and Kunkel (1991), *H.*

guillermondii Pina et al. (2004b) y *Torulaspota* Bely et al. (2008).

En los resultados presentados en esta Tesis y en el artículo publicado por Lleixa et al. (2016), se puede apreciar como una cepa de *H. vineae* utilizada en fermentaciones en bodega logra predominar hasta la mitad de la fermentación, disminuyendo su población a partir de ese punto, pero logrando permanecer hasta el final de la misma.

Uso de no-*Saccharomyces* a nivel comercial

Algunas levaduras no-*Saccharomyces* han sido producidas a nivel industrial para su comercialización.

T. delbrueckii es hasta ahora la levadura no-*Saccharomyces* más estudiada y la que presenta mayor capacidad fermentativa y producción de bajos niveles de acidez volátil y acetaldehído Bely et al. (2008). También se ha demostrado que *T. delbrueckii*, en cultivos puros, produce niveles de acidez volátil inferiores a los producidos por las levaduras *Saccharomyces* Moreno et al. (1991); Bely et al. (2008); Renault et al. (2009). Esto ha hecho que sea utilizada en cultivos mixtos con *Saccharomyces* Languet et al. (2005); Bely et al. (2008); Renault et al. (2009), y en la producción de vinos a partir de mostos con contenidos elevados de azúcar derivados de uvas botritizadas de cosecha tardía Bely et al. (2008). Seguramente debido a esas características, es una de las primeras levaduras no-*Saccharomyces* en ser comercializada. Ya desde el año 1955 es utilizada para la producción de vinos comerciales tintos y rosados en Italia Jolly et al. (2013) y desde el 2003 existen cepas de *Torulaspota* en el mercado internacional de insumos enológicos (comercializadas bajo la marca Viniflora®) en un mix junto con *S. cerevisiae* y *K. thermotolerans*. Actualmente la especie *T. delbrueckii* se comercializa individualmente, es la que presenta la mayor disponibilidad a nivel de levaduras secas activas no-*Saccharomyces* comerciales Gonzalez et al. (2012). Es comercializada por Lallemand desde el año 2012 y por Laffort desde el 2013.

M. pulcherrima también está disponible a nivel comercial desde el año 2012 (distribuida por la empresa Lallemand). Esta cepa comercial se caracteriza por la producción de la enzima extracelular α -arabinofuranosidasa, que potencia la producción de tioles y terpenos volátiles Jolly et al. (2013).

P. kluyveri se distribuye a nivel comercial (por el laboratorio Hansen). Esta levadura es recomendada para su utilización en vinificaciones de las variedades

Riesling, Sauvignon Blanc y Chardonnay. Difiere de la presentación comercial de otras levaduras secas activas, ya que se encuentra congelada a -45°C y se usa directamente sobre el mosto sin necesidad de rehidratación previa [Jolly et al. \(2013\)](#).

Existe un preparado comercial (comercializado por Viniflora[®]) conformado por *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae*. Este blend es recomendado para potenciar aroma y sabor en vinos blancos (Chardonnay, Pinot Blanc, Pinot Gris y Riesling) y para vinos tintos (Cabernet Sauvignon, Merlot, Sirah y Pinot Noire). El preparado recomienda inocular de manera simultanea para potenciar aromas florales y a frutas tropicales en vinos blancos y lograr un sabor mas complejo y redondo en vinos tintos. Ensayos realizados con este preparado mostraron que para Pinot Noire disminuia el descriptor a fruta roja comparados con vinos producidos solamente con *S. cerevisiae*. Desde el 2012, Viniflora[®] comercializa un preparado que contiene solamente la levadura *L. thermotolerans* [Jolly et al. \(2013\)](#).

***Kloeckera/Hanseniaspora* spp**

Como el objeto de estudio de este trabajo de tesis son levaduras de la especie *Hanseniaspora vineae*, se dejaron para el final los comentarios sobre el genero *Hanseniaspora* y se mostrará lo que se sabe hasta ahora sobre la especie *H. vineae* en particular.

Las levaduras del genero *Hanseniaspora* son ascomicetes que se caracterizan por su gemación bipolar, lo que le confiere su típica forma apiculada al microscopio. Este género se incluye dentro de las levaduras denominadas como no-*Saccharomyces*. Estas levaduras se aíslan frecuentemente durante las primeras etapas de la fermentación, encontrándose también en la superficie de las uvas, suelo, así como en la bodega, en la maquinaria de cosecha y el procesamiento de estas frutas [Strauss et al. \(2001\)](#); [López et al. \(2015\)](#). *Hanseniaspora* junto con *Torulaspota*, constituyen, de acuerdo a lo reportado hasta el momento, los géneros de levaduras no-*Saccharomyces* que más aportan a la vinificación desde el punto de vista de su contribución a la calidad sensorial de los vinos. Suelen ser las levaduras dominantes en las primeras etapas de la fermentación, tal vez debido a su alta tolerancia a la presión osmótica (superior a los 200 g/L). A medida que avanza el proceso fermentativo van disminuyendo su presencia, producto de su baja capacidad de adaptación a niveles crecientes de etanol [Díaz-Montaño and de Jesús Ramírez Córdova \(2009\)](#). En general muestran una capacidad fermentativa medio/baja (llegando en algunos casos a valores de hasta un 9 % de etanol), pero se consideran de importancia durante la vinificación ya que producen compuestos aromáticos de interés y modifican la composición química de los vinos [Herraiz et al. \(1990\)](#); [Mateo et al. \(1991\)](#); [Zironi et al. \(1993\)](#); [Moreira et al. \(2005\)](#); [Medina et al. \(2013\)](#). Se destacan dos especies por producir cantidades elevadas de acetato β -feniletílico, *H. guilliermondii* [Rojas et al. \(2003\)](#) y *H. vineae* [Viana et al. \(2009, 2011\)](#); [Medina et al. \(2013\)](#); [Martin et al. \(2016b\)](#); [Lleixa et al. \(2016\)](#). Como ya vimos, este éster se asocia a notas aromáticas frutales, florales, (rosa) y miel [Lambrechts and Pretorius \(2000\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#); [Swiegers and Pretorius \(2005\)](#); [Swiegers et al. \(2016\)](#). *H. vineae* y *H. guilliermondii* también se destacaron por producir alcohol β -feniletílico con descriptores similares a lo de su acetato [Moreira et al. \(2005\)](#); [Martin et al. \(2016a,b\)](#). Las levaduras apiculadas se han conocido por ser productoras de acidez volátil elevada, con niveles entre 0,75-2,25 g/L de ácido acético y de acetato de etilo [Ciani and Picciotti \(1995\)](#); [Rojas et al. \(2003\)](#).

Sin embargo, al encontrarse gran variabilidad entre las distintas cepas del género, no en todas se observa el mismo comportamiento, mostrando algunas cepas comportamiento similar al observado para *S. cerevisiae* [Ciani and Maccarelli \(1998\)](#); [Medina et al. \(2013\)](#). *H. uvarum* y *H. guillermondii*, han sido reportadas como productoras de altos niveles de compuestos aromáticos azufrados [Moreira et al. \(2005\)](#). En un estudio realizado recientemente con *H. vineae* nativa del Uruguay, se observó un incremento importante de los ésteres de acetato y de algunos ésteres etílicos, y disminución en algunos de los alcoholes superiores (alcohol β -feniletílico, 1,3-propandiol, 3-metil-1-propanol y tirosol), ácido isovalérico y en ácidos grasos de cadena media. Se observó además que el aroma de muchos de estos compuestos aumenta con la inoculación mixta de *Saccharomyces* (co-fermentación), obteniéndose un aumento de notas frutales (banana, pera, manzana, frutas cítricas), pasto cortado y un descenso en los descriptores relacionados con tierra húmeda [Medina et al. \(2013\)](#). Al mismo tiempo, estos vinos co-fermentados presentaron más cuerpo y mayor complejidad aromática en boca, ocasionado probablemente por una mayor presencia de compuestos C10 [Ravaglia and Delfini \(1994\)](#), sugiriendo así la existencia de una tasa de autólisis relativamente más rápida.

Para la especie *H. vineae* en particular, lo reportado hasta ahora es que presenta actividad enzimática [Pérez et al. \(2011\)](#); [López et al. \(2015\)](#), se destaca por la alta producción de compuestos aromáticos deseables [Viana et al. \(2011\)](#); [Carrau et al. \(2012\)](#); [Medina et al. \(2013\)](#); [Lleixa et al. \(2016\)](#) que mejoran la calidad organoléptica de los vinos producidos a escala industrial. A su vez, en los trabajos realizados por [Medina et al. \(2007, 2013\)](#); [Medina \(2014\)](#) se observó el aporte estas levaduras sobre la composición polifenólica y al color de los vinos tintos.

Finalmente, como parte de los resultados de esta Tesis [Martin et al. \(2016b\)](#) y a partir de la secuenciación y posterior análisis de los genes presentes en *H. vineae* [Giorello et al. \(2014\)](#) se propuso la vía del mandelato para la transformación de ácidos no-cinámicos a bencenoides.

Capítulo 3

Metodología

3.1. Caracterización de levaduras

3.1.1. Aislamiento de microorganismos

Las once cepas de la especie *Hanseniaspora vineae* a estudiar pertenecen a la colección de levaduras del laboratorio del Área Enología y Biotecnología de las Fermentaciones de Facultad de Química. Fueron aisladas en diferentes años y de distintas variedades de uvas por el equipo del Laboratorio de Enología. En la Tabla 3.1 se ve el detalle de cada levadura.

Tabla 3.1: Cepas de *H. vineae* a estudiar

Codigo	Genero	Año	Variedad	Especie
T02_05F	no- <i>Saccharomyces</i>	2002	Tannat	<i>Hanseniaspora vineae</i>
T02_19F	no- <i>Saccharomyces</i>	2002	Tannat	<i>Hanseniaspora vineae</i>
T02_25F	no- <i>Saccharomyces</i>	2002	Tannat	<i>Hanseniaspora vineae</i>
TE11_24F	no- <i>Saccharomyces</i>	2011	Tempranillo	<i>Hanseniaspora vineae</i>
TE11_48F	no- <i>Saccharomyces</i>	2011	Tempranillo	<i>Hanseniaspora vineae</i>
M12_111F	no- <i>Saccharomyces</i>	2012	Merlot	<i>Hanseniaspora vineae</i>
T12_151F	no- <i>Saccharomyces</i>	2012	Tannat	<i>Hanseniaspora vineae</i>
M12_184F	no- <i>Saccharomyces</i>	2012	Merlot	<i>Hanseniaspora vineae</i>
M12_196F	no- <i>Saccharomyces</i>	2012	Merlot	<i>Hanseniaspora vineae</i>
C12_213F	no- <i>Saccharomyces</i>	2012	C. Sauvignon	<i>Hanseniaspora vineae</i>
C12_219F	no- <i>Saccharomyces</i>	2012	C. Sauvignon	<i>Hanseniaspora vineae</i>

Fueron codificadas de forma tal que las primeras letras representan la variedad de uva donde fue aislado el microorganismo (En la **Tabla 3.2** se detalla la codificación de letra asignada a cada variedad), seguido por el número del

año de aislamiento; luego un número secuencial para identificarlo dentro de cada año y finalmente una letra que representa de donde fue aislado, si de uva (G por su nombre en inglés, Grape) o si proviene de una fermentación (F). En esta tesis las levaduras fueron aisladas durante el proceso de fermentación por lo que solo aparece la F en la codificación de las cepas. Así, por ejemplo, T02.01G se refiere a una levadura aislada de uvas de la variedad Tannat en el año 2002, es el primer aislamiento de ese año y fue aislada de uva.

Tabla 3.2: Letra asignada a cada variedad de uva para la codificación de las levaduras

Variedad	Letra Asignada
Merlot	M
Tannat	T
Cabernet Sauvignon	C
Tempranillo	TE
Cabernet Franc	CF
Pinot Noir	PN
Petit Verdot	PV
Arinarnoa	A
Sauvignon Blanc	SB
Chardonnay	CH
Chavanasco	CHV
Moscatel Miel	MM

Así, del total de aislamientos, tres fueron realizados en el año 2002, a partir de la variedad de uva Tannat. Dos se realizaron en la vendimia del año 2011 de la variedad de uva Tempranillo y los últimos seis corresponden a aislamientos realizados en el año 2012 procedentes de las variedades de uva Tannat, Merlot y Cabernet Sauvignon. Finalmente, todas las levaduras fueron obtenidas durante el proceso de fermentación y no directamente de uva.

3.1.2. Identificación molecular

Se diferenciaron las levaduras a nivel de cepa para confirmar que cada levadura con la que se iba a trabajar fuera un individuo diferente dentro de la especie *H. vineae*. Para dicha caracterización se utilizó la metodología descrita por Barquet et al. (2012). Los primers (y sus secuencias) utilizados para la identificación mediante el análisis de tRNAPCR fueron los siguientes: TtRNASc (GCTTCTATGGCCAAGTTG), ISSR-MB (CTCACAACAACAACAACA) y

5CAG (CAGCAGCAGCAGCAG). Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en un equipo Thermo PXE 0.2 combinando los primers TtRNASc ya sea con el primer ISSR-MB o 5CAG. El mix de reacción de PCR estaba compuesto por: 5 μ L de ADN genómico (10–20 ng), 1 μ M de cada primer, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, 5 μ L 10X buffer de Taq y 1 unidad de ADN Taq polimerasa en un volumen final de reacción de 50 μ L. Las amplificaciones se realizaron de la siguiente manera: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 50°C, 90 segundos a 75°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron separados a bajo voltaje (50V) en un gel de 1,8% o 2% de agarosa. Las amplificaciones realizadas a partir de aislamientos de ADN de experimentos independientes dieron siempre el mismo perfil. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado con aislamientos independientes de ADN.

Análisis de clusters

Los patrones de bandas obtenidos se analizaron con el programa GelCompare versión 4.2 (Applied Maths BVBA, Belgica), usando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average, Método no ponderado de grupo con media aritmética), clustering de bandas y el coeficiente de Jaccard.

3.1.3. Caracterización de actividad enzimática extracelular

Proteasa

Para determinar la actividad proteasa se prepararon placas con medio Skim Milk a pH6 (optimo para la actividad enzimática) y pH 4,5 (similar al mosto de uva) según [Mostert \(2013\)](#). A 70 mL de buffer citrato fosfato 0.05M (44.2 mL fosfato disódico en 25.8 mL de ácido cítrico 0.1M) se le agregó Skim Milk (Difco) a una concentración final de 100 g/L y se disolvió en el buffer. A la solución de Skim Milk se le agregaron 60 mL de buffer fosfato y se calentó, pero sin llegar a hervir. Aparte se preparo un medio mínimo, estéril, conteniendo 4.8 g de glucosa, 3.36 g YNB (yeast nitrogen base) sin aminoácidos y 9.6 g de agar bacteriológico en 480 mL de agua destilada; Luego se agregó a la solución de Skim Milk. El pH fue ajustado usando ácido clorhídrico 6N y se vertió en placas de Petri (20 mL por placa). Como control positivo se usó una levadura de la especie *Metschnikowia pulcherrima* perteneciente a la colección

de levaduras del laboratorio de Enología y Enología de las Fermentaciones de Facultad de Química. Cada levadura fue sembrada por duplicado. Las placas fueron incubadas a 30°C por 5 días para observar la actividad enzimática. La formación de un halo translucido alrededor de las colonias fue considerado como actividad proteasa positiva.

β – glucosidasa

El ensayo se llevó a cabo en placas de agar con esculina como sustrato (EGA) a pH 6 y pH 4,5. El medio se prepara con esculina 1 g/L, cloruro férrico 0,3 g/L, hidrolizado de caseína 1 g/L, extracto de levadura 25 g/L, glicerol 8 mL, agar 20 g/L. El preparado se sometió a autoclave a 121°C durante 15 minutos y se vertió en placas de Petri (20 mL por placa). Después de la solidificación, las diferentes cepas de levadura se sembraron de forma radial por duplicado luego de haber sido cultivadas durante 48 horas en medio agar lisina (Difco). Cada placa se inoculó con cuatro cultivos, se incubaron a 25°C y se examinaron luego de un período de entre 5 y 7 días. Una placa no inoculada sirvió como control de la inocuidad del medio y una cepa de *Metschnikowia pulcherrima* como control positivo. En caso de presentar actividad β -glucosidasa positiva la esculina es hidrolizada por la enzima y reacciona con el cloruro férrico del medio formando un precipitado marrón oscuro en el agar, (ver **Figura 3.1**), el diámetro del halo formado por el precipitado fue medido en milímetros [Pérez et al. \(2011\)](#).



Figura 3.1: Placa con medio EGA donde se evidencia actividad enzimática β -glucosidasa extracelular positiva

Pectinasa

La actividad pectinasa se determinó según en el método de [McKay \(1988\)](#) con modificaciones [Strauss et al. \(2001\)](#). Las levaduras se repicaron en medio

agar poligalacturonato a pH6 y pH 4,5, conteniendo 1.25 % de ácido poligalacturónico, 0.68 % de fosfato de potasio, 0.67 % de base de nitrógeno para levaduras (YNB, Difco), 1 % de glucosa y 2 % de agar. Luego de preparado el medio se vertió en placas de Petri (20 mL por placa). Cada levadura fue sembrada por duplicado. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 30°C. Se enjuagaron las colonias con agua destilada y luego teñidas con 0.1 % de rojo de rutenio. Las colonias se consideraran pectinasa positiva por aparición de un halo purpura alrededor de la colonia.

3.1.4. Microvinificaciones

Medio artificial símil mosto

Se realizaron microvinificaciones en el laboratorio para cada cepa de *H. vineae*. Como modelo de levadura industrial se utilizó la *S. cerevisiae* Montrachet UCD 522 (Universidad de California, Davis), por triplicado en un medio símil mosto químicamente definido [Henschke and Jiranek \(1993\)](#) y modificado por [Carrau \(2003\)](#) (asemeja la composición de nutrientes de la uva pero evitando los metabolitos secundarios de la misma). Para los fines de esta tesis la concentración de nitrógeno asimilable (YAN, suma de los aminoácidos y el amonio sin prolina) utilizada fue de 100 mgN/L a partir de los siguientes compuestos nitrogenados (expresados en mg/L): fosfato de amonio (60.3), fenilalanina (18.1), triptofano (12.1), tirosina (2.4), leucina (36.2), arginina (90.4), ácido aspártico (42.2), glutamato (60.3), serina (48.2), treonina (42.2), lisina (30.1), glutamina (24.1), isoleucina (24.1), valina (24.1), histidina (18.1), asparagina (18.1), metionina (18.1), prolina (60.3), alanina (12.1), y glicina (6). Este medio contiene 0.2 mg/L p-ABA, y el pH final fue ajustado a 3.5 con HCl. La concentración total de azúcares del mosto fue de 200 g/L en partes iguales de glucosa y fructosa, y el mix de sales y vitaminas fue descrito previamente por [Henschke and Jiranek \(1993\)](#). Como suplemento lipídico se agregó ergosterol a una concentración final de 10 mg/L.

Condiciones de fermentación

Las fermentaciones fueron conducidas en matraces Erlenmeyer de 125 mL, estériles. Se utilizó un volumen de mosto de 60 mL y se utilizaron tapones de algodón recubiertos con papel de aluminio (**Figura 3.2**). Las fermentaciones se

condujeron semi-anaeróbicamente a 20°C, con una agitación diaria (con el fin de desprender la biomasa precipitada en el fondo del recipiente) previo a pesar los matraces. La actividad fermentativa se determinó mediante la pérdida de peso debida a la producción y posterior liberación de CO₂, como producto de la fermentación alcohólica. La cantidad de gramos de CO₂ producidos se utilizó para determinar la capacidad fermentativa de cada cepa. La fermentación alcohólica se consideró finalizada cuando se verificó, por constancia de peso, el cese de la liberación de CO₂. Al finalizar, a cada fermentación se le midió el pH y se filtró en membrana de 0,45 μm y los filtrados se guardaron en recipientes estériles color ámbar, se les añadieron 50 *mg/L* de anhídrido sulfuroso para prevenir alguna posible contaminación previo a realizar los análisis posteriores a la fermentación. Durante las microvinificaciones se realizó el seguimiento de la viabilidad celular mediante tinción con azul de bromotimol, que permite diferenciar entre levaduras vivas y muertas. Las muertas se tiñen de azul, ya que puede pasar la tinción a través de la membrana celular. Finalmente se realizó el recuento de levaduras en cámara de Neubauer.



Figura 3.2: Erlenmeyers para fermentación semi-anaerobia con tapones de algodón y aluminio

Inoculación

Previo a inocular las microvinificaciones se preparó un preinóculo de cada cepa. Doce horas antes, en matraces con 10 mL del medio similar mosto preparado para las microvinificaciones, se inocularon las diferentes levaduras provenientes de repiques conservados a - 80°C. Los matraces fueron incubados a 25°C con agitación de 100 RPM. Esto permitió obtener un cultivo fresco, con población microbiana suficiente y en etapa exponencial de crecimiento para

poder sembrar las microvinificaciones. Finalmente se utilizo un inoculo inicial de $1 \times 10^5 \text{ cel/mL}$ [Carrau et al. \(2010\)](#) para todos los cultivos.

3.1.5. Producción de glicerol

Se determinó la producción de glicerol de cada cepa de levadura durante la fermentación. La determinación se realizo mediante kit enzimático comercial (EnzytecTM Glycerol. R-Biopharm) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.6. Resistencia al SO₂

La tolerancia a sulfitos se determino mediante una adaptación del protocolo descrito por [Mauriello et al. \(2009\)](#), substituyendo el mosto de uva agarizado por mosto sintético líquido (descrito en la subsección Microvinificaciones) en el cual se añadieron diferentes concentraciones de metabisulfito potásico $K_2S_2O_5$ liberando SO₂ en las concentraciones 0 (control), 50, 75 y 100 mg/L. Se inocularon 15 µL de cada cepa (OD a 640nm igual = 1) y 135 µL de mosto (200 g/L azúcar) en cada una de las concentraciones de SO₂, por triplicado, hasta alcanzar una densidad óptica (OD 640 nm) de 0,1. Se utilizo la levadura comercial *S. cerevisiae* Lalvin QA23 (Lallemand®) como control. La OD se midió luego de 24 hs a 27°C, mediante lector de microplacas (Omega PolarStar, BMG Labtech).

3.1.7. Determinación de polisacáridos

Se hizo la determinación de polisacáridos liberados por cada cepa de *H. vineae* en diferentes momentos de la fermentación (día 5 y día 10) correspondientes a la mitad y final de la misma. Se realizaron fermentaciones en medio símil mosto (descrito previamente en la subsección microvinificaciones) a 25°C con una agitación diaria. De esta manera se determina si hay liberación de polisacaridos durante el proceso de fermentativo, producto de una autólisis temprana.

Extracción de polisacáridos

El contenido de polisacáridos en las muestras se determinó de acuerdo con el protocolo descrito por [Fanzone et al. \(2012\)](#). 10 mL de muestra se centrifugó

garon (20 min a 8.500 rpm) y el sobrenadante se concentró hasta un volumen final de 2 mL empleando un evaporador de baja presión (UNIVAPO 100ECH equipado con una bomba VACUCENTER 8/8 /-UNIEQUIP). Los polisacáridos solubles totales se precipitaron por adición de 10 mL de etanol acidificado frío (etanol 99 %, HCl 0,3 M) y se mantuvieron durante 24 horas a 4 °C. Luego se centrifugaron las muestras (10 min a 8.500 rpm) y los sedimentos se lavaron con etanol frío para eliminar los materiales de interferencia. Por último, los precipitados se disolvieron en 1 mL de agua ultra pura, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron.

Determinación de polisacáridos por cromatografía de exclusión molecular

Con el fin de cuantificar los polisacáridos obtenidos a partir de las fermentaciones, las fracciones solubles se analizaron por cromatografía de exclusión molecular. Las muestras liofilizadas se resuspendieron en 1 mL de formiato de amonio 30 mM, filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 micras de poro, y se inyectaron 100 μ L en la columna. La cromatografía se realizó utilizando un cromatógrafo líquido Agilent serie 1200 equipado con un detector de índice de refracción GI362A (RID), una bomba cuaternaria G1311A, un horno de columna G1316A y el inyector automático G1329A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). La separación se llevó a cabo a 20°C utilizando dos columnas Shodex OHpak SB-803 HQ y SB-804 HQ conectadas en serie (300 mm x 8 mm I.D.; Showa Denko, Japón). La fase móvil utilizada fue una solución acuosa de formiato de amonio 30 mM aplicada con un flujo constante de 0,6 mL/min durante 60 minutos y la temperatura de la célula de RID fue 35 °C. La distribución del peso molecular de las fracciones de las muestras fue determinada a partir de una calibración con estándares de pululanos y dextranos de diferente peso molecular. Los pesos moleculares aparentes se deducen de la siguiente ecuación de calibración: $\log Mn(kDa) = [(t_R - 43.67) / -4.45] / 1000$ donde t_R = tiempo de retención al máximo del pico, y $R^2 = 0.99$. La cuantificación de polisacáridos se realizó a partir del área del pico de cada fracción, utilizando como referencia soluciones comerciales de estándares externos (pectina y dextrosa) bajo las mismas condiciones que las muestras analizadas en un rango de entre 0 y 2 g/L ($R^2 = 0.99$)

3.1.8. Extracción e identificación de compuestos aromáticos

Se realizó la extracción de compuestos aromáticos de las microvinificaciones, así como la cuantificación e identificación de los mismos, según el procedimiento descrito a continuación.

Extracción de compuestos volátiles

Para la extracción se utilizó el método con cartuchos tipo ISOLUTE® ENV+ puesto a punto por [Carlin \(1998\)](#) y adaptado por [Boido \(2002\)](#), este método permite fraccionar los aromas libres y glicosidados o ligados. Estos cartuchos contienen una resina polimérica del tipo estireno divinilbenceno, que presenta modificaciones en su estructura para transformarla en un soporte adsorbente muy hidrofóbico especialmente derivatizado con la presencia de grupos fenoles. El mecanismo de retención se encuentra mediado por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y formación de dipolos mediante interacciones hidrofóbicas entre la molécula retenida y la superficie de la resina. Durante el proceso de elución del solvente (como metanol) interrumpe estas interacciones hidrofóbicas con la superficie y permite la elución del analito (ver figura 3.3).

En el esquema de la **Figura 3.4** se ve el detalle de la estructura química de la fase utilizada en los cartuchos ISOLUTE® ENV+, que es una estructura básica de poliestireno derivatizado.

Se fraccionaron los compuestos aromáticos libres a partir de 50 mL de muestra de cada microfermentación (según el esquema representado en la **Figura 3.5**), diluidos a 100 mL con el agregado de 0.1 mL de n-heptanol como estándar interno (solución hidroalcohólica al 50% con concentración 0.229 g/L), con cartuchos ISOLUTE® ENV+ (IST Ltd, Mid Glamorgan, UK), con 1 g de de polímero SDVB (estireno divinil benzeno) (40-140mm, cod. N° 915-0100-C)

Previo al pasaje de la muestra, el cartucho se acondicionó eluyendo con 15 mL de metanol, seguido de 20 mL de agua. La fracción libre se eluyó con 30 mL de diclorometano, adaptando un sistema de presión controlada para tener

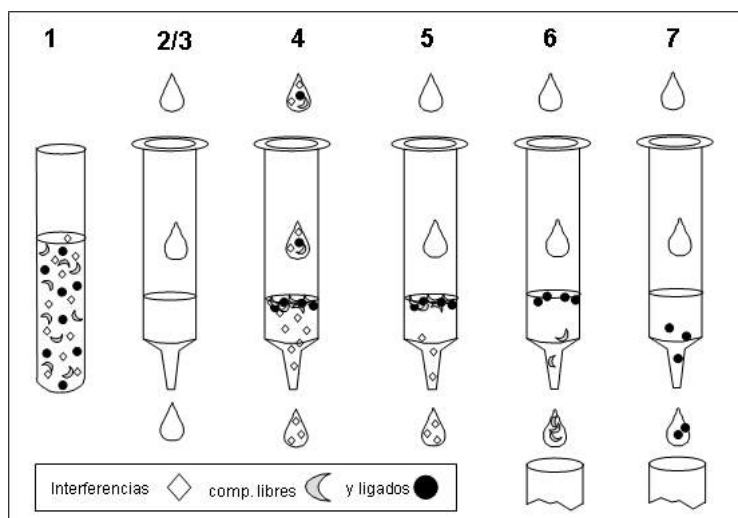


Figura 3.3: Esquema del procedimiento de retención y elución de los distintos compuestos aromáticos del vino para el caso de cartuchos ISOLUTE® ENV+ **1** – Pretratamiento de la muestra. En el caso del vino no es necesario, se utiliza la muestra diluída al medio. **2/3** – La fase ENV+ puede ser usada para el vino sin realizar la etapa de solvatación y equilibrio, sin embargo es recomendable realizar un lavado de la fase con solventes miscibles en agua como el metanol, con lo cual se logra la eliminación de interferencias, debiendo realizar un posterior lavado con agua. **4** – Pasaje de la muestra, 4-5 mL/min. **5** – Elución de interferencias con agua. **6** – Elución de los compuestos volátiles libres con diclorometano, recuperándose para su análisis. **7** – Elución de los compuestos glicosidados con metanol, recuperándose para su análisis.

un flujo de 4-5 mL/min. Se recolectó el solvente orgánico con la fracción libre, se secó con Na_2SO_4 , concentró hasta aproximadamente 3-4 mL en baño termostaticado a 40°C, y previo al análisis cromatográfico, se concentró hasta un volumen aproximado de 0.5 mL mediante corriente de N_2 . Los cartuchos, de acuerdo a los ensayos de recuperación realizados con mezclas modelo, se utilizaron para la extracción de 10 muestras y luego se descartaron.

Identificación de los compuestos aromáticos

La identificación se realizó mediante GC-MS con un gas cromatógrafo Shimadzu GC-17 acoplado con un detector de espectrometría de masa Shimadzu QP 5050. Las condiciones de trabajo fueron: columna capilar de sílica fundida (25 m x 0.25 mm d.i.), fase estacionaria BP 20 (film de 0.25 μm de espesor) (SGE, Australia); programa de temperatura 40°C (6 minutos), 40-180°C a 3

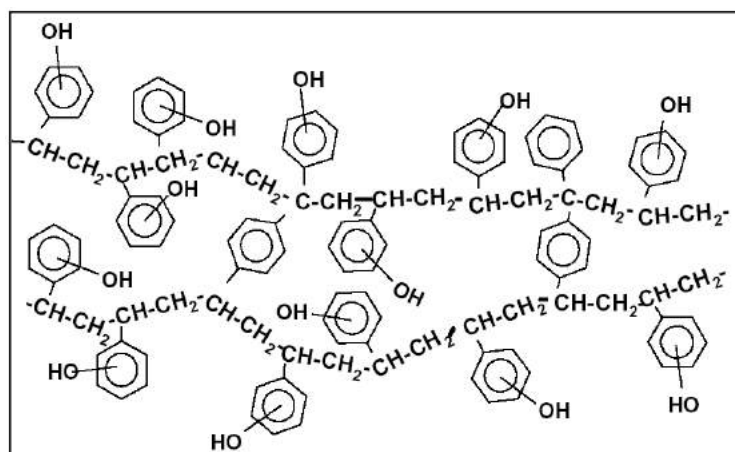


Figura 3.4: Estructura de la fase utilizada en los cartuchos ISOLUTE® ENV+ (Adaptado por [Boido \(2002\)](#))

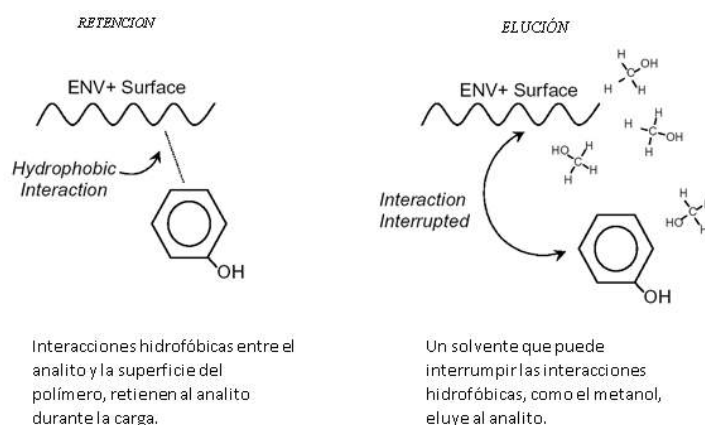


Figura 3.5: Esquema de los mecanismos de retención y elución en el cartucho ISOLUTE® ENV+ (Adaptado por [Boido \(2002\)](#))

°C/minuto, 180-220°C a 10°C/minuto, 220°C (20 minutos); temperatura del inyector, 250 °C; modo de inyección split, relación de split 1:40, volumen de inyección, 1.0 μ L. Gas portador He, 92.6 kPa (59.9 cm/segundo); temperatura de interfase 250 °C; rango de masas 40-400 uma. La identificación se llevo a cabo mediante el uso de bibliotecas de espectros de referencia (Adams, 1995; McLafferty y Stauffer, 1991; Wiley 139) y la biblioteca propia realizada con estándares y datos reportados en la literatura. La identificación de los compuestos se confirmó por medio de la determinación de índices de retención de Kovats, obtenidos mediante la inyección de un estándar del compuesto y la mezcla de n-alcenos.

3.1.9. Evaluación sensorial

La evaluación de aromas fue realizada por el panel de 10 jueces semi entrenados del laboratorio de Enología. Se utilizó la metodología de “marque todo lo que corresponda”. Cada juez analizó las muestras de a una y a medida que las olían debían marcar en una lista (compuesta por 67 descriptores aromáticos típicos de vinos, **Tabla 3.3**) todos los aromas percibidos que consideraban adecuados para describirlas. Con todas las muestras analizadas se determinó la frecuencia de uso de cada descriptor seleccionado para cada muestra y se generó un mapa de los aislamientos mediante análisis de correspondencia [Campo et al. \(2008\)](#). A partir de las coordenadas de las muestras en el análisis de correspondencia se realizó un análisis de cluster para identificar grupos de aislamientos con características similares.

Tabla 3.3: Boleta con los 67 descriptores aromáticos presentada al panel semi entrenado de jueces

Marque todas las palabras que considera adecuadas
para describir al aroma de esta muestra

<input type="checkbox"/>	Pomelo	<input type="checkbox"/>	Damasco	<input type="checkbox"/>	Pasas
<input type="checkbox"/>	Limón	<input type="checkbox"/>	Durazno	<input type="checkbox"/>	Ciruelas secas
<input type="checkbox"/>	Mora	<input type="checkbox"/>	Manzana	<input type="checkbox"/>	Higos
<input type="checkbox"/>	Frambuesa	<input type="checkbox"/>	Ananá	<input type="checkbox"/>	Tallo
<input type="checkbox"/>	Frutilla	<input type="checkbox"/>	Melón	<input type="checkbox"/>	Pasto verde
<input type="checkbox"/>	Cassis (Grosella)	<input type="checkbox"/>	Banana	<input type="checkbox"/>	Morrón verde
<input type="checkbox"/>	Guinda	<input type="checkbox"/>	Merm. de frutilla	<input type="checkbox"/>	Eucaliptus
<input type="checkbox"/>	Menta	<input type="checkbox"/>	Avellanas	<input type="checkbox"/>	Humo
<input type="checkbox"/>	Espárragos	<input type="checkbox"/>	Almendras	<input type="checkbox"/>	Quemado
<input type="checkbox"/>	Aceitunas verdes	<input type="checkbox"/>	Miel	<input type="checkbox"/>	Café
<input type="checkbox"/>	Aceitunas negras	<input type="checkbox"/>	Manteca	<input type="checkbox"/>	Corcho
<input type="checkbox"/>	Té	<input type="checkbox"/>	Chocolate	<input type="checkbox"/>	Hongos
<input type="checkbox"/>	Tabaco	<input type="checkbox"/>	Caramelo	<input type="checkbox"/>	Plástico
<input type="checkbox"/>	Nuez	<input type="checkbox"/>	Vainilla	<input type="checkbox"/>	Solvente
<input type="checkbox"/>	Goma	<input type="checkbox"/>	Ácido acético	<input type="checkbox"/>	Ácido láctico
<input type="checkbox"/>	Repollo cocido	<input type="checkbox"/>	Etanol	<input type="checkbox"/>	Caballo
<input type="checkbox"/>	Fosforo quemado	<input type="checkbox"/>	Jabón	<input type="checkbox"/>	Ratón
<input type="checkbox"/>	SO ₂	<input type="checkbox"/>	Metanol	<input type="checkbox"/>	Terpenico
<input type="checkbox"/>	Perro mojado	<input type="checkbox"/>	Levadura	<input type="checkbox"/>	Azahares
<input type="checkbox"/>	Cartón húmedo	<input type="checkbox"/>	Borra	<input type="checkbox"/>	Rosas
<input type="checkbox"/>	Acetato de etilo	<input type="checkbox"/>	Sudor	<input type="checkbox"/>	Violetas
<input type="checkbox"/>	Gerano				
<input type="checkbox"/>	Clavo de olor				
<input type="checkbox"/>	Pimienta negra				
<input type="checkbox"/>	Anís				

3.1.10. Determinación del tamaño del genoma y ploidía de *H. vineae*

Se realizó el estudio del tamaño del genoma de las cepas T02_05F y T02_19F *H. vineae* y su nivel de ploidía mediante citometría de flujo por fluorescencia, para comparar con los resultados obtenidos mediante el ensamblado del genoma realizado a partir de la secuenciación realizada por [Giorello et al. \(2014\)](#).

Levaduras utilizadas

De la especie *H. vineae* se utilizaron las cepas previamente secuenciadas por [Giorello et al. \(2014\)](#), T02_05F y T02_19F. Como control se utilizaron las levaduras *S. cerevisiae* BY4742 (haploide) y BY4743 (diploide), derivadas de la cepa S288c.

Ensayo de citometría

Todas las cepas se cultivaron en medios YPD. Se sedimentaron 1×10^7 células/mL a 3000 xg durante 3 min y se lavaron con tampón PBS enfriado con hielo. Para fijar las células, se añadió lentamente 1 mL de etanol frío al 70 % y las muestras se almacenaron a 4 °C toda la noche. A continuación, el etanol se separó por centrifugación, el sedimento celular se lavó con PBS y se resuspendió en 700 μ L del tampón. Cada muestra se trató secuencialmente con 250 μ L de 1 mg/mL de ribonucleasa A (Appllichem) (1h a 50 °C), 50 μ L de proteinasa K (Sigma-Aldrich) 20 mg/mL (1h a 50 °C), y finalmente, 50 μ L de yoduro de propidio (Invitrogen) 1 mg/mL (toda la noche, 4 °C en la oscuridad). El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando un CyAnTM ADP (Beckman Coulter, EE.UU.) con citómetro de flujo de excitación a 488 nm. La adquisición y análisis de los datos se logró usando el software v4.3 Summit (Dako Cytomation, UK). Se recogieron 10.000 eventos por muestra. Se diseñó una estrategia de modo tal que quedaran excluidos restos celulares y partículas pequeñas irrelevantes. Esto se aplicó al histograma obtenido de modo que se mostraran sólo los eventos cerrados. La fluorescencia se detectó con un filtro de emisión de 575/25 nm (FL2) y se representa a una escala lineal. El cálculo del tamaño del genoma se realizó a partir de tres experimentos biológicamente independientes y cada cepa fue analizada por triplicado en cada experimento. A partir de los valores de media obtenidos y de los valores del tamaño del

genoma de las levadura control, se determinó el tamaño del genoma de las levaduras *H. vineae*.

3.2. Efecto de compuestos nitrogenados en la producción de bencenoides y fenilpropa- noides

En esta sección se describe la metodología utilizada para ver la influencia del contenido total de nitrógeno, de ciertos aminoácidos y del ácido paraaminobenzoico en la producción de compuestos bencenoides y fenilpropa-
noides.

3.2.1. Fermentaciones a escala de laboratorio

Se realizaron fermentaciones en medio artificial similar mosto para poder evaluar diferentes condiciones nitrogenadas. El medio químicamente definido fue preparado según [Carrau et al. \(2008\)](#) como se describió en el punto 3.1.4

Efecto de la concentración de nitrógeno

Se ajustó el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable (YAN) base a 50 mgN/L y se subió a 75, 100 y 250 mgN/L con fosfato diamónico (DAP) para obtener los distintos niveles de nitrógeno.

Efecto del contenido de aminoácidos en los compuestos bencenoides

Se realizaron experimentos modificando el contenido de los aminoácidos: fenilalanina (Phe), triptofano (Trp) y tirosina (Tyr). Para mantener la concentración de YAN en 100 mgN/L, se adicionó o removió DAP para compensar el sobrante o la falta de nitrógeno en el medio. De esta manera se preparó el medio generando once condiciones diferentes, incluyendo también como variable la vitamina ácido paraaminobenzoico (PABA), ver **Tabla 3.4**

Tabla 3.4: Referencia de preparación de las 11 condiciones distintas del medio similar mosto

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Phe	0	1	2	1	1	0	2	1	1	0	1
Trp	1	1	1	1	1	1	1	0	2	2	1
Tyr	1	1	1	0	2	0	2	1	1	0	1
DAP	+	1	-	+	-	+	-	+	-	+	1
PABA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

0, sin el aa; 1, concentración normal del aa;
 2, doble de concentración del aa;
 +, aumento de concentración;
 -, disminución de concentración.

3.2.2. Extracción y análisis de compuestos aromáticos

Se utilizó la metodología ya descrita en la sección anterior (**punto 3.1.8**)

3.3. Vinificaciones a escala semi-industrial

Se realizaron fermentaciones mixtas a escala semi-industrial en la bodega experimental Mas dels Frares de la Universidad Rovira i Virgili, en Tarragona, España. Las vinificaciones se llevaron a cabo en blanco con uvas de la variedad Macabeo y en tinto con uvas Merlot.

3.3.1. Cepas de levaduras

Se trabajo con la cepa T02.05F de la especie *H. vineae* y con la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* QA23 (Lallemand®). La levadura QA23 es una levadura seca activa y su proceso de rehidratación fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Lallemand®). La cepa de *H. vineae*T02.05F se utilizo en forma de pasta fresca y fue preparada en la misma forma que QA23 utilizando agua tibia. En ambos casos el inóculo inicial fue de 2×10^6 cel/mL

3.3.2. Condiciones de fermentación

Se realizaron dos fermentaciones distintas, una en blanco con la uva Macabeo donde la fermentacion se realiza solo con la pulpa de la uva, no tiene periodo de maceración con las cascaras pero se realiza a temperatura relativamente baja. Por otro lado se realizó una fermentación en tinto con la variedad de uva Merlot, donde es necesario un paso de maceración con las cascaras de la uva durante los primeros días de la fermentación para extraer color de las cascaras y se realiza a temperatura ambiente.

Las fermentaciones de Macabeo se realizaron por triplicado en tanques de acero de 100 L refrigerados a 18°C, seis tanques en total. Las fermentaciones de Merlot se desarrollaron en baldes de 6 kg con sombrero sumergido a 26°C. El mosto de Macabeo se sometió a un proceso de filtración al vacío para reducir la población de levaduras nativas inicial, mientras que para el Merlot las uvas fueron recogidas mediante recolección selectiva de los racimos, seleccionando aquellos de mejor calidad.

3.3.3. Seguimiento de las fermentaciones

Seguimiento actividad fermentativa

La actividad de la fermentación fue seguida por densidad, se realizó un monitoreo diario usando un medidor de densidad portátil (Mettler Toledo).

Seguimiento de las poblaciones

En las fermentaciones semi-industriales, se tomaron muestras una vez al día. Las muestras se diluyeron en agua MilliQ estéril (Millipore Q-POD™ Advantage A10) y fueron plaqueadas en los medios YPD (Glucosa 2 %, Peptona 2 %, extracto de levadura 1 % y agar 1,7 %) y agar lisina (Oxoid, Inglaterra) utilizando un dispensador en espiral automatizado WASP II (Don Whitley Scientific Limited, Inglaterra) y se incubaron a 28°C durante 48 hs. El YPD es un medio rico que proporciona recuentos totales de levadura, mientras que el medio agar lisina sólo proporciona recuentos de células *Non-Saccharomyces*, ya que las pertenecientes al género *Saccharomyces* no son capaces de crecer utilizando la lisina como única fuente de nitrógeno.

3.3.4. Identificación de levaduras

La identificación de las levaduras se realizó mediante la metodología QPCR, PCR cuantitativa según la metodología descrita [Hierro et al. \(2007\)](#).

3.3.5. Análisis químicos en WineScan

Finalmente, con el WineScan™ (Foss) mediante espectroscopia en infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se determinaron los siguientes datos analíticos: etanol; acidez total y volátil; densidad; pH; ácidos málico, láctico, cítrico y tartárico; fructosa y glucosa y glicerol (la tecnología utilizada es ideal para analizar rápidamente diversos parámetros en muestras líquidas).

3.3.6. Análisis sensorial

Se realizó el análisis sensorial de los vinos obtenidos en las fermentaciones realizadas en la bodega Mas dels Frares, mediante un panel especializado formado por 13 evaluadores. Se evaluaron los atributos sensoriales de los vinos Macabeo fermentados a partir de inóculos de *H. vineae* y *S. cerevisiae*. Se

realizaron un test triangular y uno descriptivo. Para el test triangular se les entregó una boleta (ver **Tabla 3.5**) donde tenían que identificar cual de las tres copas que les habían sido entregadas era la diferente (dos iguales fermentadas con *H. vineae* y una diferente, fermentada con *S. cerevisiae*), seleccionar cual era la de su preferencia, y finalmente marcar la presencia o ausencia de una serie de atributos en base a una escala dada (1 al 4). El test descriptivo se realizó para determinar los descriptores aromáticos que se pudiesen percibir y los atributos de sabor. Para esto se les entregó una boleta (ver **Tabla 3.6**) a cada juez con una serie de atributos, donde tenían que marcar presencia o ausencia del mismo en una escala del 1 (ausencia) al 10 (máxima presencia). Se les realizó análisis estadístico a los datos, mediante análisis de ANOVA.

Tabla 3.5: Boleta test triangular

TEST TRIANGULAR	Señala la copa diferente			Preferencia	Puntúa los atributos que encuentres distintos: 1 (nada) al 4 (mucho)			
1- Señala la copa diferente, tu preferencia y la razón de la diferencia	A	B	C			COPA A	COPA B	COPA C
					Intensidad de aroma			
					Reducción			
					Fruta			
					Floral			
Otros:								
2- Señala la copa diferente, tu preferencia y la razón de la diferencia	A	B	C			COPA A	COPA B	COPA C
					Intensidad de aroma			
					Reducción			
					Fruta			
					Floral			
Otros:								

3.3.7. Extracción y análisis de compuestos aromáticos

Se utilizó la metodología ya descrita en la sección anterior (**punto 3.1.8**).

Tabla 3.6: Boleta de test descriptivo

Posición del catador N°								
Señalar del 1 al 10 (1=ausencia 10 máximo)								
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Olfato (via ortonasal y retronasal)								
Oxidación								
Reducción								
Fruta fresca								
Fruta confitada								
Floral								
Hierbas aromáticas								
Levadura								
Tostados (fenólico)								
Vegetal (herbáceo)								
Boca								
Calidad del aroma								
Acidez								
Estructura								
Amargor								
Volumen								
Puntuación global								

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Caracterización de las levaduras

En ésta primer sección, se muestran los resultados obtenidos a partir de la caracterización de las once levaduras identificadas como *Hanseniaspora vineae*, pertenecientes a la colección de levaduras nativas del laboratorio del Área Enología y Biotecnología de las Fermentaciones de Facultad de Química. Las mismas pudieron ser identificadas como cepas distintas a partir de la técnica de identificación molecular TtTRNA. Se determinó que todas las *H. vineae* tienen actividad proteasa y β -glucosidasa extracelular a pH 6. No se determinó actividad pectinasa a ningún pH. A niveles bajos de nitrógeno en el mosto (YAN 100 mg/L) todas las levaduras llegaron al final de la fermentación, destacándose algunas, incluso sobre la cepa control de *S. cerevisiae* (M522). No se observó una tendencia en favor de *H. vineae* en cuanto a la producción de glicerol, aunque fue una de éstas cepas la que lo produjo en mayor concentración. Las cepas de *H. vineae* presentaron, en general, resistencia al anhídrido sulfuroso (SO_2), y la mayoría soportaron concentraciones de 50 mg/L (concentración utilizada en mostos a escala industrial).

En cuanto a la liberación de polisacáridos se determinó que depende de la cepa y no de la especie de levadura utilizada, siendo una cepa de *H. vineae* la que liberó estos compuestos al medio en mayor proporción. En cuanto a la composición aromática de las fermentaciones se destacaron aquellas llevadas a cabo por cepas de *H. vineae*, sobre todo por su aporte al contenido de acetatos, específicamente el acetato β -feniletílico que fue producido hasta doce veces más en comparación a lo visto en *S. cerevisiae*. La producción de alcohol bencílico

no se pudo cuantificar en las fermentaciones con *S. cerevisiae* y si en las fermentaciones con las distintas cepas de *H. vineae* (aunque con gran diversidad entre las cepas). Esto se vio reflejado en la evaluación sensorial donde fueron mejor evaluadas las fermentaciones realizadas a partir de *H. vineae*.

4.1.1. Identificación molecular

Se realizó la identificación de acuerdo al protocolo descrito en la metodología. En la **Figura 4.1** se pueden ver los 2 geles obtenidos a partir de los 2 pares de primers. En los geles se observan los patrones de amplificadores generados para cada levadura con cada combinación de primers. Mediante análisis de cluster se compararon los patrones de bandas obtenidos en un mismo gel y entre geles. Este análisis dio como resultado el dendrograma de la **Figura 4.2**.

En el mismo se puede ver como los aislamientos de los años 2002 y 2011 quedaron agrupados juntos, mientras que los del año 2012 se dividieron en dos grupos hacia los extremos. Finalmente todas las levaduras fueron identificadas como cepas diferentes.

El haber podido definir que las once cepas son diferentes permite asegurar que la caracterización de la especie *H. vineae* será verdaderamente representativa.

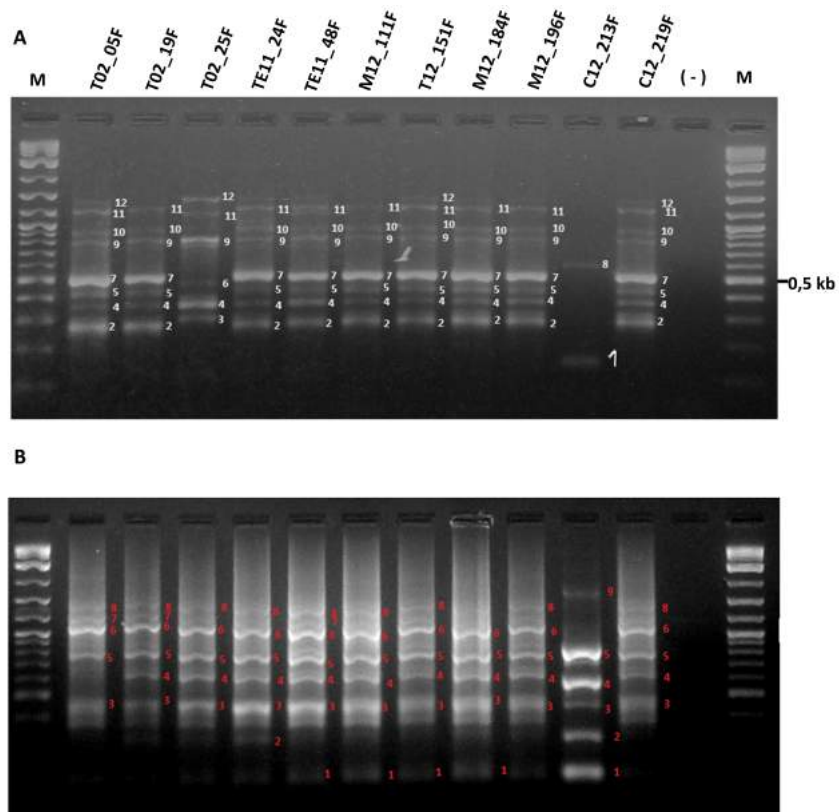


Figura 4.1: Perfiles de TtTRNA obtenidos para las diferentes levaduras de la especie *H. vineae*. Los resultados de las PCRs fueron obtenidos a partir de ADN de las mismas muestras y presentados en el mismo orden en A (combinación de primers, TtRNASc - ISSR - MB) y en B (combinación de primers, TtRNASc - 5CAG)

4.1.2. Caracterización enzimática

Se realizaron ensayos en placas con sustratos específicos para la determinación de las distintas actividades enzimáticas: proteasa, pectinasa y β -glucosidasa. Los resultados de actividad enzimática obtenidos se resumen en la **Tabla 4.1**, donde se puede observar actividad proteolítica y β -glucosidasa a pH 6 como comportamiento característico de la especie.

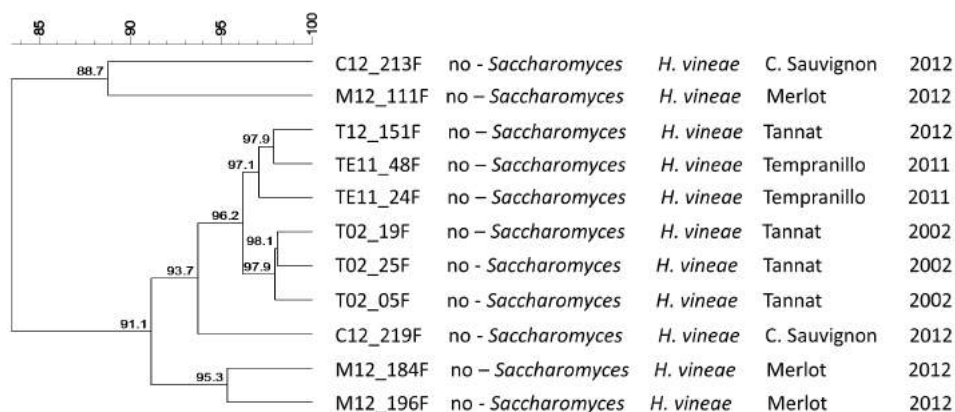


Figura 4.2: Análisis filogenético mostrando la diferenciación de las levaduras en 11 cepas distintas. Las columnas de la derecha indican la variedad de uva de donde se aislaron y el año de cosecha

Tabla 4.1: Resultados obtenidos en los análisis de enzimas extracelulares en medios específicos para las 11 cepas de levaduras

	proteasa		β -glucosidasa		pectinasa pH 6/pH 4,5
	pH 6	pH 4,5	pH 6	pH 4,5	
T02_05F	++	-	+	-	-
T02_19F	+	-	+	-	-
T02_25F	++	-	+	-	-
ME11_24F	+	-	+	-	-
ME11_48F	+	-	+	-	-
M12_111F	++	-	+	-	-
T12_151F	+	-	+	-	-
M12_184F	+	-	+	-	-
M12_196F	+	-	+	-	-
C12_213F	+	-	+	-	-
C12_219F	+	-	+	-	-

+ presencia de actividad; ++ mayor actividad; - no se evidencia actividad.

Proteasa

Se pudo observar actividad proteolítica a pH 6 en todas las cepas, destacándose las levaduras T02_05F, T02_25F y M12_111F por formar halos de mayor diámetro, lo que resulta de una mayor actividad enzimática (ver **Figura 4.3**). Esto se corresponde con otros estudios realizados, donde se pudo observar que las levaduras no-*Saccharomyces*, en general, presentan capacidad proteolítica [Strauss et al. \(2001\)](#); [Mostert \(2013\)](#); [López et al. \(2015\)](#). Final-

mente se puede decir que esta capacidad de producir enzimas proteolíticas parece ser cepa dependiente, ya que se observan diferencias de comportamiento entre las distintas levaduras aquí estudiadas. Esta dependencia en la cepa utilizada ha sido anteriormente reportada para otras especies de levaduras no *Saccharomyces* [Strauss et al. \(2001\)](#); [Pando et al. \(2012\)](#); [Mostert \(2013\)](#). Esta actividad enzimática tiene un gran interés enológico, ya que es responsable de la hidrólisis de proteínas y péptidos presentes en mostos y vinos, lo que puede afectar la estabilidad y turbidez de los vinos [Waters et al. \(1994, 2005\)](#). Como se presentó en la introducción, esta hidrólisis liberará al medio péptidos pequeños y aminoácidos, que podrán consumirse fácilmente por las levaduras como fuente de nitrógeno. De ésta manera se favorece el enriquecimiento de nutrientes en el medio, pudiendo evitar así paradas o enlentecimiento de fermentaciones que puedan ocasionarse por deficiencia de nitrógeno en el mosto. Así mismo, se puede tener en cuenta como una posible solución para afrontar los problemas asociados a la clarificación, estabilización y filtración de los vinos.



Figura 4.3: Placa de Skim Milk con las levaduras T02_25F y T02_19F con actividad proteolítica extracelular positiva (formación de halo) y la levadura comercial *S. cerevisiae* M522 como control negativo (no hay formación de halo)

β -glucosidasa

Al igual que con la actividad proteolítica, se evidenció actividad de la β -glucosidasa a pH 6 pero no a pH 4,5. Esto concuerda con lo observado previamente para estas levaduras por [Pérez et al. \(2011\)](#) y lo descrito (por Vassero 1989) para otras cepas de ésta especie. En cambio se contraponen a lo descrito en el trabajo realizado por [Mostert \(2013\)](#), donde se pudo determinar actividad de ésta enzima a pH 3,5. En el trabajo realizado por [López et al. \(2015\)](#) también se muestra actividad de ésta enzima en levaduras *H. vineae*, sin especificar a que pH. De todas formas hay que tener en cuenta lo reportado por

Strauss et al. (2001) y Pérez et al. (2011), donde se explica que hay ensayos que se llevaron a cabo con sustratos poco confiables (4-metil umbeliferil- β -D-glucopiranosido o *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido), ya que dichas sustancias pueden ser hidrolizados mediante actividad 1,3-glucanasa, que es común en la mayoría de las levaduras. Strauss y colaboradores (2001) realizaron un primer ensayo con el sustrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido. La mayoría de las levaduras analizadas parecían poseer actividad enzimática, sin embargo, al realizar el ensayo con arbutina como sustrato, ninguna de las levaduras mostró actividad. En este trabajo el sustrato utilizado fue la esculina, que al igual que la arbutina, son análogos de β -glucosidos que al hidrolizarse forman un precipitado amarronado en el medio, evidenciando la presencia de actividad enzimática.

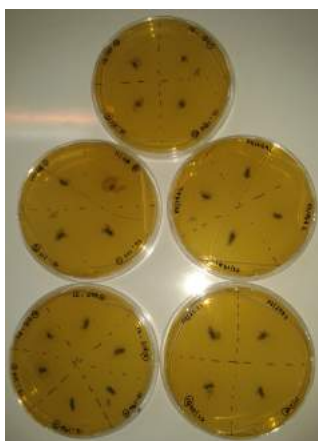


Figura 4.4: Placas con medio EGA y las 11 cepas de *H. vineae* a caracterizar (por duplicado), en ninguna formó precipitado por lo que no poseen actividad β -glucosidasa a pH 4.5

Pectinasa

No se observó actividad enzimática capaz de degradar pectina extracelular, lo que coincide con lo reportado previamente para otras especies, donde no ha sido posible identificar actividad pectinasa en levaduras no-*Saccharomyces* McKay (1990), Charoenchai et al. (1997), Strauss et al. (2001), Mostert (2013) y López et al. (2015).

4.1.3. Capacidad fermentativa

Para los estudios de cinética de fermentación se realizaron microfermentaciones en medio artificial similar mosto, que se dieron por finalizadas el día 13, cuando se pudo observar una estabilización en la pérdida de peso. En la **Figura 4.5** se presenta la cinética de fermentación de cada levadura representada mediante la liberación de CO₂ (g/100mL) en función del tiempo (días).

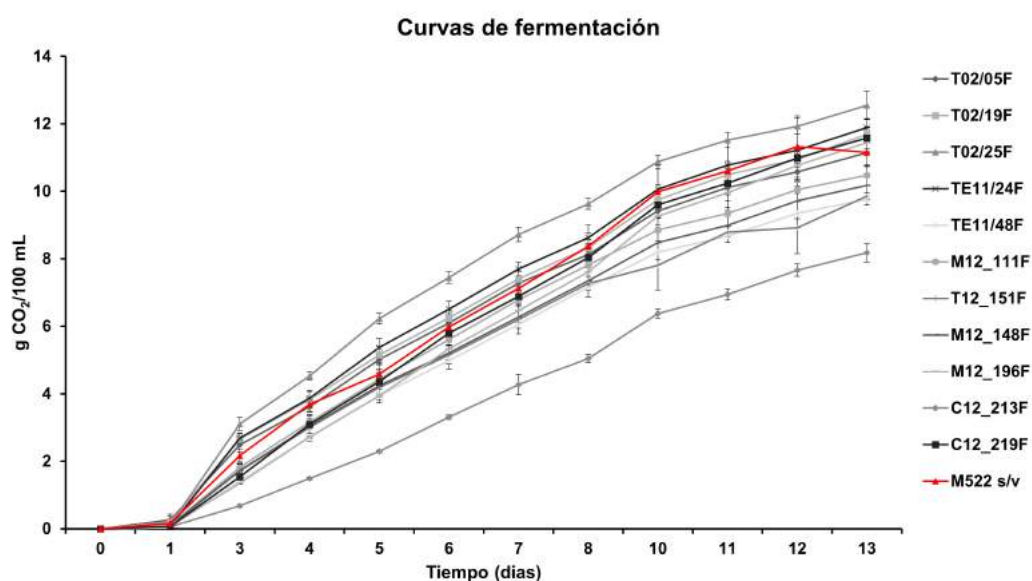


Figura 4.5: Cinética de fermentación de todas las levaduras en medio similar mosto, a 20°C, con una agitación diaria. La levadura M522 (*S. cerevisiae*) fue utilizada como control.

Todas las cepas pudieron fermentar en condiciones de baja concentración de nitrógeno, con 100 mgN/L asimilable. La concentración deseada para llevar adelante un proceso de fermentación es de 150 mg N/L [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#). Se pudieron apreciar distintos comportamientos en cuanto a la capacidad fermentativa de las levaduras. Una cepa se destacó positivamente del resto (T02_25F), y produjo una mayor liberación de gas carbónico durante la fermentación (11,52 gCO₂/100mL), seguida por otro grupo en el cual se encuentra la control M522 junto con las cepas TE11_24F, T02_19F, T02_05F, M12_196F y C12_219F. El hecho de que algunas cepas *H. vineae* tuviesen un mejor desempeño durante las fermentaciones frente a la cepa control, pudo deberse a la concentración de nitrógeno asimilable del medio, relativamente baja (100 mgN/L), sumado a que la cepa M522 es considerada como una levadura con alta demanda de éste nutriente [Carrau \(2003\)](#). Esto concuerda con

lo reportado por [Mendes-Ferreira et al. \(2004\)](#), que observaron que algunas cepas de *S. cerevisiae* disminuyen su rendimiento cuando la concentración de nitrógeno en el medio se reduce. En contraposición la cepa C12_213F fue la que presentó desempeño inferior, al liberar la menor cantidad de CO₂ (6,94 gCO₂/100mL). En la **Figura 4.6** se puede ver la liberación total de CO₂ de cada levadura al final de la fermentación.

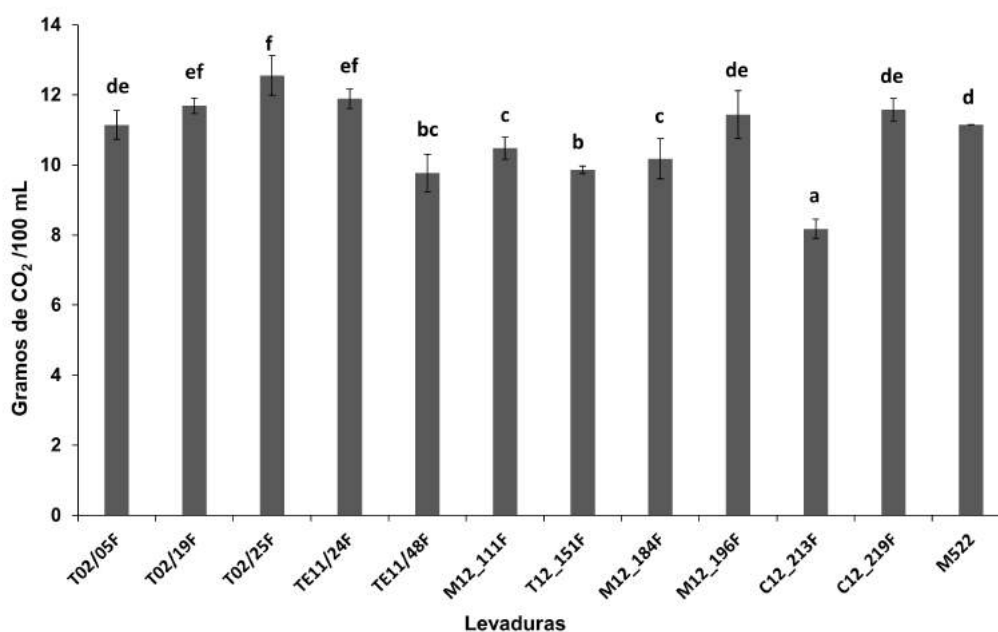


Figura 4.6: Valores finales de CO₂ liberado al final de la fermentación por cada cepa de levadura. Las muestras con las mismas letras no presentan diferencias a un nivel de confianza del 95 %

En el recuento de células vivas sobre el final de la fermentación se pudieron ver diferencias significativas entre algunas de las levaduras como se muestra en la **Figura 4.7**. Esto no marcó una correlación positiva con la cinética de fermentación de las mismas. Si se observó que la levadura con menor rendimiento durante la fermentación (C12.213F) fue la que presentó un recuento de células mayor. En ese caso un menor rendimiento durante la fermentación implicó una mayor producción de biomasa.

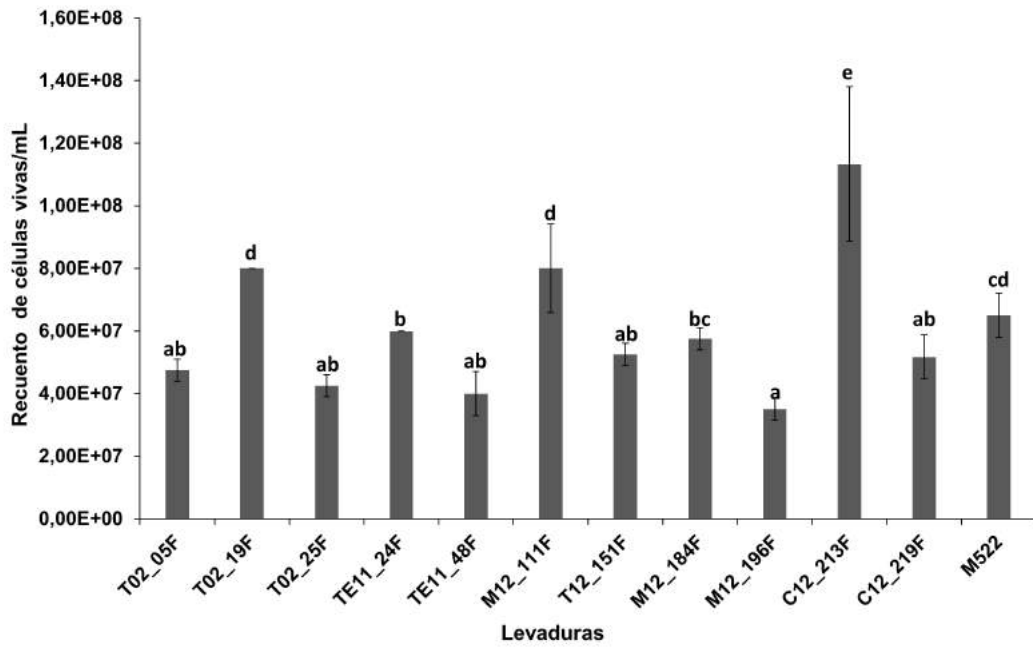


Figura 4.7: Recuento de células vivas sobre el final de la fermentación. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95%)

4.1.4. Producción de glicerol

De las microfermentaciones realizadas se tomaron muestras para determinar el contenido de glicerol producido por las levaduras. Como se ve en la **Figura 4.8**, las tres cepas que produjeron una concentración levemente superior de éste compuesto pertenecen a la especie *H. vineae*, destacándose la C12_213F seguida por las cepas M12_196F y la T02_25F. Estas últimas no presentaron diferencias significativas con *S. cerevisiae*. En la bibliografía se ha reportado que las no-*Saccharomyces* presentan una mayor producción de éste compuesto [Fleet \(2003\)](#) [Jolly et al. \(2006\)](#) [Jolly et al. \(2013\)](#). En el trabajo realizado por [Comitini et al. \(2011a\)](#) se asocia la producción de glicerol con el número de células en el medio, lo que concuerda con estos resultados, ya que la cepa C12_213F fue la que presentó un recuento de células vivas superior sobre el final de la fermentación.

Se puede observar que hay variabilidad entre las distintas cepas de *H. vineae* pero no se evidenció un comportamiento diferencial entre estas y *S. cerevisiae*.

Cabría destacar que la cepa C12_213F (mayor productora de glicerol) fue la que mostró un peor desempeño durante las fermentaciones. Una posible explicación para este comportamiento podría centrarse en el flujo de carbón que ocurre durante el metabolismo de ésta levadura [Arroyo-López et al. \(2010\)](#). Se podría estar favoreciendo la producción de glicerol en detrimento de la de etanol ya que el CO₂ se libera luego de formarse el piruvato. Esta levadura liberó menos cantidad de CO₂ y la desviación para la producción de glicerol se produce en pasos previos del metabolismo de la glucosa. Esta levadura podría considerarse para futuros estudios enfocados a la producción de vinos con menor contenido de alcohólico para los casos en que la cosecha de la uva se viese retrasada con el fin de alcanzar su madurez polifenólica. Este retraso en la fecha de cosecha trae aparejado que se alcancen niveles de azúcar en uvas capaces de dar un volumen de alcohol en vino de hasta 16°, lo que es una característica no deseada ya que la tendencia es al consumo de vinos con menor contenido alcohólico [Gonzalez et al. \(2012\)](#); [Contreras et al. \(2014\)](#); [Quirós et al. \(2014\)](#); [Ciani et al. \(2016\)](#); [Varela \(2016\)](#).

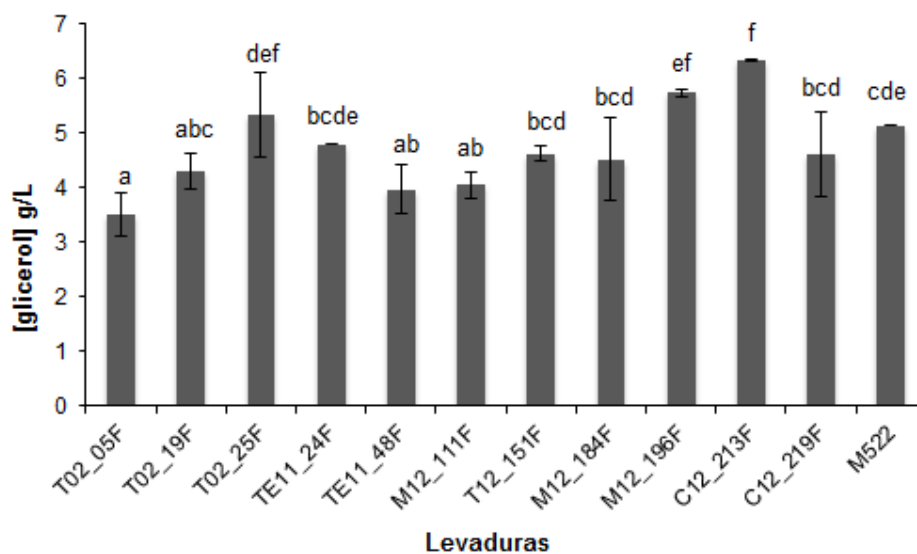


Figura 4.8: Concentración de glicerol en g/L producida por cada levadura. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

4.1.5. Resistencia al SO₂

Se analizó la resistencia de las levaduras al SO₂, compuesto que suele utilizarse en bodega al principio de la fermentación, ya que por sus propiedades antisépticas es utilizado en dosis convenientes según la composición y el estado de las uvas para asegurar la pureza y regularidad de la fermentación (la concentración normalmente utilizada en bodegas es de 50 mg/L) reduciendo la carga de levaduras nativas que normalmente traen las uvas del viñedo. De los resultados obtenidos se puede ver que todas las levaduras analizadas tendieron a reducir su crecimiento a medida que aumento la concentración de SO₂ en el medio. En la **Figura 4.9** se puede ver la reacción de las levaduras a cada uno de los tratamientos. En la mayoría de las levaduras se observa una diferencia significativa respecto al control (0 mg/L de SO₂). A partir de los 75 mg/L también se pudieron observar levaduras con una menor resistencia, donde la diferencia comenzó a partir de los 50 mg/L (C12.213F y M12.111F). Otras 3 levaduras (TE11.48F, M12.184F y la control QA23) presentaron una mayor resistencia, mostrando diferencias significativas a partir de los 100 mg/L de SO₂. De las cepas de *H. vineae* estudiadas, se puede decir que la menos resistente fue la C12.213F. En la gráfica de la **Figura 4.9** se observa como a partir de los 75 mg/L de SO₂ ya prácticamente no hay levaduras presentes en el medio.

En definitiva, tres cepas se destacaron por su resistencia al anhídrido sulfuroso (T02_05F, TE11_48F y M12_184F) con niveles similares a los de la control M522.

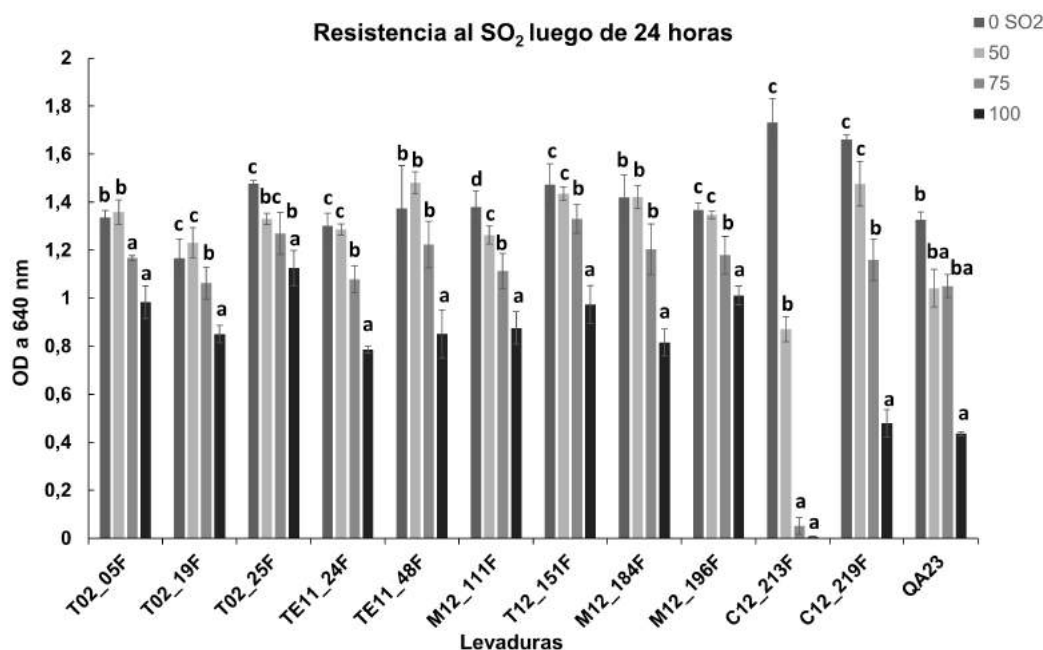


Figura 4.9: Densidad óptica (DO) registrada para cada levadura para las cuatro concentraciones de SO₂ a 640nm. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

En concordancia con lo dicho por Jolly et al. (2006), y comparando con los resultados obtenidos por Henick-Kling et al. (1998), se puede inferir que en la mayoría de las cepas de *H. vineae* analizadas la concentración de SO₂ en el medio tiene influencia sobre la población de levaduras. Pero para los niveles de uso normales en bodega (50 mg/L). El efecto es prácticamente nulo. Estos resultados se contraponen a lo descrito para las *Hanseniaspora* en general por Fleet (1993), donde se las presenta como no resistentes al SO₂, a diferencia de levaduras *Torulasporea* y *Brettanomyces*. En el caso de la cepa C12.213F se puede decir que a partir de los 75 mg/L de SO₂ el efecto del anhídrido sulfuroso es mortal.

En la **Tabla 4.2** se resumen los resultados obtenidos, donde la cantidad de cruces (+) refleja el comportamiento de cada levadura respecto al control, según las diferencias significativas obtenidas a partir del test estadístico. Si bien no es una interpretación cuantitativa del efecto del anhídrido sulfuroso sobre

las levaduras, da una mejor idea del efecto de éste compuesto sobre cada cepa. De esta manera +++++ implica que no hay diferencias significativas frente al control. A medida que aparecen diferencias significativas disminuye el número de cruces.

Tabla 4.2: Efecto del la concentración de SO₂ sobre las levaduras, donde +++++ implica que no hay diferencia respecto el control y a medida que aumenta la diferencia disminuye el número de cruces.

Cepas	mg SO ₂ /L		
	50	75	100
T02.05F	+++++	+++	+++
T02.19F	+++++	+++	++
T02.25F	+++++	+++	++
TE11.24F	+++++	+++	++
TE11.48F	+++++	+++++	+++
M12.111F	+++	++	+
T12.151F	+++++	+++	++
M12.184F	+++++	+++++	+++
M12.196F	+++++	+++	++
C12.213F	+++	++	++
C12.219F	+++++	+++	++
QA23	+++++	+++++	+++

4.1.6. Liberación de polisacáridos durante la fermentación alcohólica

En la **Figura 4.10** se ve la concentración de polisacáridos liberados por cada levadura a la mitad de la fermentación (barras gris oscuro) y al final de la misma (barras gris claro). En la especie *H. vineae* se observó una mayor liberación de polisacáridos por parte de la levadura T02.05F con un promedio de 430 mg/L. La menor liberación se produjo por parte de la levadura T02.25F con un promedio de 135 mg/L. La liberación de polisacáridos producida por la levadura QA23 (*S. cerevisiae*) fue similar a la de algunas cepas de *H. vineae*. Entre las cepas de *H. vineae* se pudo observar variabilidad, por lo que se determinó que la liberación de polisacáridos al medio es dependiente de la cepa que se utilice, lo que concuerda [Martí-Raga et al. \(2016\)](#) donde reportaron diferencias de comportamiento en distintas cepas de *S. cerevisiae* en la liberación de polisacáridos.

Cuando se estudió la liberación de polisacáridos en distintos momentos de la fermentación (mitad y final), se pudo determinar que al igual que la cepa,

el tiempo es un factor que influye sobre la liberación de polisacáridos. En general se detectó mayor concentración de polisacáridos sobre la mitad de la fermentación (con excepción de 2 cepas de *H. vineae* donde se encontró mayor cantidad de éstos compuestos hacia el final de la misma). Este comportamiento no concuerda con lo reportado por [Giovani et al. \(2012\)](#) donde, si bien ven que la liberación de polisacáridos disminuye sobre el final de la fermentación, estos siguen liberándose durante todo el transcurso de la fermentación.

A partir de estos resultados se ve que durante la fermentación alcohólica hay liberación de polisacáridos de las levaduras al medio, y es mas notoria durante los primeros días de la fermentación, por lo que podría decirse que son liberados durante la etapa de crecimiento de las levaduras. Las levaduras no-*Saccharomyces* han sido reportadas como capaces de influir en la concentración de polisacáridos en el vino, al liberar mayor cantidad de éstas moléculas al medio [Giovani et al. \(2012\)](#); [Domizio et al. \(2011\)](#). En nuestros resultados se observa en la cepa T02_05F que a menores concentraciones de nitrógeno en el medio, menor rendimiento de fermentación. Ciertas cepas de *H. vineae* fueron capaces de liberar mayor concentración de polisacáridos que la control M522, pero no fue una respuesta general de la especie. Es importante conocer la capacidad de liberación de polisacáridos al medio de las distintas levaduras. Por el aporte que pueden hacer a la calidad organoléptica de los vinos, que, como se vio en el marco teórico de éste trabajo, tienen influencia sobre varios aspectos que influyen en la calidad del vino. Favorecen la persistencia aromática, aumentan el volumen en boca, la estabilidad polifenólica y del color de los vinos, disminuyen la astringencia, promueven la fermentación maloláctica y aumentan la estabilidad tartárica y proteica [Alexandre and Guilloux-Benatier \(2006\)](#).

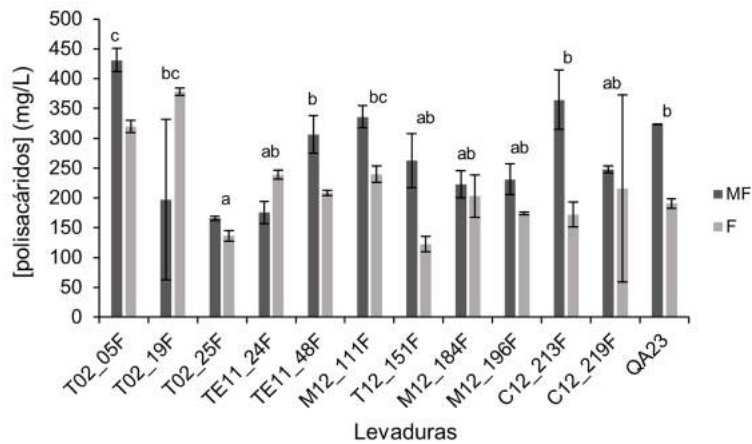


Figura 4.10: Polisacáridos cuantificados en el medio símil mosto a mitad de fermentación (gris oscuro) y al final de la misma (gris claro). Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

4.1.7. Composición aromática de las fermentaciones

A partir del análisis de la composición aromática de las fermentaciones mediante GC-MS realizados a las once cepas de *H. vineae* y a la cepa control de *S. cerevisiae* M522 se obtuvieron un total de 39 compuestos. De éstos, 25 fueron clasificados por grupo de compuestos aromáticos para su análisis (alcoholes, acetatos, ésteres, ácidos, isoácidos, terpenos y sesquiterpenos). Los restantes 14 no fueron clasificados debido a que no resultaron ser influyentes sobre la calidad organoléptica de los vinos. Los resultados obtenidos por grupos aromáticos se presentan en la **Figura 4.11**, donde se puede observar el comportamiento de cada levadura por grupo aromático.

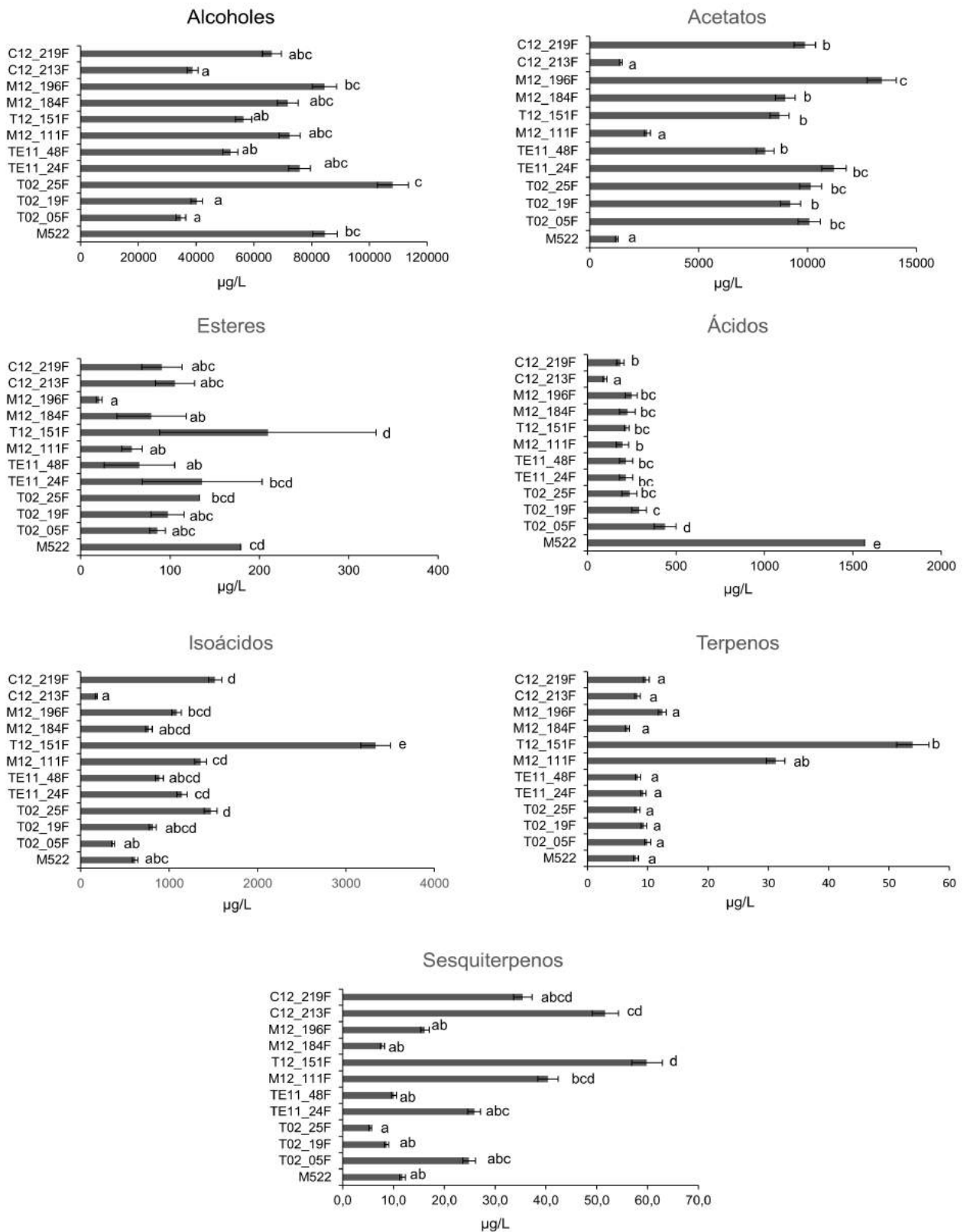


Figura 4.11: Producción aromática de cada levadura a partir de las microfermentaciones realizadas en el laboratorio, analizadas por grupos aromáticos. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95%)

Alcoholes

Dentro de este grupo se pudieron identificar 1-propanol, alcohol isobutílico, 1-butanol, alcohol isoamílico (3-metil-1-butanol), tirosol, alcohol bencílico y alcohol β -feniletílico. En la **Tabla 4.3** se ve la concentración de cada compuesto producida por las distintas levaduras, su desvío estándar y las diferencias significativas entre levaduras.

En la suma de los alcoholes, (Figura 4.11) la cepa que presento una mayor producción fue la *H. vineae* T02_25F junto con las cepas TE11_24F, M12_111F, M12_184F, M12_196F y C12_219F y la *S. cerevisiae* M522, en las cuales no se observó una diferencia estadísticamente significativa.

Dentro de los compuestos, el alcohol isoamílico, comúnmente asociado a descriptores frutado y vinoso o esmalte de uñas, fue el producido en mayor concentración en todas las fermentaciones. Se pudo observar variabilidad entre las cepas de *H. vineae*, algo similar a lo observado por Romano (2003) para las variedades *H. uvarum* *Zigosaccharomyces fermentati*, *Saccharomyces ludwigii* y *S. cerevisiae*. Sin embargo, no se observó una diferencia que permita diferenciar entre *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*, como fue descrito en los trabajos realizados por Romano (2003), donde *S. cerevisiae* produjo casi 4 veces mas que las especies *H. uvarum* y *C. stellata* o como en el caso de Rojas et al. (2003), donde para las especies *H. guilliermondii* y *P. anomala* la producción de alcohol isoamílico fue significativamente inferior a lo cuantificado en fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae* Díaz-Montaña and de Jesús Ramírez Córdova (2009).

El alcohol isobutílico fue el siguiente que se encontró en mayor concentración. Este compuesto es frecuentemente asociado a descriptores como químico y combustible. Dos cepas de *H. vineae* produjeron la mayor concentración de este compuesto (M12_111F y M12_151F) y otras dos (T02_05F y T02_19F) fueron las que lo produjeron en menor concentración. En los resultados obtenidos en este trabajo no se noto una variabilidad clara entre cepas.

El alcohol β -feniletílico se asocia a descriptores como floral, rosa y miel. Fue encontrado en altas concentraciones en todas las levaduras de la especie *H. vineae* destacándose como mayor productora la T02_25F, pero sin mostrar diferencias significativas frente a lo producido por la *S. cerevisiae* M522, contrario a lo observado en el trabajo realizado por Viana et al. (2008) donde se observaron diferencias entre *S. cerevisiae* y las *no-Saccharomyces* *H. guillier-*

mondii, *H. osmophila* y *P. membranifaciens*.

El tirosol, compuesto que se suele asociarse a sensaciones de amargor o químico, se cuantificó en una concentración notoriamente superior en la fermentación realizada por la levadura *S. cerevisiae* M522. En el trabajo realizado por [Medina et al. \(2013\)](#) vieron que en fermentaciones mixtas entre una cepa de *H. vineae* y una *S. cerevisiae* comercial, la producción de tirosol fue notoriamente superior que en fermentaciones desarrolladas de manera espontánea, por lo que se puede inferir que el aporte en la producción de tirosol es realizado por la levadura *Saccharomyces*. Este resultado permite diferenciar el comportamiento de las levaduras *H. vineae* frente a *S. cerevisiae*. Sin embargo, entre las diferentes cepas de *H. vineae* se observaron diferencias, destacándose la cepa T02_25F por ser la mayor productora, diferenciándose significativamente del resto.

Finalmente los alcoholes minoritarios fueron 1-butanol (fusel, espirituoso), 1-propanol (alcohólico) y alcohol bencílico (floral, dulce). En ambas especies de levaduras la producción de 1-butanol y de 1-propanol fue similar, tal como se observó en los trabajos realizados por [Moreira et al. \(2005\)](#) sobre las no-*Saccharomyces* (*H. uvarum* y *H. guilliermondii*) y *S. cerevisiae*, y [Romano \(2003\)](#), donde tampoco se observaron diferencias en la producción de 1-propanol entre distintas especies de levaduras en comparación con *S. cerevisiae*. Dentro de las distintas cepas de *H. vineae* se observaron diferencias leves evidenciando así variabilidad entre las distintas cepas. El 1-propanol es el único de los alcoholes superiores cuyo precursor es el piruvato, si bien tiene un precursor aminoacídico (ácido α -aminobutírico) [Díaz-Montaña and de Jesús Ramírez Córdova \(2009\)](#). Este es un aminoácido no proteico, que no suele encontrarse en el mosto y, en nuestro caso, no estaba presente en el medio artificial. El 1-propanol encontrado en las fermentaciones proviene del piruvato generado en la glicólisis a partir de la degradación de los azúcares, como se ve en la **Figura 2.1**.

El alcohol bencílico solo pudo ser cuantificado en las fermentaciones inoculadas con las cepas de *H. vineae* y no se pudo identificar en las fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae*. Dentro de *H. vineae* el compuesto pudo cuantificarse en un rango amplio entre 86-620 $\mu\text{g/L}$ mostrando así una importante variabilidad entre las cepas donde se destacó la cepa M12_196F.

Para el grupo de compuestos aromáticos de los alcoholes en general, así como para la mayoría de los compuestos identificados dentro de este grupo con

excepción del tirosol y el alcohol bencílico, se podría concluir que su producción es dependiente de cepa y no tanto de género o de especie, lo cual es coincidente con lo reportado en la revisión realizada por [Jolly et al. \(2013\)](#) sobre las no-*Saccharomyces* en general. Solo para el caso del tirosol se ve una marcada diferencia entre los 2 tipos de levaduras y a su vez dentro del conjunto de las *H. vineae*, si bien hay variabilidad en la entre la mayoría de las once cepas, no se aprecian diferencias significativas.

Tabla 4.3: Valores promedio de los alcoholes identificados en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

	1-propanol	Alcohol isobutílico	1-butanol	Alcohol isoamílico	Alcohol benéfico	Alcohol β -fenilético	Tirosol	Suma de alcoholes
M522	41,19 \pm 0,71 ^{ab}	3488,32 \pm 3,54 ^{abc}	91,48 \pm 2,12 ^{cd}	54952,78 \pm 41,41 ^{cd}	ND \pm ND ^a	18387,26 \pm 2,12 ^{bc}	7682,77 \pm 4,24 ^d	84653,81 \pm 7,78 ^{bc}
T02.05F	ND \pm ND ^a	631,44 \pm 489,97 ^a	31,05 \pm 14,35 ^a	25028,42 \pm 3698,60 ^a	141,18 \pm 24,61 ^{bc}	8029,08 \pm 2066,78 ^a	814,31 \pm 187,85 ^{ab}	34675,49 \pm 1923,67 ^a
T02.19F	1,95 \pm 2,76 ^a	749,82 \pm 21,85 ^a	32,75 \pm 5,16 ^{ab}	28325,73 \pm 953,98 ^{ab}	179,45 \pm 7,63 ^{bcd}	9878,66 \pm 120,46 ^a	1005,99 \pm 11,27 ^{ab}	40174,35 \pm 1057,64 ^a
T02.25F	42,50 \pm 25,32 ^{ab}	3408,89 \pm 500,40 ^{abc}	168,03 \pm 2,68 ^{bc}	76245,15 \pm 5659,49 ^d	409,46 \pm 68,97 ^e	25433,86 \pm 9450,67 ^c	2416,49 \pm 1414,1 ^c	108124,36 \pm 4745,56 ^c
TE11.24F	19,56 \pm 27,66 ^{ab}	2500,71 \pm 227,42 ^{ab}	74,25 \pm 21,11 ^a	63396,35 \pm 12558,60 ^{cd}	191,68 \pm 59,53 ^{bcd}	8705,66 \pm 475,70 ^a	903,33 \pm 78,10 ^{ab}	75791,53 \pm 11711,30 ^{abc}
TE11.48F	44,19 \pm 2,83 ^{ab}	4596,76 \pm 136,47 ^{bc}	48,60 \pm 51,85 ^a	38257,55 \pm 32146,79 ^{abc}	140,31 \pm 12,88 ^{bc}	10299,16 \pm 1384,41 ^{ab}	911,80 \pm 4,76 ^{ab}	54106,37 \pm 33704,71 ^{ab}
M12.111F	6,9 \pm 9,7 ^a	5860,9 \pm 2974,1 ^{cd}	206,0 \pm 13,9 ^c	56066,8 \pm 1629,8 ^{cd}	255,3 \pm 45,4 ^{cd}	8953,6 \pm 3823,3 ^a	1001,7 \pm 317,4 ^{ab}	72351,1 \pm 422,0 ^{abc}
T12.151F	ND \pm ND ^a	8591,87 \pm 3424,09 ^d	208,81 \pm 104,47 ^c	76653,21 \pm 781,35 ^d	164,82 \pm 31,77 ^{bcd}	8669,99 \pm 742,51 ^a	152,80 \pm 16,73 ^a	94441,59 \pm 5003,85 ^{ab}
M12.184F	17,57 \pm 5,55 ^{ab}	3002,23 \pm 679,39 ^{abc}	85,31 \pm 15,74 ^a	59771,40 \pm 14279,72 ^{cd}	192,82 \pm 89,14 ^{bcd}	8084,00 \pm 5357,42 ^a	643,54 \pm 643,90 ^{ab}	71746,87 \pm 21059,75 ^{abc}
M12.196F	32,23 \pm 30,33 ^{ab}	3696,14 \pm 514,75 ^{abc}	55,33 \pm 11,05 ^a	64674,79 \pm 800,58 ^d	620,27 \pm 81,86 ^f	14030,00 \pm 1953,92 ^{bc}	1361,84 \pm 291,15 ^b	84470,59 \pm 2571,39 ^{bc}
C12.213F	93,69 \pm 110,50 ^b	3177,28 \pm 2509,40 ^{abc}	51,18 \pm 0,40 ^a	26748,84 \pm 7492,45 ^a	86,51 \pm 24,03 ^{ab}	7524,45 \pm 377,37 ^c	1045,48 \pm 202,35 ^{ab}	38727,43 \pm 10667,64 ^a
C12.210F	35,45 \pm 33,02 ^{ab}	2517,45 \pm 550,12 ^{abc}	63,00 \pm 7,51 ^a	54397,80 \pm 15081,41 ^{bcd}	287,47 \pm 103,81 ^{de}	7995,14 \pm 3234,32 ^a	974,37 \pm 172,55 ^{ab}	66270,68 \pm 18001,41 ^{abc}

Acetatos

Dentro de este grupo se pudieron identificar y cuantificar dos compuestos, acetato de isoamilo y acetato β -feniletílico. En general dentro del grupo (ver **Figura 4.11**) se observa una gran diferencia de producción de estos compuestos entre la *S. cerevisiae* M522 y todas las *H. vineae*. Yendo a lo particular, entre las cepas de *H. vineae* también se observan diferencias significativas y, aunque la mayoría son buenas productoras, se destacaron las cepas M12_196F, TE11-24F, T02_05F y T02_25F.

Si se analizan los compuestos dentro de este grupo por separado (ver **Tabla 4.4**), el compuesto mayoritario es el acetato β -feniletílico, el cual a su vez, es responsable de la diferencia entre la M522 y la mayoría de las cepas de *H. vineae*. Se pudo observar una diferencia de producción de aproximadamente 12 veces en la mayor productora dentro de las cepas no-*Saccharomyces*, la cepa M12_196F. Esta diferencia de producción ya ha sido reportada entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, sobre todo las pertenecientes al genero *Hanseniaspora* [Rojas et al. \(2003\)](#); [Moreira et al. \(2005\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#); [Jolly et al. \(2006\)](#); [Viana et al. \(2008\)](#); [Viana et al. \(2009\)](#) y [Gamero et al. \(2016\)](#) así como también para *H. vineae* [Viana et al. \(2011\)](#); [Medina et al. \(2013\)](#). Dentro de las cepas de *H. vineae* se pudieron observar diferencias significativas, por lo que se podría decir que la producción de este compuesto es cepa dependiente. El acetato β -feniletílico contribuye con aromas florales (rosa), miel, manzana, azucarado y fruta tropical.

Para el acetato de isoamilo hay variabilidad entre las diferentes levaduras pero no se marca una diferencia entre lo producido por la M522 (*Saccharomyces*) frente a las cepas de *H. vineae*, contrario a lo reportado por [Rojas et al. \(2003\)](#) donde *S. cerevisiae* produce una mayor cantidad de éste compuesto a lo que se observa en las no-*Saccharomyces* *P.anomala* y *H. guilliermondii*, así como en el trabajo realizado por [Viana et al. \(2008\)](#), donde *H. osmophila* produjo concentraciones inferiores a las encontradas para *S. cerevisiae*. En éste caso, las cepas que produjeron este compuesto en mayor concentración fueron cepas de *H. vineae*, destacándose, al igual que en el acetato β -feniletílico la M12_196F.

Tabla 4.4: Valores promedio de los acetatos etílicos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

	Acetato de isoamilo	Acetato β -feniletílico	Suma de acetatos
M522	54,22 \pm 1,41 ^{abc}	1184,84 \pm 5,66 ^a	1231,06 \pm 4,24 ^a
T02.05F	33,00 \pm 19,38 ^{abc}	10054,44 \pm 929,00 ^{bc}	10087,44 \pm 909,62 ^{bc}
T02.19F	19,80 \pm 3,62 ^{ab}	9204,87 \pm 1435,22 ^b	9224,67 \pm 1438,84 ^b
T02.25F	79,27 \pm 20,22 ^{bcd}	10069,40 \pm 2714,09 ^{bc}	10148,67 \pm 2693,87 ^{bc}
TE11.24F	79,73 \pm 23,54 ^{cd}	11140,91 \pm 1836,98 ^{bc}	11220,64 \pm 1859,52 ^{bc}
TE11.48F	75,53 \pm 7,78 ^{cd}	8017,53 \pm 658,72 ^b	8093,06 \pm 650,94 ^b
M12.111F	23,80 \pm 9,19 ^a	2639,35 \pm 1076,29 ^a	2663,15 \pm 1067,10 ^a
T12.151F	128,91 \pm 30,98 ^{de}	8592,18 \pm 524,52 ^b	8721,09 \pm 493,50 ^b
M12.184F	120,38 \pm 5,08 ^{de}	8857,33 \pm 3682,84 ^b	8977,71 \pm 3687,92 ^b
M12.196F	147,04 \pm 69,59 ^e	13269,56 \pm 1294,08 ^c	13416,59 \pm 1224,49 ^c
C12.213F	59,52 \pm 40,74 ^{abc}	1366,00 \pm 119,08 ^a	1425,52 \pm 78,33 ^a
C12.219F	38,62 \pm 12,57 ^{abc}	9837,50 \pm 464,31 ^{bc}	9876,12 \pm 451,73 ^b

Ésteres etílicos

En el grupo de los ésteres fueron identificados cuatro compuestos, lactato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo. La concentración de cada uno obtenida a partir de cada levadura puede verse en la **Tabla 4.5**

Cuando se analiza el grupo aromático en general (ver **Figura 4.11**), la levadura con mayor concentración de esteres producidos es la *H. vineae* T12-151F y la M12-196F fue la que presentó menor concentración. El compuesto mayoritario dentro de este grupo es el lactato de etilo, asociado a descriptores a frutilla y frambuesa, producido en mayor medida por la cepa T12-151F, aunque sin grandes diferencias con el resto de las cepas.

Hexanoato y octanoato de etilo fueron los producidos en mayor concentración por la cepa *S. cerevisiae*, lo cual coincide con lo reportado por [Viana et al. \(2008\)](#) para las levaduras no-Saccharomyces *H. guilliermondii* y *H. osmophila*. Estos están asociados a aromas dulce, vinoso y frutado en el caso del octanoato y a banana, ananá y dulce, el hexanoato. Para el decanoato de etilo, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas. Probablemente la baja concentración de ésteres etílicos obtenida se deba a la concentración insuficiente de nitrógeno en el medio, ya que se ha visto que la formación de ésteres es dependiente de la disponibilidad de nitrógeno inicial [Carrau \(2003\)](#).

Tabla 4.5: Valores promedio de los ésteres etílicos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

	Lactato de etilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo	Decanoato de etilo	Suma de ésteres
M522	116,19 \pm 0,71 ^{bc}	32,30 \pm 0,42 ^c	21,24 \pm 0,24 ^d	8,03 \pm 0,71	177,77 \pm 2,12 ^{cd}
T02_05F	66,18 \pm 5,12 ^{ab}	3,26 \pm 0,28 ^{ab}	12,64 \pm 11,92 ^{bcd}	3,88 \pm 1,48	85,96 \pm 8,57 ^{abc}
T02_19F	80,73 \pm 16,57 ^{abc}	1,42 \pm 0,19 ^a	3,73 \pm 0,33 ^{ab}	11,61 \pm 1,45	97,50 \pm 18,53 ^{abc}
T02_25F	122,71 \pm 31,21 ^{bc}	4,75 \pm 0,71 ^{ab}	0,58 \pm 0,71 ^a	4,25 \pm 0,71	110,17 \pm 30,51 ^{bcd}
TE11_24F	121,13 \pm 62,38 ^{bc}	6,07 \pm 4,92 ^{ab}	2,49 \pm 0,54 ^a	6,22 \pm 0,38	135,9 \pm 67,1 ^{bcd}
TE11_48F	60,20 \pm 37,66 ^{ab}	1,90 \pm 1,03 ^a	1,45 \pm 0,56 ^a	2,28 \pm 0,12	65,83 \pm 39,36 ^{ab}
M12_111F	59,96 \pm 1,41 ^{ab}	7,53 \pm 5,34 ^b	8,39 \pm 8,80 ^{abc}	11,90 \pm 16,09	87,78 \pm 31,64 ^{ab}
T12_151F	174,32 \pm 121,97 ^c	8,10 \pm 0,86 ^b	17,31 \pm 0,71 ^{cd}	9,40 \pm 1,42	209,63 \pm 120,82 ^d
M12_184F	72,08 \pm 32,77 ^{ab}	2,63 \pm 2,82 ^{ab}	2,05 \pm 1,38 ^a	2,53 \pm 1,59	79,29 \pm 38,56 ^{ab}
M12_196F	ND \pm ND ^a	5,67 \pm 0,60 ^{ab}	4,71 \pm 3,13 ^{ab}	10,49 \pm 0,44	20,77 \pm 3,29 ^a
C12_213F	91,73 \pm 24,74 ^{abc}	1,45 \pm 0,19 ^a	1,59 \pm 1,32 ^a	10,84 \pm 1,69	105,61 \pm 21,92 ^{abc}
C12_219F	79,64 \pm 20,25 ^{abc}	3,72 \pm 0,29 ^{ab}	5,29 \pm 0,49 ^{ab}	2,40 \pm 2,14	91,05 \pm 22,58 ^{abc}

Ácidos

Este grupo de compuestos esta conformado por los ácidos butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico. Todos ellos son ácidos grasos de cadena media. En el gráfico de este grupo en la **Figura 4.11** se aprecia una marcada diferencia, entre lo producido por la levadura *Saccharomyces* y el conjunto de las *H. vineae*. Esto coincide con lo observado por [Viana et al. \(2008\)](#) para otras no-*Saccharomyces*, entre ellas *H. guilliermondii* y *H. osmophila*. Las no-*Saccharomyces* producen cantidades significativamente mas bajas de éstos ácidos en relación a *Saccharomyces*. Lo producido por M522 supera casi en 4 veces a lo que produjo la cepa *H. vineae* con mayor concentración de ácidos (T02_05F).

En general los compuestos de este grupo están asociados a los descriptores grasoso, queso y rancio, los cuales no son aromas deseados en un vino. A su vez se ha comprobado el efecto tóxico de éstos compuestos sobre *S. cerevisiae* y se especula que sobre otras especies de levadura [Fleet \(2003\)](#); [Viana et al. \(2008\)](#). Afectan la capacidad de las levaduras de absorción y retención de vitaminas, sobre todo a altas temperaturas y altas concentraciones de etanol [Bisson and Maynard \(1999\)](#). Este es un aspecto en favor de *H. vineae*, ya que si produjera altas concentraciones de éstos compuestos durante una fermentación mixta junto con *S. cerevisiae*, podría afectar la dinámica de la misma deviniendo en enlentecimiento o paradas de fermentación.

Tabla 4.6: Valores promedio de los ácidos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

	Ácido butanoico	Ácido hexanoico	Ácido octanoico	Ácido decanoico	Suma de ácidos
M522	132,64 \pm 0,71 ^g	460,56 \pm 0,80 ^e	875,34 \pm 2,12 ^e	95,58 \pm 2,33 ^{cd}	1564,12 \pm 3,54 ^e
T02_05F	59,49 \pm 6,10 ^{bc}	82,19 \pm 19,36 ^d	126,90 \pm 36,80 ^d	170,46 \pm 111,20 ^d	439,04 \pm 61,13 ^d
T02_19F	55,16 \pm 5,74 ^{ab}	66,78 \pm 3,74 ^{cd}	88,95 \pm 13,58 ^c	80,92 \pm 26,18 ^{bc}	291,81 \pm 41,75 ^c
T02_25F	103,84 \pm 5,11 ^f	56,74 \pm 18,31 ^{bcd}	76,93 \pm 19,69 ^{bc}	ND \pm ND ^a	237,51 \pm 43,11 ^{bc}
TE11_24F	73,44 \pm 1,80 ^{bcd}	52,12 \pm 19,20 ^{abc}	63,02 \pm 12,11 ^{bc}	29,57 \pm 8,62 ^{abc}	218,16 \pm 38,13 ^{bc}
TE11_48F	55,35 \pm 0,52 ^{ab}	67,73 \pm 20,72 ^{cd}	74,42 \pm 14,33 ^{bc}	20,41 \pm 2,65 ^{ab}	217,92 \pm 37,28 ^{bc}
M12_111F	60,35 \pm 24,65 ^{bc}	56,95 \pm 7,72 ^{bcd}	61,87 \pm 8,41 ^{bc}	18,30 \pm 6,86 ^{ab}	197,47 \pm 33,92 ^b
T12_151F	96,74 \pm 0,95 ^{ef}	39,60 \pm 4,30 ^{ab}	72,45 \pm 13,58 ^{bc}	12,96 \pm 2,84 ^{ab}	220,74 \pm 13,08 ^{bc}
M12_184F	71,71 \pm 4,18 ^{bcd}	53,94 \pm 5,83 ^{abc}	81,82 \pm 22,70 ^{bc}	17,96 \pm 11,51 ^{ab}	225,44 \pm 44,22 ^{bc}
M12_196F	78,30 \pm 1,73 ^{cde}	54,98 \pm 11,89 ^{abc}	49,81 \pm 8,48 ^{ab}	66,60 \pm 11,81 ^{abc}	248,69 \pm 33,91 ^{bc}
C12_213F	36,45 \pm 3,71 ^a	29,41 \pm 1,65 ^a	24,34 \pm 5,31 ^a	9,04 \pm 1,86 ^{ab}	99,25 \pm 9,23 ^a
C12_219F	83,32 \pm 21,98 ^{def}	42,30 \pm 5,94 ^{abc}	51,32 \pm 5,35 ^{ab}	9,06 \pm 12,81 ^{ab}	186,00 \pm 20,47 ^b

Isoácidos

Este grupo esta conformado por los ácidos isobutírico e isovalerico. En la **Figura 4.11** se puede observar que hay gran variabilidad entre las cepas en cuanto a las producción de este grupo de compuestos y entre ellas se destaca la *H. vineae* T12_151F.

De los compuestos que conforman éste grupo el ác. isobutírico se produjo en mayor concentración (ver **Tabla 4.7**) Las cepas de *H. vineae* mostraron una mayor producción de este compuesto frente a la *S. cerevisiae*, aunque diferencias significativas solo se ven para algunas cepas. Comúnmente se lo asocia a descriptores como amargo, sudor y agrio.

El ác. isovalerico fue producido en mayor concentración por la cepa M522 en comparación con las levaduras *H. vineae*. Produjo casi el doble que lo encontrado en la mayor productora dentro de *H. vineae*. Este compuesto está asociado a los descriptores queso y sudado.

Tabla 4.7: Valores promedio de los isoácidos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

	Ácido isobutírico		Ácido isovalerico		Suma de isoácidos	
M522	167,58	$\pm 0,71^a$	447,72	$\pm 0,90^h$	614,80	$\pm 1,41^{abc}$
T02_05F	300,73	$\pm 21,28^{ab}$	67,34	$\pm 10,21^{ab}$	368,07	$\pm 11,06^{ab}$
T02_19F	667,98	$\pm 52,15^{abc}$	145,95	$\pm 3,17^{cd}$	813,94	$\pm 48,98^{abcd}$
T02_25F	1102,43	$\pm 58,97^c$	369,38	$\pm 48,54^g$	1471,82	$\pm 107,51^d$
TE11_24F	973,49	$\pm 100,38^{bc}$	172,97	$\pm 7,71^{ef}$	1146,46	$\pm 108,09^{cd}$
TE11_48F	772,69	$\pm 211,81^{abc}$	117,37	$\pm 17,75^{bcd}$	890,06	$\pm 229,56^{abcd}$
M12_111F	1222,27	$\pm 731,21^c$	134,94	$\pm 12,32^{cd}$	1357,21	$\pm 743,52^{cd}$
T12_151F	2948,75	$\pm 790,86^d$	386,20	$\pm 26,07^g$	3334,94	$\pm 816,93^e$
M12_184F	661,03	$\pm 20,35^{abc}$	110,14	$\pm 13,93^{bc}$	771,17	$\pm 6,42^{abcd}$
M12_196F	947,21	$\pm 16,10^{bc}$	137,13	$\pm 4,71^{cd}$	1084,33	$\pm 11,39^{bcd}$
C12_213F	159,37	$\pm 21,02^a$	17,57	$\pm 1,25^a$	176,94	$\pm 19,77^a$
C12_219F	1293,61	$\pm 318,58^c$	225,91	$\pm 66,43^f$	1519,52	$\pm 385,01^d$

Terpenos

Como puede verse en el gráfica correspondiente a los terpenos. (**Figura 4.11**), solo 2 levaduras se destacaron en cuanto a su producción. No pudo observarse una diferenciación entre lo producido por *S. cerevisiae* frente al conjunto de las *H. vineae*. Los compuestos encontrados que conforman este grupo aromático son el citronelol, linalol y α -terpineol. La producción de cada compuesto, por levadura se puede ver en la **Tabla 4.8**

Solo para el caso del citronelol y la levadura T12_151F se logra alcanzar el umbral de detección de estos compuestos.

Lo que vale destacar es que éstos son compuestos considerados varietales, provienen de la uva y tanto la M522 como todas las cepas de *H. vineae* fueron capaces de producirlos a partir de un medio sintético similar a mosto de uva. Estos resultados coinciden con los reportado por [Carrau et al. \(2005\)](#) [Medina et al. \(2013\)](#)

Tabla 4.8: Valores promedio de los terpenos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

	Citronelol		Linalol		α -terpineol		Suma de terpenos	
M522	1,45	$\pm 0,35^{ab}$	1,47	$\pm 0,64^a$	4,11	$\pm 0,28^a$	7,13	$\pm 1,27^a$
T02_05F	2,74	$\pm 0,15^{ab}$	3,63	$\pm 2,05^{ab}$	3,60	$\pm 1,14^a$	9,97	$\pm 3,35^a$
T02_19F	2,04	$\pm 0,97^{ab}$	4,28	$\pm 0,44^{ab}$	3,03	$\pm 0,16^a$	9,35	$\pm 0,68^a$
T02_25F	0,98	$\pm 0,04^a$	3,69	$\pm 0,35^{ab}$	3,94	$\pm 0,08^a$	8,40	$\pm 0,47^a$
TE11_24F	ND	$\pm \text{ND}^a$	5,79	$\pm 3,62^{ab}$	3,46	$\pm 1,32^a$	9,25	$\pm 4,49^a$
TE11_48F	1,56	$\pm 0,23^a$	2,96	$\pm 1,11^{ab}$	3,85	$\pm 0,72^a$	8,37	$\pm 0,62^a$
M12_111F	10,74	$\pm 14,19^{bc}$	15,33	$\pm 20,44^b$	5,13	$\pm 4,32^a$	31,20	$\pm 38,96^{ab}$
T12_151F	18,86	$\pm 0,87^c$	14,60	$\pm 0,57^{ab}$	21,63	$\pm 0,52^b$	54,09	$\pm 0,22^b$
M12_184F	1,12	$\pm 1,09^a$	1,88	$\pm 0,42^a$	3,62	$\pm 2,24^a$	6,61	$\pm 1,57^a$
M12_196F	1,61	$\pm 1,05^a$	5,44	$\pm 0,42^{ab}$	5,44	$\pm 2,26^a$	12,40	$\pm 0,79^a$
C12_213F	1,35	$\pm 0,71^a$	3,02	$\pm 2,00^{ab}$	3,93	$\pm 4,26^a$	8,30	$\pm 6,96^a$
C12_219F	2,06	$\pm 1,40^{ab}$	5,42	$\pm 2,93^{ab}$	2,26	$\pm 1,52^a$	9,74	$\pm 0,01^a$

Sesquiterpenos

El nerolidol y el farnesol son los compuestos identificados dentro de éste grupo. No se encontró una diferencia marcada ni significativa, pero si una tendencia a una mayor producción dentro de las levaduras *H. vineae* donde se destaca la cepa T12_151F.

De los dos compuestos se produjo en mayor medida el farnesol, y para ambos también la mayor productora fue la cepa T12_151F. La cepa C12_213F es una gran productora de farnesol. Prácticamente no hay diferencias significativas entre cepas en cuanto a su capacidad de producir nerolidol, pudiendo observarse un poco mas de variabilidad en la producción de farnesol, los resultados se observan en la **Tabla 4.9**.

Tanto para terpenos como para sesquiterpenos se detectaron concentraciones bajas, pero lo destacable es el haber podido identificarlos y cuantificarlos en este tipo de fermentaciones que no están realizadas en mosto de uva, sino sobre un medio artificial similar al mosto. Normalmente estos compuestos provienen de las uvas, por lo que se los clasifica como compuestos aromáticos varietales. La biosíntesis de estos compuestos por parte de algunas levaduras fue reportada en el trabajo de [Carrau et al. \(2005\)](#). A partir de estos datos podría buscarse cuales son los factores que estimulan la producción de estos compuestos en pos de aumentar la concentración de los mismos por parte de las levaduras.

Tabla 4.9: Valores promedio de los sesquiterpenos identificados y la suma de los mismo en $\mu\text{g/L} \pm$ desvío estándar. Los datos con la misma letra, no difieren entre sí (Test LSD, nivel de confianza del 95 %)

	Nerolidol		Farnesol		Suma de sesquiterpenos	
M522	2,74	$\pm 0,35^a$	9,62	$\pm 0,42^{abc}$	12,36	$\pm 0,78^{ab}$
T02.05F	3,22	$\pm 0,84^a$	21,68	$\pm 0,93^{abcd}$	24,89	$\pm 1,78^{abc}$
T02.19F	2,13	$\pm 0,84^a$	6,49	$\pm 1,43^{ab}$	8,62	$\pm 2,27^{ab}$
T02.25F	2,26	$\pm 0,35^a$	3,71	$\pm 0,35^a$	5,97	$\pm 0,71^a$
TE11.24F	9,04	$\pm 10,36^{ab}$	16,84	$\pm 6,46^{abc}$	25,89	$\pm 16,82^{abc}$
TE11.48F	2,00	$\pm 0,12^a$	8,07	$\pm 2,23^{abc}$	10,07	$\pm 2,11^{ab}$
M12.111F	9,65	$\pm 9,55^{ab}$	30,80	$\pm 34,25^{bcd}$	40,45	$\pm 43,80^{bcd}$
T12.151F	16,36	$\pm 0,90^b$	45,58	$\pm 2,01^d$	61,94	$\pm ,92^d$
M12.184F	1,71	$\pm 1,49^a$	6,11	$\pm 7,65^{ab}$	7,82	$\pm 9,13^{ab}$
M12.196F	1,38	$\pm 0,81^a$	14,79	$\pm 1,40^{abc}$	16,17	$\pm 0,59^{ab}$
C12.213F	4,69	$\pm 3,17^a$	47,01	$\pm 16,41^d$	51,70	$\pm 19,58^{cd}$
C12.219F	2,06	$\pm 1,68^a$	33,41	$\pm 10,04^{cd}$	35,47	$\pm 8,36^{abcd}$

4.1.8. Evaluación sensorial

A partir de las boletas presentadas al panel semi-entrenado se obtuvo una frecuencia de descriptores seleccionados para cada fermentación con los cuales se realizó un análisis de clusters. Las fermentaciones con las distintas levaduras quedaron divididas en 5 grupos según los descriptores seleccionados para cada fermentación. En la **Figura 4.12** se pueden ver los grupos obtenidos y los descriptores de cada uno.

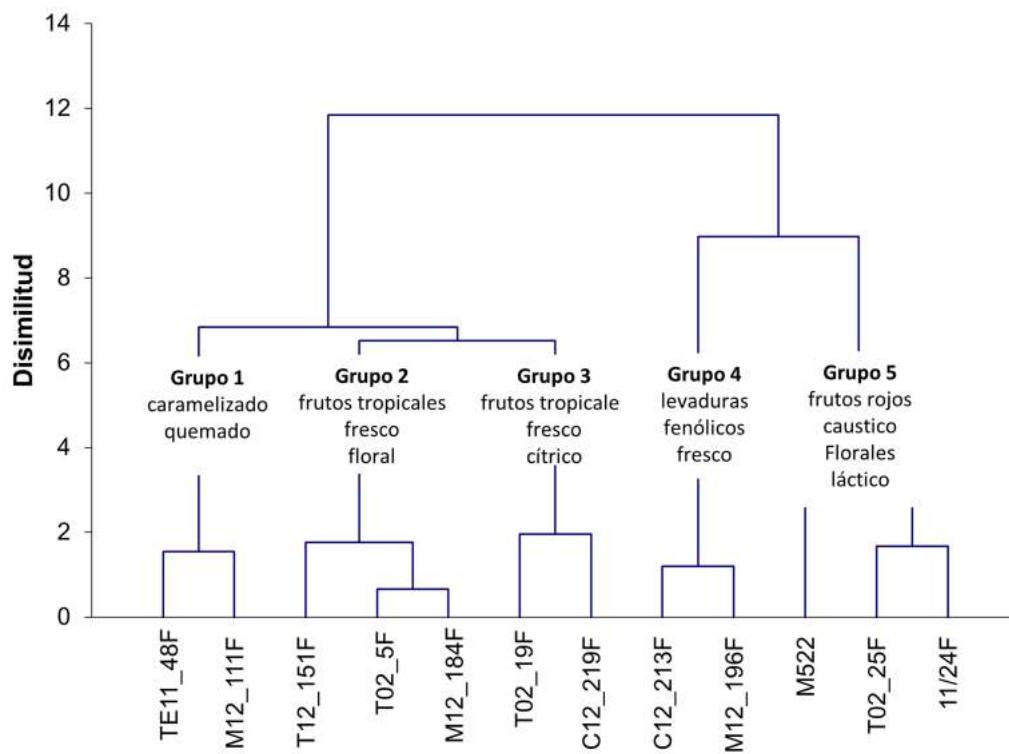


Figura 4.12: Composición de los grupos derivados de los descriptores aromáticos seleccionados durante la evaluación sensorial. Cada grupo fue seleccionado a partir del primer cambio grande de nivel

4.1.9. Determinación del tamaño del genoma y ploidía de *H. vineae*

El tamaño del genoma y el nivel de ploidía se analizaron mediante citometría de flujo usando gráficos lineales de intensidad de fluorescencia de las poblaciones de células teñidas con yoduro de propidio. Era de esperar que el genoma de *H. vineae* mostrara un cierto (aunque desconocido) nivel de ploidía dada su capacidad de esporulación Kurtzman et al. (2011a). Mediante esta técnica se discriminaron dos subpoblaciones celulares con diferente contenido de ADN, es decir, R1 y R2 (Figura) 4.13. Todas las muestras analizadas presentaron coeficiente medio de pico de la variación de R1 menor que 10% (datos no presentados), lo que indica mediciones de ADN de alta resolución. Como referencia para la estimación de ADN genómico se utilizaron dos cepas una haploide y otra diploide de *S. cerevisiae*, isogénicas de la cepa S288C secuenciada que contiene un genoma haploide de 12,16 Mb (a marzo de 2016) (Goffeau et al., 1996). El tamaño del genoma de cada cepa de *H. vineae* se estimó de acuerdo con la subpoblación R1 del perfil del ciclo celular (Figura) 4.13. El análisis por citometría de flujo reveló un tamaño del genoma de $17,92 \pm 3,96$ Mb para T02_05F y $16,61 \pm 0,83$ para T02_19F Mb (Tabla 4.10).

Tabla 4.10: Calculo del tamaño del genoma para las dos cepas analizadas de *H. vineae* (T02_05F y T02_19F)

	T02_05F	T02_19F
Tamaño del genoma (haploide) estimado mediante ensamblado del genoma (Mb)	11,33	11,37
Tamaño del genoma (diploide) estimado mediante citometría de flujo (Mb)	$16,65 \pm 0,76$	$18,28 \pm 3,22$

Estos valores fueron consistentes con los cálculos de bases genómicas (22,6 Mb) (Artículo en preparación por Giorello y colaboradores). Hay que tener en cuenta que el tamaño del genoma *H. vineae* se estimó usando *S. cerevisiae* como cepa de control, y hay cambios en el tamaño o forma de la célula que pueden afectar a la fluorescencia del yoduro de propidio detectada por el citómetro de flujo Haase and Lew (1997). Esto podría explicar las diferencias obtenidas en

la estimación del tamaño del genoma obtenidos mediante citometría de flujo o la secuenciación.

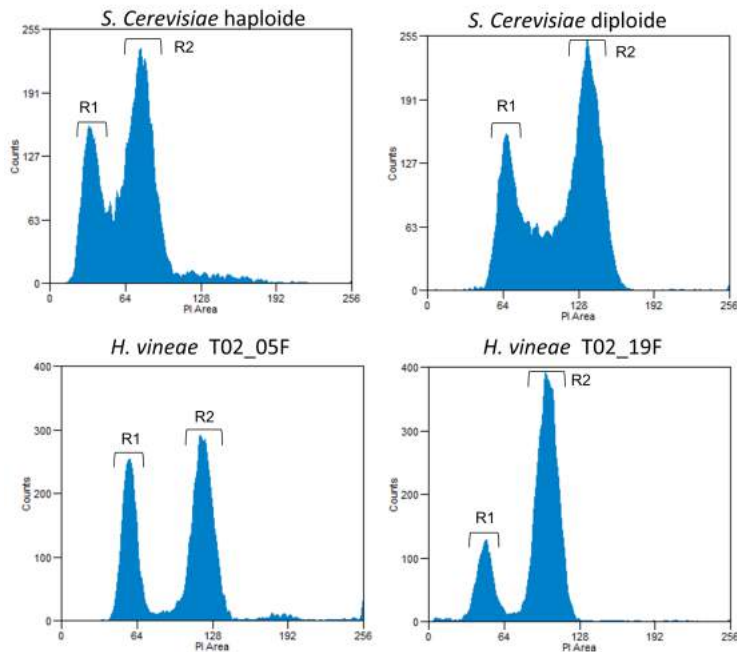


Figura 4.13: Análisis de citometría de flujo por fluorescencia. Fila superior de izquierda a derecha; cepas de *S. cerevisiae* control, derivadas de la cepa S288c: BY4742 (haploide, 12,1571 mb) y BY4743 (diploide, 24,31 Mb). Fila inferior de izquierda a derecha; Cepas de *H. vineae*: T02.05F y T02.19F.

4.1.10. Conclusiones

A partir de ésta caracterización se pudo ver que hay variabilidad entre las cepas estudiadas de la especie *Hanseniaspora vineae* para cada uno de los parámetros analizados. Aún así, para ciertas características se pudo observar un comportamiento común, pudiendo considerarse éstas, como típicas de la especie: actividad enzimática positiva (proteasa y β -glucosidasa a pH6) y pectinasa negativa, menor producción de ácidos grasos de cadena corta que *S. cerevisiae*, las *H. vineae* producen mayor concentración de alcohol bencílico y la que podría considerarse como la característica mas destacable de la especie, la alta producción de acetato β -feniletílico que para las condiciones en que se realizaron las fermentaciones en medio similar a mosto se produjo hasta unas 12 veces mas que en *S. cerevisiae*.

A partir del análisis de actividad enzimática se vio que todas las cepas presentaron actividad proteolítica, destacándose las cepas T02_05F, T02_25F y M12_111F.

En cuanto a la capacidad fermentativa de las levaduras se destacaron las cepas T02_25F y TE11_24F, incluso por sobre la *S. cerevisiae* M522 utilizada como control. A estas dos las siguieron en rendimiento las cepas T02_05F, M12_196F, C12_219F y M522.

En la producción de glicerol no se apreciaron grandes diferencias frente a lo producido por la levadura control. La cepa C12_213F fue la que produjo mayor concentración de éste compuesto. Esta levadura presento el rendimiento mas bajo durante la fermentación y la mayor producción de biomasa, por lo que se podría considerar que produjo una menor concentración de etanol.

Tres cepas T02_05F, TE11_48F y M12_184F se destacaron por su resistencia al anhídrido sulfuroso con niveles similares a los de la control M522.

La cepa T02_05F fue la que presento un mayor liberación de polisacaridos al medio, la que disminuyó hacia el final de la fermentación.

A partir del análisis de los compuestos aromáticos producidos se pudo ver una diferencia muy marcada en el grupo de los ácidos entre los producido por las cepas de *H. vineae* y lo que produjo la *S. cerevisiae* M522. Dentro del grupo de *H. vineae* prácticamente no se observó variabilidad y la cepa T02_25F produjo mas ácidos que el resto de las cepas. Estos ácidos generalmente se asocian a aromas desagradables. Es por ésto que la menor producción de ácidos por parte de las levaduras *H. vineae* implica una ventaja para su uso

en la vinificación.

En el grupo aromático de los acetatos en general también se pudo ver una diferenciación de comportamiento entre las levaduras. Las levaduras *H. vineae* produjeron más acetatos que *S. cerevisiae*. En este grupo el compuesto mayoritario fue el acetato β -feniletílico, superando aproximadamente en 12 veces lo producido por la M522, destacándose la levadura M12_196F.

Se evidenció variabilidad entre las cepas de *H. vineae* para este tipo de compuestos. La cepa T02_05F, junto con las cepas T02_19F y C12_213F fueron las que produjeron menor concentración de alcoholes. La cepa T02_25F se destacó por su mayor producción de alcoholes, a un nivel similar al producido por *S. cerevisiae*.

El alcohol isoamílico fue el compuesto mayoritario encontrado dentro de este grupo. En altas concentraciones puede resultar en el aporte de aromas no tan placenteros (frutado, vinoso y esmalte de uña) ver **Tabla 2.2**.

Las levaduras *H. vineae* se diferenciaron de la *S. cerevisiae* en la producción de alcohol bencílico, ya que en ésta no se detectó este compuesto. Entre las distintas cepas de *H. vineae* se observó variabilidad en la producción de este alcohol. La cepa M12_196F lo produjo en mayor concentración, aunque en todas las cepas se alcanzó el umbral de percepción (**Tabla 2.2**)

En los grupos ésteres, isoácidos, terpenos y sesquiterpenos la cepa que presentó una mayor producción fue la T12_151F.

A partir del análisis sensorial se obtuvieron 5 grupos de levaduras, identificados cada uno con un conjunto de descriptores aromáticos, donde la *Saccharomyces* quedó dentro del grupo asociado a descriptores no tan agradables.

Se constató la diploidía de las dos cepas estudiadas de *H. vineae* (T02_05F y T02_19F) mediante el análisis de su genoma por citometría de flujo y la comparación con los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de ambas cepas realizada por [Giorello et al. \(2014\)](#)

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos se seleccionó la cepa M12_196F (por su destacada producción de acetato β -feniletílico y alcohol bencílico) para estudiar la influencia de distintos compuestos nitrogenados sobre la producción de compuestos fenilpropanoides, importantes para determinar la calidad organoléptica de los vinos, y la cepa T02_05F se seleccionó para proseguir con los ensayos de fermentaciones a nivel semi industrial ya que fue una de las que presentó mayor actividad proteasa (junto con T02_25F y M12_111F),

estuvo entre las mejores fermentadoras, presento una formación moderada de glicerol y buena resistencia al SO_2 (T02_25F tuvo mayor producción de glicerol pero menor resistencia al SO_2). En cuanto a producción aromática, la T02_25F tuvo mayor concentración de compuestos en general, incluso de aquellos que aportan aromas no deseados y esto se vio reflejado en la evaluación sensorial ya que quedo en el grupo donde no estaban los mejores descriptores por lo que se descartó para los siguientes ensayos.

4.2. Efecto del nitrógeno sobre la composición de fenilpropanoides

En esta sección se pretende demostrar la influencia del nitrógeno sobre la síntesis de compuestos que estarían relacionados a los aminoácidos aromáticos y que influyen en la composición aromática de los vinos, por consiguiente en sus características organolépticas y se plantean dos posible rutas biosintéticas para la formación de los mismos. El alcohol bencílico y su acetato han sido asociados a descriptores como higo, tabaco y chocolate en la variedad Cabernet sauvignon [Francis et al. \(1998b\)](#), mientras que el alcohol β -feniletílico y el acetato β -feniletílico, ampliamente estudiado, se asocian a aromas florales y frutales [Viana et al. \(2009, 2011\)](#); [Medina et al. \(2013\)](#). En la primer parte de ésta Tesis se observo que la cepa de *H. vineae* M12_196F fue la mayor productora de esos compuestos y fue seleccionada para llevar adelante los ensayos de esta última sección. Los ensayos son, en medio artificial símil mosto, con diferentes concentraciones de nitrógeno (50, 75, 100 y 250 mgN/L) y variando la concentración de determinados aminoácidos y la presencia del ácido ρ -aminobenzoico. Se estudio la producción de alcohol bencílico, bencil acetato, alcohol β -feniletílico y su acetato, con el fin de determinar su influencia. El aumento de fosfato diamónico en el medio, una operación muy común en enología, disminuyó la producción de los fenilpropanoides. La fenilalanina, el triptofano y el ácido ρ -aminobenzoico favorecieron la formación de alcohol bencílico, en cambio el aumento en la concentración de tirosina disminuyó la formación del alcohol. El efecto de la fenilalanina sobre las fermentaciones con *H. vineae* es opuesto a lo observado en las fermentaciones con la cepa control de *S. cerevisiae*, por lo que a través del estudio de los genes presentes en *H. vineae* en comparación con los genes de *S. cerevisiae* se proponen dos rutas alternativas que puede tomar esta levadura no-*Saccharomyces* para la formación de los fenilpropanoides.

4.2.1. Diferencias en la producción de fenilpropanoides entre *S. cerevisiae* y *H. vineae*

Primero observaremos la diferenciación entre ambas especies de levaduras en la producción de estos compuestos. En la **Figura 4.14** se puede ver la concentración del compuesto acetato β -feniletílico, cuantificada durante la caracterización de las distintas cepas de *H. vineae* en la primer parte de ésta

Tesis, donde se puede observar como se destaca la cepa M12_196F. Es necesario volver a mencionar que la concentración producida por M522 (*S. cerevisiae*) comparado con lo producido por la mayoría de las *H. vineae*, es significativamente menor. Como se menciona en la primer sección se puede ver una amplia diversidad dentro de la especie *H. vineae*, ya que el rango de producción de éste compuesto va desde los 1800 a 13000 $\mu\text{/L}$. A su vez, corresponde mencionar que todas las levaduras, incluyendo a la *S. cerevisiae*, logran producir concentraciones superiores al umbral de percepción reportado para este compuesto (250 $\mu\text{/L}$) Carrau et al. (2008). No se encontró correlación entre la producción de feniletíl acetato y la tasa de fermentación observada para las levaduras en la sección , con la salvedad de la cepa C12_213F que presentó menor rendimiento fermentativo y fue la que produjo menor concentración de acetato β -feniletílico.

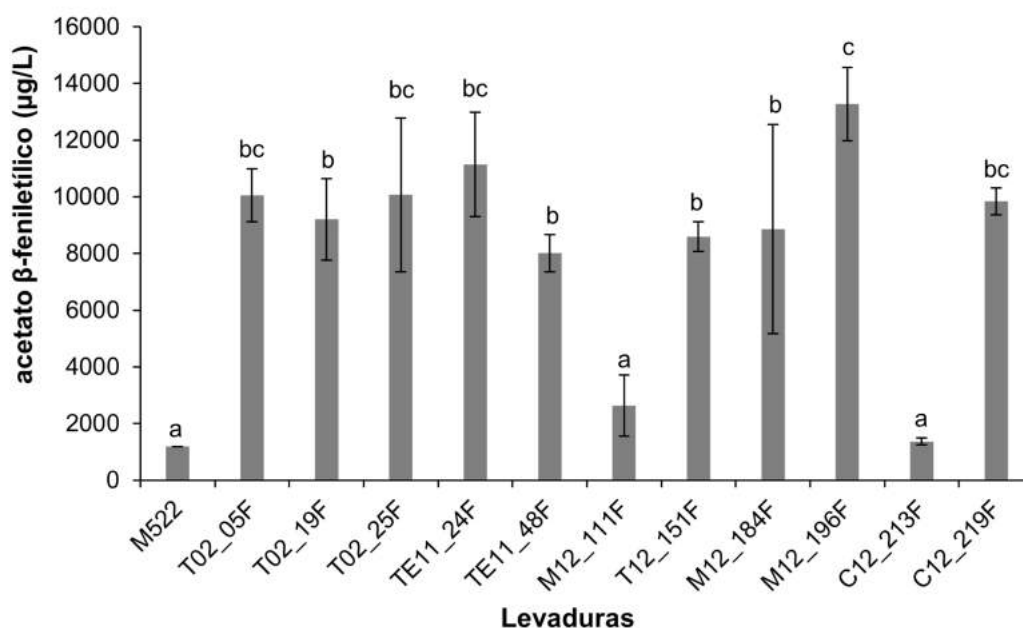


Figura 4.14: Producción de acetato β -feniletílico por cepas de *H. vineae* y la *S. cerevisiae* (M522). Las muestras con las mismas letras no presentan diferencias a un nivel de confianza del 95 %

En la **Figura 4.15** se muestra la formación de alcohol bencílico y alcohol β -feniletílico y sus correspondientes acetatos al final de la fermentación. Cuando la producción y acumulación de estos productos fue comparada para las 2 especies de levaduras, solamente se observó mayor concentración de alcohol β -feniletílico para *S. cerevisiae*.

Sin embargo, la suma de éste compuesto y su acetato fue superior en *H. vineae* lo que permite afirmar que la diferencia entre éstas 2 especies radica en su habilidad de acetilar el alcohol β -feniletílico a acetato β -feniletílico (podría decirse que el 56 % del alcohol fue acetilado en *H. vineae* mientras que en *S. cerevisiae* se acetiló menos del 2 % del alcohol). Pudo observarse prácticamente la misma relación en casi todas las cepas de *H. vineae* estudiadas en la sección anterior.

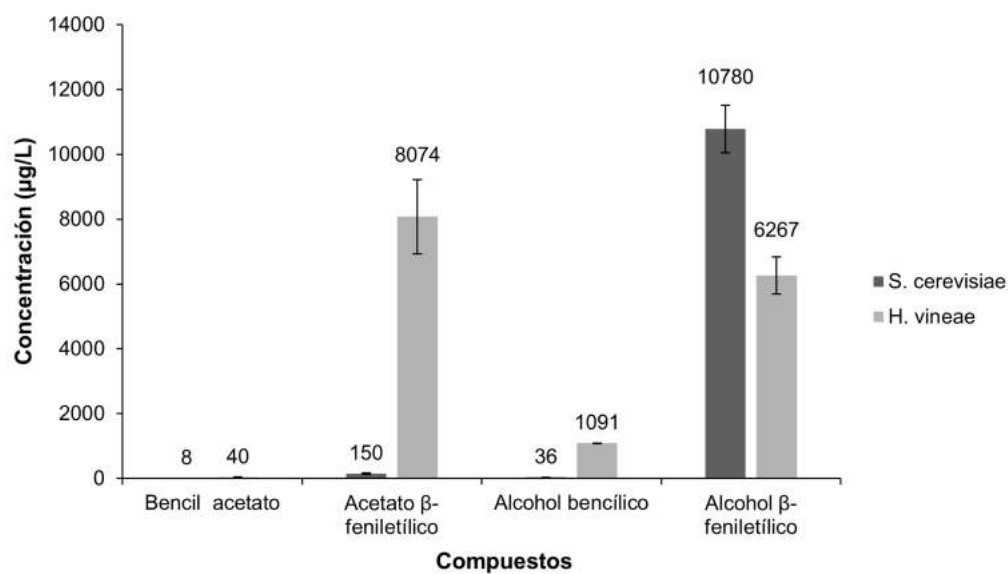


Figura 4.15: Producción de alcohol bencilico, alcohol β -feniletílico y sus acetatos por la cepa de *H. vineae* M12_196F y la *S. cerevisiae* M522

4.2.2. Efecto del nitrógeno inorgánico sobre la síntesis de fenilpropanoides

Los ensayos con diferentes concentraciones de amonio se diseñaron para investigar su efecto como posible regulador de la vía de síntesis de los fenilpropanoides. En la **Figura 4.16** se observa que el amonio ejerce un efecto negativo en la formación de los cuatro compuestos estudiados. En el caso de los alcoholes la inhibición en su síntesis a los 250 mgN/L fue notoria. Este comportamiento en ambos alcoholes podría sugerir un efecto inhibitorio del nitrógeno en cierto punto de la vía biosintética de estos alcoholes como ya fue propuesto para otros alcoholes superiores en *S. cerevisiae* por [Carrau et al. \(2008\)](#).

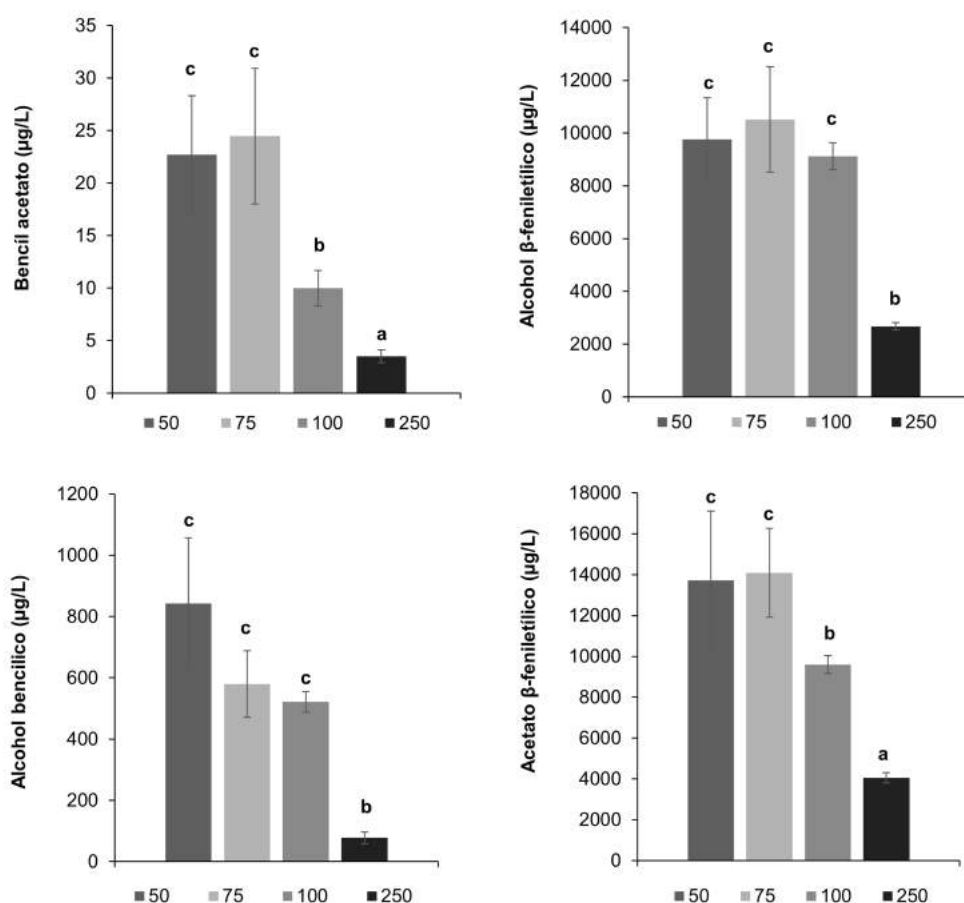


Figura 4.16: Producción de alcohol bencílico, alcohol β -feniletílico y sus acetatos a diferentes concentraciones de YAN ajustadas con fosfato diamónico por la cepa de *H. vineae* M12_196F. Las muestras con las mismas letras no presentan diferencias a un nivel de confianza del 95 %

Estos resultados sugieren que el incremento en el uso de fosfato diamónico (DAP) durante la vinificación, principalmente utilizada con el fin de incrementar la producción de ésteres, puede disminuir la producción de compuestos fenilpropanoides, comprometiendo la complejidad final en el “flavor” del vino.

Además del efecto de amonio sobre el alcohol bencílico (BAL), también se estudio el efecto de distintas concentraciones de amonio sobre la formación de alcohol ρ -hidroxi bencílico (ρ -HBAL), benzaldehído (BD) y ρ -hidroxibenzaldehído (ρ -BD). En la **Figura 4.17** se puede observar que al igual que para el caso de los alcoholes en la **Figura 4.16**, el agregado de amonio tiene un efecto negativo sobre la formación de estos compuestos. Ésta respuesta es mas significativa sobre la formación de BAL y ρ -HBAL que muestran una disminución de 501 y 302 μ /L respectivamente cuando se aumenta la concentración de YAN de 75 a 250 mgN/L. Un comportamiento similar, pero en bajas concentraciones, se puede ver en los aldehídos (BD y ρ -HBD). Este comportamiento podría sugerir una participación de éstos compuestos como intermediarios en la formación de alcoholes. El comportamiento observado en los alcoholes (BAL y ρ -HBAL), sumado a los datos obtenidos para el alcohol β -feniletílico, podría indicar un efecto inhibitorio o una re-orientación del nitrógeno inorgánico en algún paso de la ruta biosintética de éstos compuestos, como se mostró en la formación de otros alcoholes superiores en *S. cerevisiae* [Carrau et al. \(2008\)](#). A su vez en este trabajo el comportamiento de BAL a bajas concentraciones de YAN se contrapone a lo descrito en [Carrau et al. \(2008\)](#) para *S. cerevisiae* donde la concentración de alcoholes superiores aumentaba cuando se subía la concentración de YAN entre 0 y 100 mg/L, mientras que para *H. vineae* la concentración de BAL disminuye cuando se pasa de 50 a 75mgN/L.

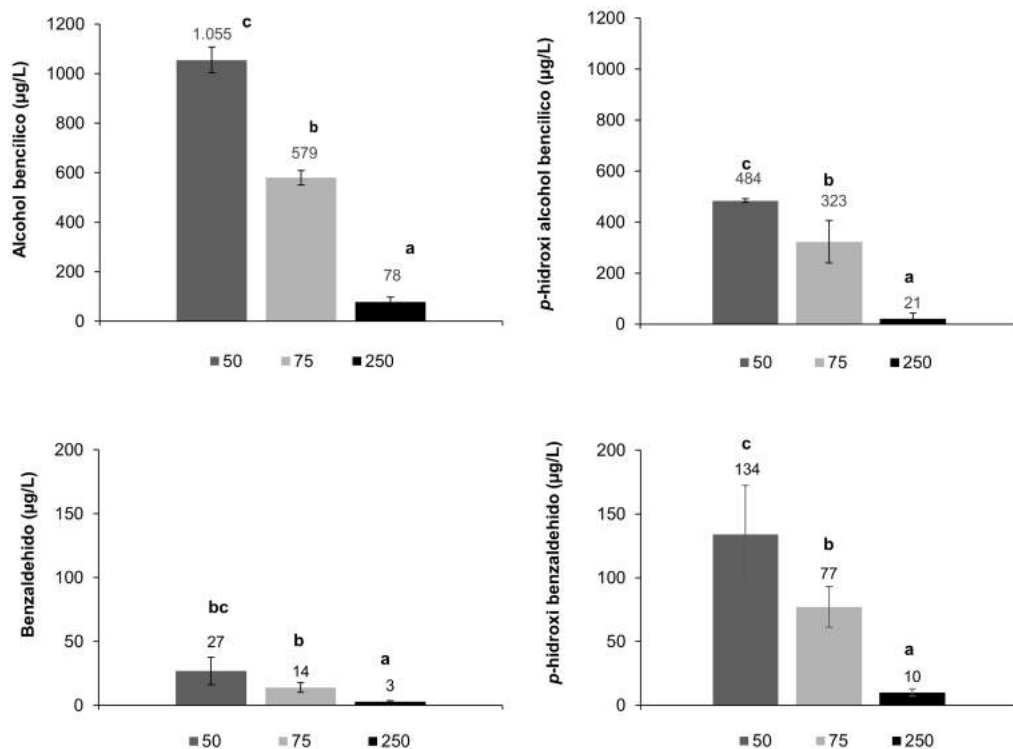


Figura 4.17: Formación de alcohol bencílico, benzaldehído, ρ -hidróxi alcohol bencílico, ρ -hidroxibenzaldehído por las cepa de *H. vineae* M12_196F en medio símil mosto con niveles de YAN diferentes (50, 75 y 250 mgN/L) obtenidos por el agregado de DAP. Las letras indican el nivel de significancia ($p \leq 0.001$) según test LSD ANOVA calculado para cada tratamiento.

4.2.3. Efecto de los aminoácidos sobre los compuestos bencenoides

Los compuestos bencenoides y fenilpropanoides suelen encontrarse en las distintas variedades de uvas. Contribuyen significativamente a la composición aromática de los vinos durante la vinificación o el envejecimiento en barrica [Hjelmeland and Ebeler \(2015\)](#). Compuestos como el alcohol β -feniletílico y el alcohol bencílico representan entre el 10-51 % del total de la fracción de hidrolizados volátiles de distintas variedades de uvas como Chardonnay [Sefton et al. \(1993\)](#), Cabernet Sauvignon, Merlot [Francis et al. \(1998a\)](#), Tannat [Boido et al. \(2003\)](#) y Pinot Noir [Fang and Qian \(2006\)](#). Aportan notas florales y frutadas a los vinos [González-Barreiro et al. \(2015\)](#). El origen de éstos compuestos esta fuertemente asociado al metabolismo de las plantas pero no ha sido descrita aún su síntesis por parte de las levaduras, por lo que es necesario considerar

y estudiar el origen de estos en levaduras. Experimentos con diferentes concentraciones de los aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptofano (Trp) y con presencia o ausencia de ácido ρ -aminobenzoico (ρ -ABA) fueron diseñados para ver el efecto de éstos nutrientes sobre la formación de BAL, ρ -HBAL, BD y ρ -HBD, ya sea por ser precursores o ser reguladores en la vía biosintética de la formación de BAL y BD (considerando al fenilpiruvato como posible precursor) y de ρ -HBAL y ρ -HBD (considerando al ρ -hidróxi fenilpiruvato como otro posible precursor). En la **Figura 4.18** se puede ver el efecto de omitir o duplicar la presencia de cada uno de los aminoácidos aromáticos y el efecto de la presencia o ausencia de ρ -ABA, manteniendo el nivel de YAN constante en 100 mgN/L. Como era esperable para *H. vineae*, BAL se produjo en concentraciones que superaban hasta en 30 veces lo producido por *S. cerevisiae* EC1118. Se pudo observar que para *H. vineae*, la adición de Phe y ρ -ABA incrementó significativamente la producción de BAL, mientras que la Tyr tuvo el efecto contrario. El incremento significativo en la formación de BAL por *H. vineae* con el agregado de Trp a bajas concentraciones (aumenta la formación de BAL cuando se sube el YAN de 50 a 75 mgN/L) puede ser explicado si la síntesis *de novo* de éste alcohol ocurre a partir de azúcares. Es sabido que para algunas cepas de *S. cerevisiae* el Trp es estimulador de los primeros pasos en la vía del corismato, a diferencia de Phe y Tyr que son inhibidores Braus (1991), lo que está en concordancia con los datos obtenidos en éste trabajo, y que se muestran en la **Figura 4.18** para la *S. cerevisiae* EC1118. Este hecho, sumado a que Trp no puede ser precursor catabólico de BAL, sirve de apoyo a la hipótesis de la síntesis *de novo* de éstos compuestos a través del incremento de disponibilidad de corismato en la vía de formación de BAL. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones con diferentes dosis de Trp, ya que al doblar la concentración de éste aminoácido los niveles de BAL disminuyen, mostrando un comportamiento bi-modal (**Figura 4.18**).

La presencia o ausencia de ρ -ABA afectó ambas levaduras por igual y la presencia de ρ -ABA incrementó la formación de BAL.

Recientemente se reportó para *S. cerevisiae* que cambios en la expresión del gen de la ρ -ABA sintasa (ABZ1) tiene un efecto significativo en la síntesis de varios compuestos aromáticos regulados por nitrógeno como el alcohol β -feniletílico Steyer et al. (2012). Los resultados obtenidos en éste trabajo muestran un comportamiento similar de BAL, ρ -HBAL y alcohol β -feniletílico por la adición de ρ -ABA para *H. vineae*. Cuando se compara entre ambas

levaduras se ven efectos opuestos de la Phe en formación de BAL. El incremento significativo en los niveles de BAL cuando se duplica la concentración de Phe apoya la hipótesis de que el catabolismo de Phe incrementa el flujo de fenilpiruvato a la vía del corismato.

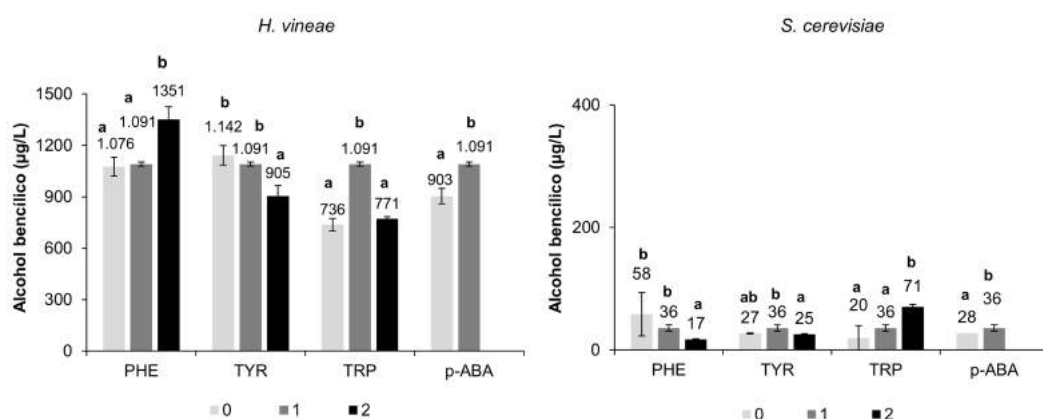


Figura 4.18: Formación de alcohol bencílico por *H. vineae* M12_196F (izquierda) y *S. cerevisiae* EC1118 (derecha) con un YAN constante de 100 mgN/L pero omitiendo (0), con concentración normal (1) o el doble (2) de los 3 aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptofano (Trp), fosfato diamónico (DAP) fue utilizado quitándolo o agregándolo según el caso para mantener el nivel constante de YAN. Para el caso del ácido ρ -aminobenzoico (ρ -ABA) solo se analizó quitándolo (0) o a concentración normal (1). Las letras indican el nivel de significancia ($p \leq 0.01$) según test LSD ANOVA calculado para cada tratamiento.

En la **Figura 4.19** se puede ver que la producción de ρ -HBAL por *H. vineae* es significativamente diferente a lo producido por *S. cerevisiae* ya que este compuesto en las fermentaciones realizadas con la *S. cerevisiae* EC1118, fue encontrado en niveles tan bajos que no se pudo cuantificar.

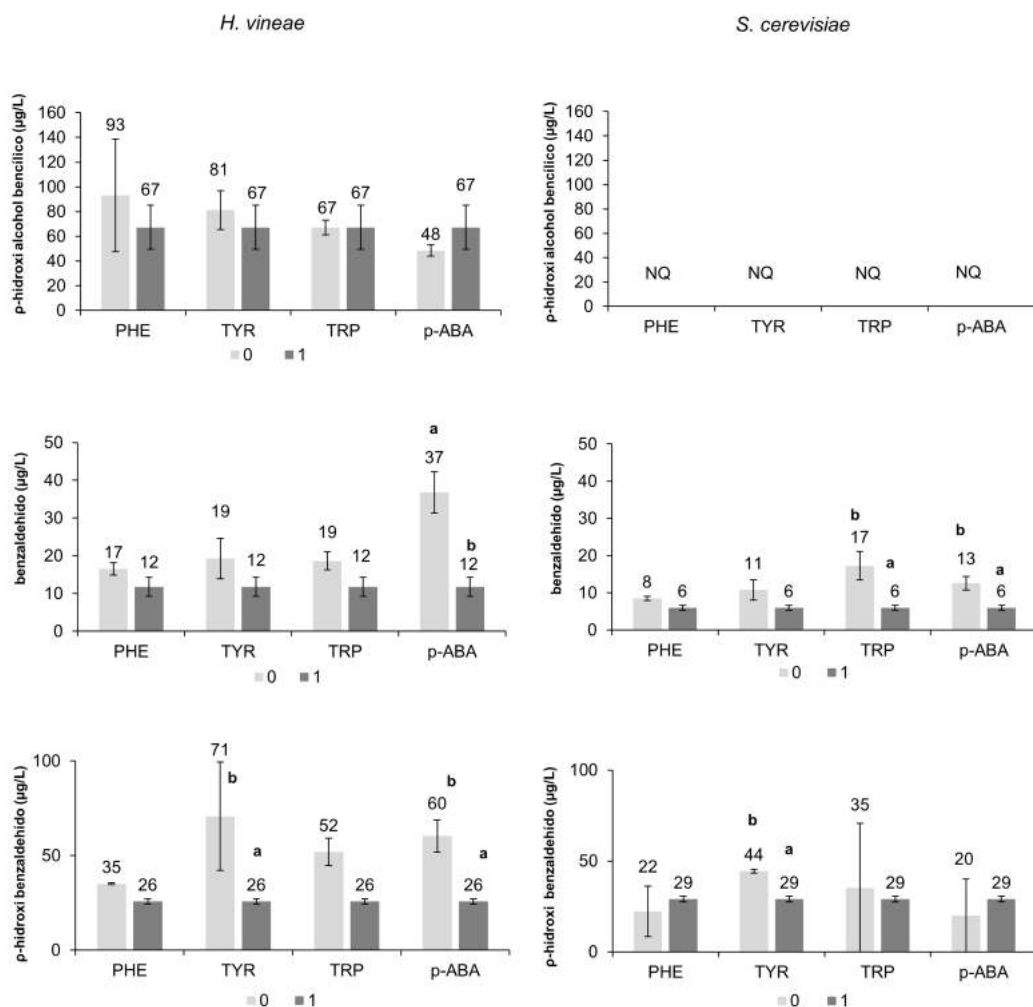


Figura 4.19: Formación de los compuestos ρ -hidroxi alcohol bencílico, benzaldehído, y ρ -hidroxi benzaldehído por *H. vineae* M12_196F (izquierda) y *S. cerevisiae* EC1118 (derecha) con un YAN constante de 100 mgN/L pero omitiendo (0) y con concentración normal (1) de los 3 aminoácidos fenilalanina (PHE), tirosina (TYR) y triptofano (TRP) y el ácido ρ -aminobenzoico (ρ -ABA). Fosfato diamónico (DAP) fue utilizado quitándolo o agregándolo según el caso para mantener el nivel constante de YAN. Las letras indican el nivel de significancia ($p \leq 0.01$) según test LSD ANOVA calculado para cada tratamiento. NQ indica que no pudo ser cuantificado.

4.2.4. Propuestas de vías metabólicas para la formación de fenilpropanoides

A partir de la secuenciación del genoma realizada por [Giorello et al. \(2014\)](#) fue posible verificar la presencia o ausencia de genes involucrados en las vías metabólicas para la formación de compuestos bencenoides y fenilpropanoides. En la **Tabla 4.11** se muestran los genes presentes o ausentes, relacionados a estas vías en *H. vineae* y también se muestra el porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos de cada gen entre las dos especies.

Tabla 4.11: Comparación de genes relacionados al metabolismo de bencenoides y fenilpropanoides en los genomas de *H. vineae* y *S. cerevisiae* EC1118

Clase de compuesto	Actividad enzimática	Genes identificados a
Alcoholes superiores	transferasa de aminoácidos aromáticos	ARO8 (59,84), ARO9 (42,70)
	transferasa de aminoácidos de cadena ramificada	<i>BAT1</i> (72,84), <i>BAT2</i>
	decarboxilasa	<i>ARO10</i> (34,1), <i>PCD1</i> (80,46), <i>PDC5</i> , <i>PDC6</i> , <i>THI3</i>
	alcohol deshidrogenasa	<i>ADH1</i> , <i>ADH2</i> (78,74), <i>AHD3</i> (74,80), <i>ADH4</i> , <i>ADH5</i> , <i>ADH6</i> (68,16), <i>ADH7</i> , <i>SFA1</i> (68,16), <i>GRE2</i> (50,73), <i>YPR1</i> , <i>PAD1</i> , <i>SPE1</i> , <i>OYE2</i> (58,06), <i>HOM2</i> (78,24)
	aril alcohol deshidrogenasa	<i>AAD3</i> , <i>AAD1</i> , <i>AAD6</i> , <i>AAD10</i> , <i>AAD14</i> , <i>AAD15</i> , <i>AAD16</i>
	regulación	<i>ARO80</i> (34,80), <i>CAT2</i> , <i>CLN3</i> , <i>CZF3</i> , <i>DAL80</i>
Ésteres de acetato	alcohol acetil transferasa	<i>ATF1</i> , <i>ATF2</i> (26,58)
Ácidos orgánicos volátiles	aldehído deshidrogenasa	<i>ALD2</i> (44,01), <i>ALD3</i> , <i>ALD4</i> , <i>ALD5</i> (53,45), <i>ALD6</i> (55,07)
Síntesis de ρ -ABA	síntesis de ρ -ABA desde corismato	<i>ABZ1</i> (40,59), <i>ABZ2</i> (35,52)
Síntesis de aminoácidos aromáticos	síntesis de corismato, fenilalanina triptofano y tirosina	<i>ARO1</i> (66,79), <i>ARO2</i> (80,59), <i>ARO3</i> (77,03), <i>ARO4</i> (83,51), <i>TRP2</i> (70,84), <i>TRP3</i> (69,14), <i>ARO7</i> (67,97), <i>PHA2</i> (41,99), <i>TYR1</i> (62,37)
Síntesis de alcohol bencílico y benzaldehído	vía del mandelato	<i>ARO10</i> , <i>PDC1</i> , <i>SCS7</i> (66,5), <i>ALD6?</i> , <i>ALD2?</i> , <i>DLD1</i> (53), <i>DLD2</i> (70), <i>DLD3</i>

^aSe indican los genes ausentes (tachados) o presentes; los porcentajes entre paréntesis indican la similaridad en las secuencias de aminoácidos entre ambas especies. Los genes *ARO* requieren aminoácidos aromáticos; *ARO10*, fenilpiruvato decarboxilasa; *ALD*, aldehído deshidrogenasa; *ABZ*, síntesis de ρ -ABA; *ADH*, alcohol deshidrogenasa; *ATF*, acetil alcohol transferasa; *BAT*, transferasa de aminoácidos de cadena ramificada; *DLD*, D-lactato deshidrogenasa; *GRE2*, metil glioxal reductasa NADPH-dependiente; *HOM2*, aspártico β -semialdehído deshidrogenasa; *OYE2*, NADPH oxidoreductasa; *PDC*, piruvato decarboxilasa; *PHA2*, pafenato dehidratasa; *SCS7*, esfingolípido α -hidroxilasa; *TYR*, pafenato dehidrogenasa; *TRP*, síntesis de triptofano; *SFA1*, alcohol deshidrogenasa y formaldehído deshidrogenasa bifuncional.

Vías de formación de los alcoholes bencílico y ρ -hidróxi bencílico en *H. vineae*

Tanto para *H. vineae* como en otras levaduras esta confirmado que no existe la vía de la fenilalanina amonio-liasa/tirosina amonio-liasa (PAL/TAL). Por ésto que deben existir vías alternativas a la simple conversión de PHE a los ácidos cinámicos precursores de los bencenoides [Widhalm and Dudareva \(2015\)](#)

Fueron propuestas 3 vías alternativas a la (PAL/TAL) para producir hidroxibenzoatos en *S. cerevisiae*. La vía de formación directa a partir de corismato como en algunas bacterias con corismato piruvato-liasa [Siebert et al. \(1992\)](#), una vía no oxidativa propuesta para plantas con una reacción retro-aldol desde ρ -hidroxicumarato y la vía del peroxisoma β -oxidativa con formación de acetil-CoA [Clarke \(2000\)](#). No se pudieron encontrar homologías en los genes para la primera de las vías propuestas. La segunda y tercera alternativa también son descartadas ya que utilizan como intermediarios ácidos cinámicos o intermediarios de éstos, como vinílfenol y vinílguaiacol que no pueden ser sintetizados ni por *S. cerevisiae* ni por *H. vineae* en el medio artificial símil mosto, como se puede ver en el análisis de los compuestos aromáticos producidos por cada levadura en la primer sección de éste capítulo. Ésto afirma el hecho de que éstas vías no pueden estar activas en las condiciones en que fueron realizados los ensayos. El paso enzimático clave propuesto para la conversión de ρ -hidroxifenil lactato a ρ -cumarato [Meganathan \(2001\)](#) [Clarke \(2000\)](#) no ha sido demostrado para levaduras.

Vías de fenilpiruvato y ρ -hidroxi fenilpiruvato a bencenoides

A partir del análisis de los genes involucrados en las vías metabólicas de bencenoides y fenilpropanoides presentes o ausentes en *H. vineae* comparado con *S. cerevisiae* (ver Tabla [4.11](#)) se proponen las vías de formación de alcohol bencílico y ρ -hidroxi alcohol bencílico desde fenilpiruvato y ρ -hidroxy fenilpiruvato respectivamente **Figura 4.20**.

La síntesis de bencenoides en plantas a través de fenilpiruvato como alternativa a la vía fenilalanina amonio-liasa (*PAL*) ha sido sugerida dentro de múltiples vías putativas [Orlova et al. \(2006\)](#) pero no ha sido bioquímicamente probado aún [Widhalm and Dudareva \(2015\)](#). Esta vía a través de fenilpiruvato ha sido propuesta también para el hongo *Bjerkandera adusta* [Lapadatescu et al. \(2000\)](#) pero no se pudo probar aún, ya que éstos hongos poseen la habilidad de formar derivados de los ácidos *trans* cinámicos a través de *PAL*, como se mencionó para muchos hongos basidiomicetes y algunos ascomicetes [Hyun et al. \(2011\)](#). Se realizaron estudios mediante el marcado de fenilalanina y ácido cinámico [Lapadatescu et al. \(2000\)](#) donde se muestra que la fenilalanina produjo un porcentaje mayor de alcohol bencílico en *B. adusta*, sugiriendo que la fenilalanina puede estar usando dos vías paralelas a través de *PAL* y

del fenilpiruvato, mientras que el ácido cinámico marcado utilizó solo la vía β -oxidativa y/o la vía no oxidativa (ver Figura 4.20). La ausencia de *PAL* en *H. vineae* sugiere que los bencenoides son necesariamente dependientes de la síntesis *de novo* desde corismato. A través del análisis genómico realizado para *H. vineae* (artículo en preparación) se comprobó la presencia de todos los genes que codifican para las enzimas de la vía del corismato, de *ARO7* (corismato mutasa) y de los genes *PHA2/TYR1* (ver Figura 4.20) lo que implica que ésta levadura puede sintetizar fenilalanina y ρ -hidroxi fenilpiruvato a través de prefenato tal como sucede con *S. cerevisiae* [Martin et al. \(2016b\)](#).

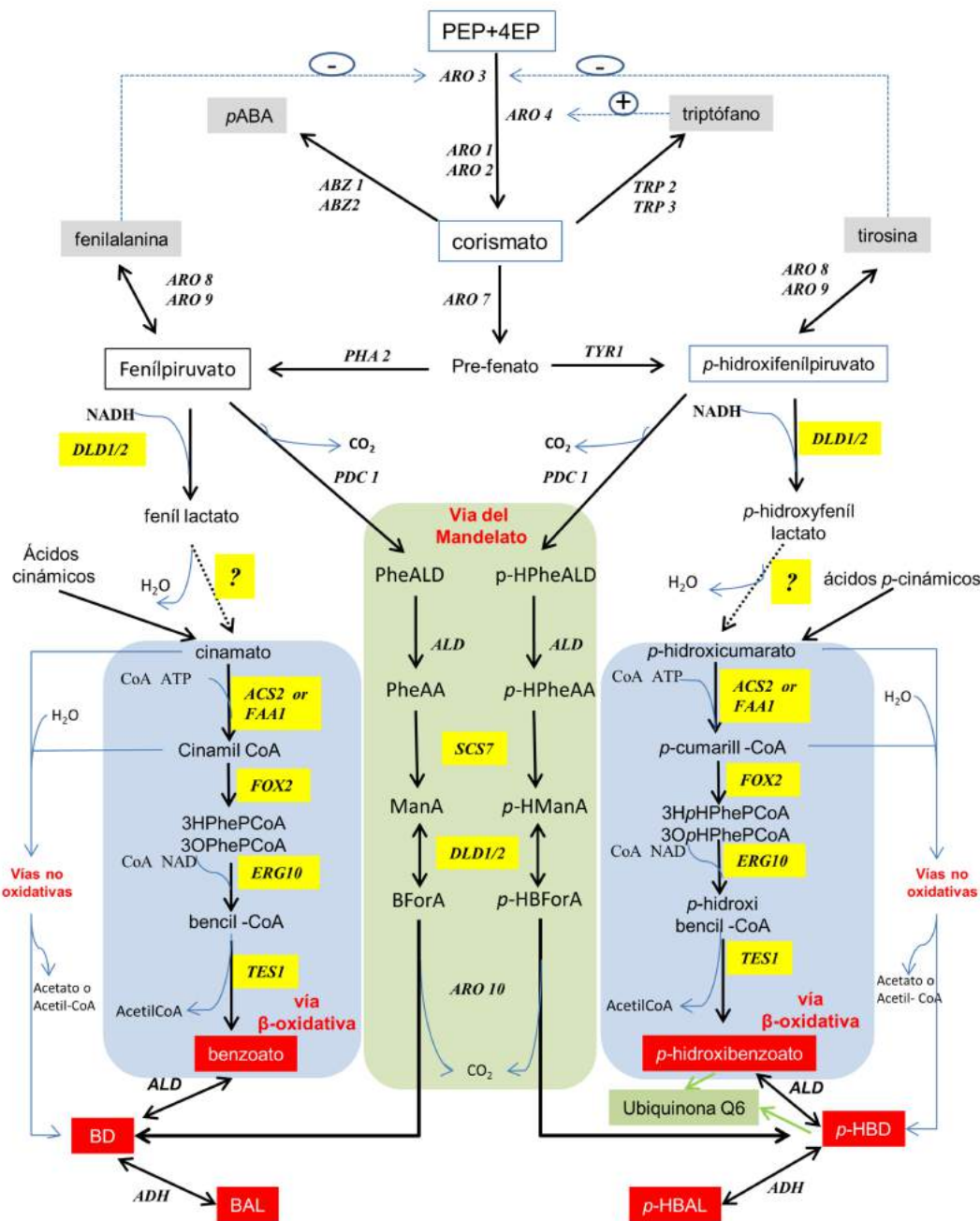


Figura 4.20: Vías propuestas para la formación de alcohol bencílico (BAL), benzaldehído (BD), ρ -hidroxi alcohol bencílico (ρ -HBAL) y ρ -hidroxi benzaldehído para *H. vineae* a través de la vía del corismato, con fenilpiruvato y ρ -hidroxi fenilpiruvato como intermediarios. La presencia de genes que codifican enzimas catalizadoras de diferentes pasos de las vías fue confirmada mediante análisis genéticos de *H. vineae* en comparación con *S. cerevisiae* y con plantas (resaltados en amarillo).

Vía del mandelato a bencenoides en levaduras

Sobre la base de los estudios e informes previamente realizados en este trabajo de tesis, se propone la vía del mandelato como una ruta de formación de ácidos no-cinámicos a bencenoides, como una vía alternativa para las levaduras y otros organismos que carezcan de *PAL*. Aunque se ha propuesto para hongos con algunas interpretaciones poco claras, como fue discutido previamente por [Lapadatescu et al. \(2000\)](#), la funcionalidad de la vía del mandelato ha sido recientemente demostrada en bacterias genéticamente modificadas [Pugh et al. \(2015\)](#). En esta Tesis se propone que en *H. vineae* los genes *ARO10*, *SCS7* y *DLD1/2* pueden participar en esta vía, ya que son conocidos por producir proteínas con una amplia capacidad funcional, incluyendo reacciones con mandelato, fenilpiruvato o fenilactato [Smekal et al. \(1993\)](#). La amplia divergencia encontrada en *ARO10* y las proteínas *DLD1* entre *H. vineae* y *S. cerevisiae* (ver Tabla 4.11) puede explicar la capacidad de *H. vineae* para sintetizar compuestos bencenoides. A partir de los resultados aquí presentados, la función probada de ρ -hidroxibenzoato como intermediario de la ubiquinona y la incapacidad de ambas especies de levadura para sintetizar ácidos cinámicos, la vía propuesta en la **Figura 4.20** tiene un buen sustento. Serán necesarios estudios mas exhaustivos con fenilalanina marcada con carbono ^{13}C .

Tanto la divergencia en la secuencia de los genes involucrados en éstos pasos como el hecho de que estas enzimas han sido reportadas por mostrar actividad ya sea para fenilpiruvato o compuestos derivados del ρ -hidroxi fenilpiruvato [Sun et al. \(2011\)](#); [Heider and Fuchs \(1997\)](#), permiten sugerir una vía similar para la formación de ambos alcoholes. Después de la vía del mandelato, produciendo benzoato o hidroxibenzoato (y sus aldehídos correspondientes), el alcohol bencílico y el alcohol ρ -hidroxi bencílico se pueden formar por aril alcohol deshidrogenasa (Aad) o alcohol deshidrogenasas (*ADH*) [Dickinson et al. \(2003\)](#). Las vías β -oxidativas y no oxidativas de los ácidos cinámicos, principalmente observadas en plantas, y su relación con los aminoácidos aromáticos y los cuatro bencenoides analizados en este trabajo y formados por la vía del mandelato se muestran en la **Figura 4.20**.

4.2.5. Conclusiones

En definitiva, en esta sección de la Tesis se pudo ver que el agregado de nitrógeno inorgánico en el medio afecta negativamente la formación de los alcoholes bencílico y β -feniletílico. Este es un aspecto interesante a tener en cuenta ya que una práctica habitual en bodega es el agregado de fosfato diamonio (DAP) como suplemento para asegurar el correcto desarrollo de la fermentación y para potenciar la formación de ésteres, lo que puede afectar la producción de fenilpropanoides que aportan complejidad al vino.

Se vio que la producción de alcohol bencílico y de ρ -hidroxi alcohol bencílico por *H. vineae* durante la fermentación fue de 1-2 ordenes de magnitud superior a lo producido por *S. cerevisiae* bajo las mismas condiciones de fermentación en medio símil mosto.

Cambios en la composición del medio en cuanto a su contenido de Phe, Trp y ρ -ABA mostraron un incremento en la producción de BAL, mientras que la Tyr y el amonio disminuyeron los niveles de BAL producidos.

Cambios en los diferentes nutrientes nitrogenados asimilables por las levaduras pueden aumentar o disminuir hasta 17 veces los niveles de BAL producidos por *H. vineae*. Al duplicar los niveles de Phe en el medio aumenta significativamente la formación de BAL en *H. vineae*, comportamiento opuesto al que se pudo ver en *S. cerevisiae*. Esto sugiere que la formación de BAL por *H. vineae* puede tener 2 orígenes distintos, por la vía del corismato partiendo de azúcares, así como del catabolismo de la fenilalanina. Ambas vías con el fenilpiruvato como intermediario y la subsecuente formación de mandelato a través de la *ARO10* decarboxilasa.

La ausencia de las vías PAL y TAL y los altos niveles de BAL producidos por *H. vineae* la convierten en un modelo eucariota ideal para mejorar nuestro entendimiento de la síntesis de bencenoides en comparación con plantas y hongos donde si están presentes las vías PAL/TAL lo que complejiza el análisis metabólico.

4.3. Vinificaciones a nivel semi-industrial

Se realizaron fermentaciones con *H. vineae* en mostos naturales de las variedades Macabeo y Merlot. En los casos de *H. vineae* no se inocularon posteriormente con *S. cerevisiae* sino que se dejaron que continuaran de manera espontánea. Hacia el final de la fermentación se impuso la levadura *S. cerevisiae* presente en la bodega como era de esperar, pero *H. vineae* mantuvo una alta presencia hasta la mitad de la fermentación y fue posible detectarla mediante técnicas moleculares hasta el final de la misma. En cambio, en las inoculadas con *S. cerevisiae* (QA23), fue esa levadura la que se mantuvo hasta el final en las fermentaciones realizadas a partir de mosto Macabeo.

En las fermentaciones realizadas con mosto de uvas Merlot, *H. vineae* no logro imponerse y desde el principio *S. cerevisiae* fue la que llevo adelante el proceso de fermentación. Las fermentaciones de Macabeo a partir de inóculo de *H. vineae* fueron las seleccionadas por el panel cuando se les pregunto su preferencia y en la evaluación sensorial fueron descritas como mas frutales y florales respecto al control. Esto se vio reflejado en el análisis químico de compuestos aromáticos, donde se detectó el acetato β -feniletílico en un orden 50 veces superior al detectado en los vinos fermentados con *S. cerevisiae*.

4.3.1. Seguimiento de las fermentaciones

A partir de la levadura seleccionada en la primer parte de ésta Tesis se realizaron fermentaciones a escala semi industrial en la bodega experimental Mas dels Frares, de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, España). Una fermentación en uva blanca de la variedad Macabeo y una en tinto de la variedad Merlot. En ambos casos se realizo el seguimiento de la fermentación controlando la densidad diariamente y controlando la población mediante siembra en placas de agar lisina (medio selectivo para el crecimiento de no-*Saccharomyces*) y en medio YPD.

Los cambios en las medidas de densidad se pueden ver en la **Figura 4.21**. La fermentación de Macabeo **Figura 4.21 (A)**, inoculada con *H. vineae*, requirió un tiempo de fermentación de 19 días, un tiempo superior al necesitado por las fermentaciones inoculadas con *S. cerevisiae*, que terminaron en un lapso de 14 días. Este es un comportamiento esperable ya que las levaduras *Saccharomyces* están altamente especializadas en el metabolismo primario de

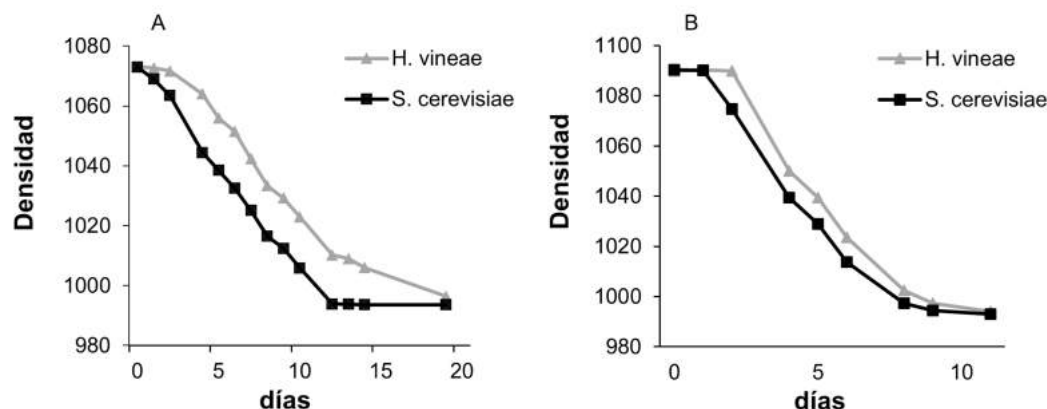


Figura 4.21: Medidas de densidad de la cinética de fermentación de Macabeo (A) y de Merlot (B) en tanques inoculados con *H. vineae* (Gris) y *S. cerevisiae* (Negro)

la fermentación alcohólica [Lambrechts and Pretorius \(2000\)](#); [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#); [Carrau \(2003\)](#); [Carrau et al. \(2005\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#); [Carrau et al. \(2010\)](#); [Fariña et al. \(2012\)](#). En cambio, durante la vinificación de Merlot **Figura 4.21 (B)** prácticamente no se observaron diferencias en el tiempo de fermentación entre los mostos inoculados con *H. vineae* y *S. cerevisiae*. Ambos finalizaron sobre el día 9 de fermentación.

Se analizó la población de levaduras durante las fermentaciones mediante el recuento en placas. En la **Figura 4.22** se pueden ver los recuentos en los distintos medios para cada fermentación. Para Macabeo **Figura 4.22 (A)** en las fermentaciones de *H. vineae* se observó crecimiento de *S. cerevisiae* no inoculada. Pero al haber observado que el tiempo requerido para finalizar la fermentación fue superior a aquellas inoculadas con *S. cerevisiae* se podría decir que en estos tanques si bien creció *S. cerevisiae* de manera espontánea (sin haber sido inoculadas) no lograron imponerse durante los primeros días de la fermentación. En la **Figura 4.22 (A)** se puede ver como los recuentos en placas de YPD y agar lisina son similares durante el proceso de fermentación. En el caso del Merlot **4.22 (B)**, puede verse una imposición de las *S. cerevisiae* nativas de la bodega en las fermentaciones inoculadas con *H. vineae* lo cual explicaría que no presentaran diferencias en la duración de las fermentaciones de *H. vineae* frente a las inoculadas con *S. cerevisiae*. El hecho de que la levadura *H. vineae* no lograra imponerse pudo deberse a varios factores, desde la mayor diversidad de levaduras nativas presentes desde el inicio de la fermentación

compitiendo con la levadura inoculada a la temperatura en que fue realizada la fermentación (entre 23-25°C), que como se discutió en el marco teórico de la tesis afecta negativamente a las levaduras no-*Saccharomyces* Heard and Fleet (1988a); Fleet (1993); Charoenchai et al. (1998); Soden (1999); Torija et al. (2003); Díaz-Montaño and de Jesús Ramírez Córdova (2009).

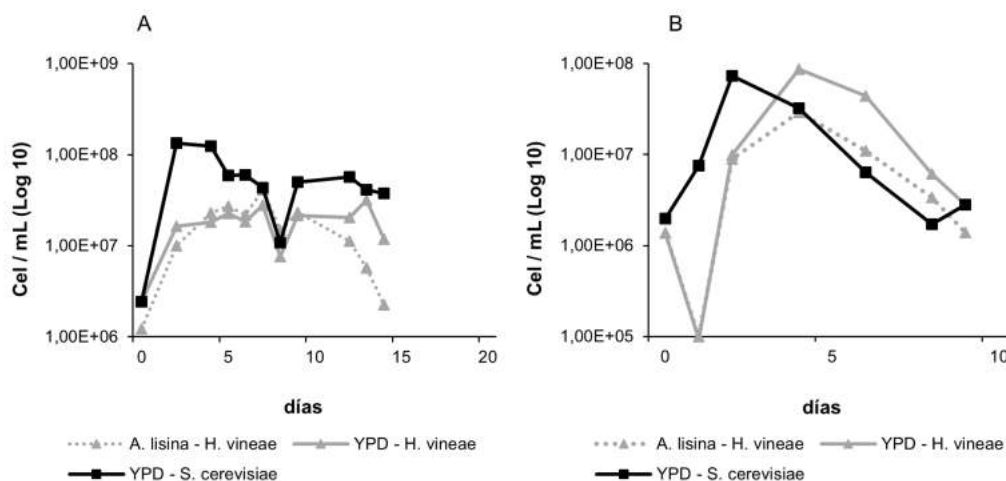


Figura 4.22: Seguimiento de la población de levaduras en las fermentaciones de Macabeo (A) y Merlot (B) en tanques inoculados con *H. vineae* (Gris) y tanques inoculados con *S. cerevisiae* (Negro). En placas de agar lisina (punteada) y de YPD (sólida)

Para complementar los resultados obtenidos mediante el recuento en placas y comprobar si *H. vineae* estaba entre las colonias que crecían en las placas de agar lisina, se analizaron las muestras mediante PCR cuantitativa (QPCR), donde, mediante primers específicos (de género, de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*) se puede identificar y calcular la concentración presente en una muestra.

En las fermentaciones de Macabeo, inoculados con *H. vineae* **Figura 4.23** (A) se observa que al inicio de la fermentación hay una fase lag para lo identificado por los primers para *Hanseniaspora* ($3,4 \times 10^4$ cel/mL) y los generales ($3,4 \times 10^5$ cel/mL). En cambio en la población identificada mediante los primers para *Saccharomyces* comienza a verse crecimiento desde el día 1 partiendo de una población mas baja con 8×10^3 cel/mL. Al día 4 las *Saccharomyces* prácticamente alcanzan a la población identificada con los primers generales y sobre el final son las mayoritarias. En los tanques inoculados con la *S. cerevisiae* QA23, ésta fue la levadura predominante durante todo el proceso **Figura 4.23**

(B).

En las vinificaciones de las uvas Merlot inoculadas con *H. vineae* (**Figura 4.23** (C)), al principio se cuantificó una mayor población de levaduras *Hanseniaspora* ($8,4 \times 10^4$ cel/mL) frente a lo cuantificado para *Saccharomyces* ($2,45 \times 10^3$ cel/mL). La población general fue de $1,3 \times 10^6$ cel/mL. Pasada la mitad de la fermentación las poblaciones identificadas con los 3 primers se igualaron y al final disminuyeron las 3 de igual manera. En las fermentaciones inoculadas con *S. cerevisiae* se ve al principio una alta concentración de éstas levaduras, que van disminuyendo hacia el final de la fermentación **Figura 4.23** (D). El comportamiento fue igual al observado para la población identificada mediante los primers generales. Finalmente, con los primers específicos para *Hanseniaspora* spp. se pudo identificar una población inferior ($1,14 \times 10^5$ cel/mL) que con los otros primers que se mantuvo estable hasta el sexto día de fermentación y luego disminuyó. Seguramente dentro de las levaduras identificadas con estos primers específicos para *Hanseniaspora* fueron incluidas levaduras nativas de la uva como *H. uvarum* (de las principales levaduras presentes en las floras nativas de la vid).

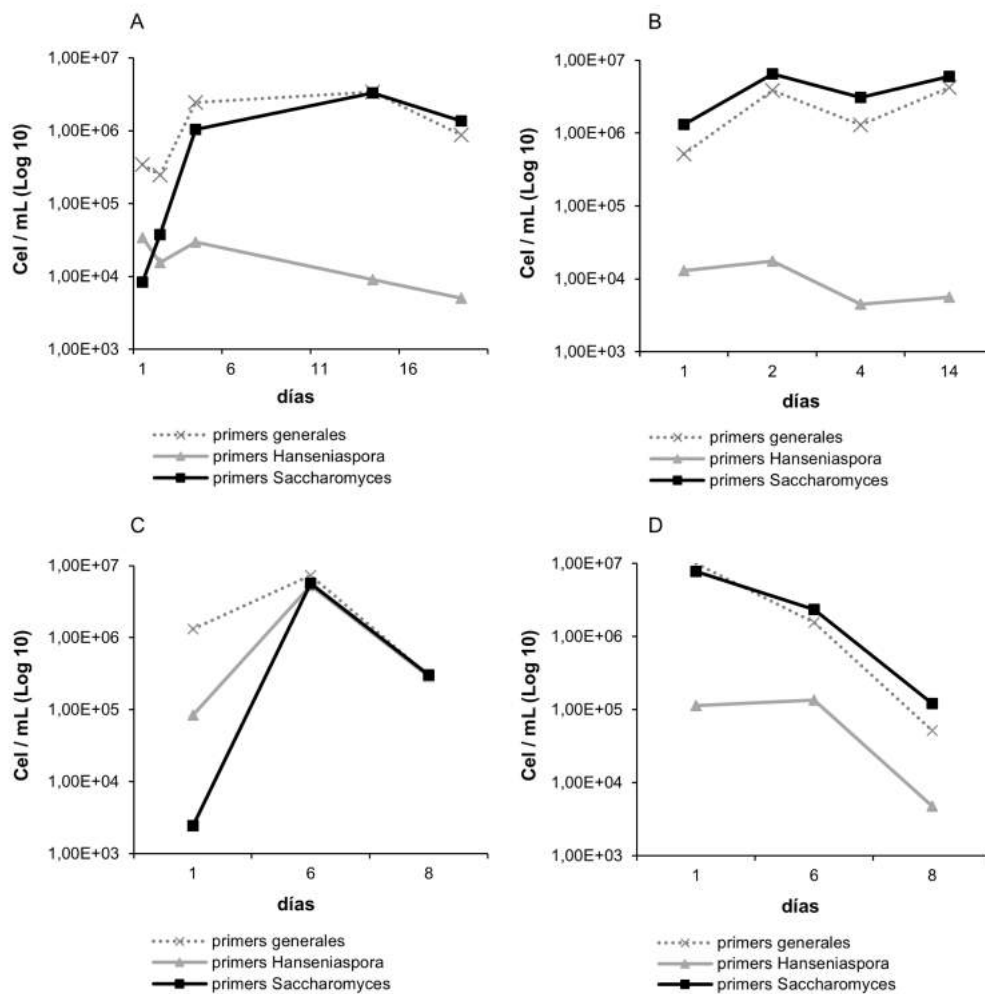


Figura 4.23: Seguimiento de la población de levaduras mediante QPCR, con primers generales para levaduras (punteado), específicos para *Hanseniaspora spp* (Gris) y específicos para *Saccharomyces* (Negro), en las fermentaciones de Macabeo (A y B) y Merlot (C y D), en tanques inoculados con *H. vineae* (A y C) y tanques inoculados con *S. cerevisiae* (B y D)

El seguimiento de las poblaciones fue realizado mediante varias técnicas moleculares, dependientes e independientes de cultivo. Esto fue parte de un trabajo de Maestría realizado en paralelo a esta tesis y parte de los resultados están publicados en el artículo de [Lleixa et al. \(2016\)](#) junto a algunos de los resultados de ésta tesis que se puede, ver en el apéndice A.

Brevemente, al analizar la población presente en los dos mostos se observó que la microbiota identificada en el mosto de Macabeo fue inferior (3 especies de levaduras distintas) a la encontrada en el Merlot (11 especies diferentes). En ambos casos las especies mayoritarias fueron *Candida zemplinina* y *Hanseniaspora uvarum*, lo que explica lo observado mediante QPCR. Esta diferencia de diversidad seguramente se deba al hecho de que del mosto de Macabeo fue filtrado previo a la inoculación, lo cual disminuyó la carga microbiana. En ningún caso se identificaron levaduras nativas de *Saccharomyces cerevisiae*, algo que es de esperar ya que éstas levaduras son muy poco frecuentes en el ecosistema de viñedo (menos del 1% de la población total) [Pretorius \(2000\)](#); [Torija et al. \(2001\)](#); [Beltran et al. \(2002\)](#); [Ribereau-Gayon et al. \(2003\)](#); [Zott et al. \(2008\)](#). El seguimiento de las poblaciones durante las fermentaciones fue realizado mediante RFLPs-PCR de levaduras aisladas en placas (técnica dependiente de cultivo) y mediante PCR-DGGE y secuenciación de alto rendimiento (HTS por sus siglas en inglés). De lo aislado a partir de las placas de Macabeo, se vio que en los tanques inoculados con *H. vineae* esta cepa fue mayoritaria al inicio de la fermentación. A mitad de la misma representaba un 40% de la población, demostrando así que pudo imponerse sobre la microbiota autóctona y permanecer activa hasta el final de la fermentación. En Merlot en cambio, la *H. vineae* no logró imponerse a la microbiota nativa y fue una *Saccharomyces* detectada desde el inicio de la fermentación quien se impuso.

A partir de las identificaciones mediante DGGE-PCR:

- pudo constatar la presencia de levaduras *S. cerevisiae* desde el día 1 en todas las fermentaciones, aunque en las vinificaciones inoculadas con *H. vineae* se trataba de cepas distintas a la QA23.

- Se encontró mayor diversidad en los mostos inoculados con *H. vineae*. Esta levadura pudo ser recuperada hasta el final de las fermentaciones.

Mediante secuenciación de alto rendimiento nuevamente se observó una

mayor diversidad en los mostos de Merlot frente a Macabeo, que tiende a disminuir hacia el final de la fermentación en Merlot y manteniéndose constante en Macabeo. La mayor parte de la población en ambas fermentaciones estaba representada por las cepas inoculadas de *S. cerevisiae* y *H. vineae*. Al comparar los resultados obtenidos mediante la QPCR y los resultados obtenidos por las otras técnicas moleculares [Lleixa et al. \(2016\)](#), se observaron diferencias entre lo identificado a partir de los primers específicos para *Hanseniaspora* spp. ya que se cuantificó una población baja, sobre todo considerando que a partir de dichos primers también deberían identificarse las levaduras *H. uvarum* presentes en el mosto. Tal vez para el caso de *H. vineae* habría que diseñar un primer específico de la especie.

4.3.2. Determinaciones analíticas

A partir de los datos analíticos se pudo apreciar que se produjeron vinos sin grandes diferencias con los parámetros fisicoquímicos entre vinos obtenidos a partir de un mismo mosto pero inoculados con distintas levaduras. Específicamente en las fermentaciones a partir de la uva blanca Macabeo (mosto donde logro imponerse la *H. vineae* T02_05F), las diferencias se observaron en la acidez volátil, la concentración de ácido láctico y fructosa, que dieron un poco mas elevados en los vinos fermentados con *H. vineae* y el ácido cítrico el cual se encontró en mayor cantidad en los vinos fermentados con *S. cerevisiae*. En el resto de los parámetros como etanol, glucosa y glicerol, no se observaron diferencias significativas. Ya sea en los vinos inoculados con *H. vineae* o *S. cerevisiae* el alcohol obtenido fue de 11 grados aproximadamente, se llego a sequedad de azucars (menos de 2 g/L) y la producción de glicerol rondó los 4 g/L. En los vinos realizados a partir de uvas Merlot se encontraron un poco mas de diferencias, pero como la levadura que logro imponerse no fue la *H. vineae* (objeto de estudio de este trabajo de Tesis) no van a deberse a su presencia las diferencias.

Tabla 4.12: Datos analíticos de los vinos realizados a partir de inóculos de *H. vineae* (T02_05F) y *S. cerevisiae* (QA23) sobre mostos de uvas Macabeo y Merlot. Con * se marcan las diferencias significativas analizadas mediante ANOVA entre fermentaciones sobre un mismo mosto inoculados con las distintas levaduras.

	Macabeo		Merlot	
	Sc	Hv	Sc	Hv
Etanol	10,73 ± 0,28	10,84 ± 0,02	12,73 ± 0,00	12,67 ± 0,00
Acidez total	3,23 ± 0,30	2,97 ± 0,01	3,58 ± 0,01	3,48 ± 0,00*
Acidez volátil	0,30 ± 0,04	0,40 ± 0,01***	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,00
Densidad	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,00
pH	3,23 ± 0,00	3,35 ± 0,03	3,57 ± 0,00	3,52 ± 0,00
Ácido málico	1,26 ± 0,87	0,35 ± 0,06	2,01 ± 0,01	1,61 ± 0,04***
Ácido láctico	-0,34 ± 0,20	0,34 ± 0,00**	-0,36 ± 0,00	-0,43 ± 0,00
Fructosa	0,43 ± 0,00	1,25 ± 0,50*	0,63 ± 0,00	0,30 ± 0,00***
Glucosa	0,69 ± 0,80	0,30 ± 0,10	0,41 ± 0,30	1,06 ± 0,10**
Ácido cítrico	0,36 ± 0,00	0,10 ± 0,10*	0,36 ± 0,00	0,19 ± 0,00***
Glicerol	4,16 ± 0,40	4,16 ± 0,10	8,47 ± 0,00	7,64 ± 0,00***
Tartárico	4,07 ± 0,70	2,46 ± 0,00	2,02 ± 0,20	1,90 ± 0,00

*, **, ***; indican significancia a $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectivamente

4.3.3. Composición de compuestos volátiles

Se identificaron y cuantificaron 50 compuestos volátiles producidos durante la fermentación alcohólica a partir de mosto natural de Macabeo inoculado con levaduras *H. vineae* y *S. cerevisiae*. Éstos compuestos fueron clasificados en 10 grupos aromáticos (acetatos, ácidos, alcoholes, compuestos C6, compuestos carbonilo, ésteres, fenoles, lactonas, compuestos “inusuales” y terpenos). La cuantificación de cada compuesto y la suma de los mismos por grupos puede verse en la **Tabla 4.13**.

Las diferencias significativas se vieron solamente en 3 de los 10 grupos (Acetatos, “inusuales” y alcoholes).

Ambas levaduras producen mayoritariamente alcoholes y ésteres. Tres de los 11 alcoholes (alcohol isobutílico, alcohol isoamílico y el alcohol β -feniletílico) identificados alcanzan el umbral de percepción reportado en la literatura. De esos tres, el alcohol β -feniletílico provee buenos aromas, descritos como rosa y miel.

Dentro del grupo de los ésteres, el hexanoato de etilo alcanza su umbral de percepción, asociándose con descriptores a manzana verde.

El siguiente grupo producido en mayor cantidad por *H. vineae* son los catalogados como “inusuales” donde se identificaron los compuestos N-acetil tiramina y el éster de acetato 1H-indol-3-etanol, estos compuestos a su vez no fueron identificados en el vino fermentado con *S. cerevisiae*.

De los 7 ácidos que se pudieron identificar los que se encontraron en mayor proporción fueron los ácidos hexanoico, decanoico y octanoico. El octanoico superó el umbral de percepción reportado. El ácido decanoico se encontró en mayor proporción en la fermentación realizada por *H. vineae*, este comportamiento también fue observado en el trabajo realizado por [Medina et al. \(2013\)](#). Esto podría indicar que *H. vineae* presenta una tasa de lisis celular superior que *S. cerevisiae*. Este comportamiento se considera favorable por el aporte a la untuosidad y volumen en boca que dan estos compuestos al vino obtenido [Ravaglia and Delfini \(1994\)](#).

Se identificaron cuatro compuestos dentro del grupo de los acetatos. El acetato de β -feniletílico fue el más abundante e interesante debido a lo que puede aportar en un vino. Éste compuesto se encontró en una concentración

50 veces superior en el vino fermentado a partir de la levadura *H. vineae* que en el vino fermentado a partir de *S. cerevisiae*, superando en unas 9 veces su umbral de percepción reportado. Esto coincide con lo descrito en la primer parte de este trabajo, donde las cepas estudiadas de *H. vineae* ya habían demostrado su potencial para producir este compuesto en mayor concentración que *S. cerevisiae*, además de coincidir con lo descrito por otros autores para las no-*Saccharomyces* en general y para las *H. vineae* en particular. [Rojas et al. \(2003\)](#); [Moreira et al. \(2005\)](#); [Swiegers et al. \(2005\)](#); [Jolly et al. \(2006\)](#); [Viana et al. \(2008, 2009, 2011\)](#); [Medina et al. \(2013\)](#). En este caso la diferencia de nivel de producción de este compuesto entre los dos tipos de levaduras fue superior a la obtenida en la primer parte de ésta Tesis. Hay que tener en cuenta que la matriz donde se realizaron las fermentaciones es distinta, y en este caso hubo interacción de *H. vineae* con otras levaduras y la *S. cerevisiae* utilizada como control tampoco fue la misma.

Se encontraron seis compuestos catalogados como fenólicos, pero estos no lograron alcanzar su umbral de percepción por lo que se espera no tengan influencia en el vino finalizado o que sea prácticamente nula.

Tabla 4.13: Concentración promedio de cada compuesto producido por ambas levaduras en Macabeo (\pm desvío estándar) en $\mu\text{g/L}$

	<i>H. vineae</i>		<i>S. cerevisiae</i>		Descriptor	Umbral de percepción ($\mu\text{g/L}$)
	media	sd	media	sd		
Acetatos						
Acetato de isobutilo	11 \pm 1		0 \pm 0*		ND	ND
Acetato de isoamilo	222 \pm 20		218 \pm 93		Banana ¹	30
1,3-Propanediol, diacetato	99 \pm 18		160 \pm 7		ND	ND
Acetato de β -feniletilo	2322 \pm 50		47 \pm 13**		Frutado, miel, floral ¹	250
Suma de acetatos	2653 \pm 89		425 \pm 100**			
Ácidos						
Ácido isobutírico	74 \pm 40		0 \pm 0		Ácido, grasoso ²	230
Ácido heptanoico	231 \pm 28		304 \pm 35*		ND	N/A
Ácido hexanoico	330 \pm 35		777 \pm 70*		Grasoso, queso ¹	420
Ácido octanoico	734 \pm 12		1757 \pm 335		Grasoso ¹	500
Ácido decanoico	979 \pm 31		389 \pm 212		Rancio, grasa ¹	1000
Ácido 9-hexadecanoico	479 \pm 11		72 \pm 57		ND	ND
Suma de ácidos	2825 \pm 48		3299 \pm 708			
Alcoholes						
Alcohol isobutílico	2388 \pm 277		1895 \pm 165		Combustible, químico ²	0.5
1-Butanol	58 \pm 9		84 \pm 38		Vinoso, medicinal ¹	150.000
Alcohol isoamílico	36361 \pm 4127		61355 \pm 5063*		Alcohólico, frutado a bajas concentraciones ²	0.3
3-Metil-1-pentanol	36 \pm 1		69 \pm 7		Vinoso, esmalte de uña ¹	40.000
3-Etoxi-1-propanol	28 \pm 0		108 \pm 12		frutado ²	
Alcohol furfúril	12 \pm 2		0 \pm 0		ND	ND
3-(Metiltio), 1-Propanol	321 \pm 35		599 \pm 281		Dulce, papa ¹	1000
Alcohol bencilico	37 \pm 7		0 \pm 0		Floral, rosa, fenolico, balsamico ¹	200.000
Alcohol β -feniletílico	8099 \pm 158		16830 \pm 957		Rosa, talco, miel ¹	10000
Tirosol	1855 \pm 156		5274 \pm 3149		ND	ND
Triptofol	1365 \pm 95		0 \pm 0**		ND	ND
Suma de alcoholes	50557 \pm 4276		86214 \pm 897*			
Compuestos C6						
1-Hexanol	386 \pm 7		328 \pm 50		Pasto cortado ¹	2500
Trans 3-Hexen-1-ol	7 \pm 1		129 \pm 19		Verde ¹	1000
Cis 3-Hexen-1-ol	120 \pm 1		0 \pm 0**		Verde, kiwi ¹	400
Suma de compuestos C6	513 \pm 9		457 \pm 31			
Compuestos carbonilo						
Acetoina	15 \pm 13		56 \pm 59		Crema, manteca, grasa ²	0.15
Furfural	9 \pm 2		0 \pm 0		Combustible, pan tostado ¹	770
Suma de compuestos carbonilo	23 \pm 16		56 \pm 59			
Ésteres						
Butirato de metilo	9 \pm 4		14 \pm 7		ND	ND
Butirato de etilo	62 \pm 15		158 \pm 38		ND	ND
Hexanoato de etilo	81 \pm 4		241 \pm 24		Manzana verde ¹	14
Lactato de etilo	8285 \pm 378		3071 \pm 1915		Fresa, frambuesa ¹	60.000
Octanoato de etilo	79 \pm 33		225 \pm 9		Dulce, banana, piña ¹	500
3-hidroxibutirato de etilo	119 \pm 8		52 \pm 16		ND	ND
Decanoato de etilo	143 \pm 46		76 \pm 6		Dulce, aceite de avellana ¹	200
Succinato de etilo	1240 \pm 47		1775 \pm 836		Caramelo, cafe ¹	1.000.000
Malato de dietilo	88 \pm 6		428 \pm 165		Verde ¹	760.000
2-hidroxi glutarato de dietilo	233 \pm 6		268 \pm 67		Verde, manzana verde, malvavisco ¹	20.000
Succinato de dietilo	4012 \pm 255		15671 \pm 6792		Melón maduro, lavanda ¹	100000
Suma de ésteres	14348 \pm 509		21979 \pm 9334			
Fenoles						
Guaiacol	6 \pm 1		0 \pm 0		Alumado, hospital ¹	9.5
4-etilguaiacol	73 \pm 66		0 \pm 0		Brett ¹	110
4-vinilguaiacol	33 \pm 21		28 \pm 14		Clavo, curry ¹	40
Fenil lactato	53 \pm 10		128 \pm 32		ND	ND
Vainillato de etilo	5 \pm 0		17 \pm 20		ND	ND
Acetovainillona	14 \pm 5		15 \pm 13		ND	ND
Suma de fenoles	183 \pm 41		188 \pm 11			
Lactonas						
Butirolactona	223 \pm 1		251 \pm 6		Tostado quemado ¹	1000
5-carboetoxi- γ -butirolactone	127 \pm 7		76 \pm 11		ND	ND
Suma de lactonas	350 \pm 8		327 \pm 17			
"inusuales"						
N-acetil tiramina	2040 \pm 11		0 \pm 0**		ND	ND
ester de acetato 1H-indol-3-etanol	1377 \pm 8		0 \pm 0**		ND	ND
Suma de "inusuales"	3417 \pm 4		0 \pm 0***			
Terpenos						
Linalol	12 \pm 2		28 \pm 13		Rosa ¹	50
α -terpineol	112 \pm 31		0 \pm 0		Floral, pino ¹	400
Citronelol	27 \pm 6		39 \pm 5		Dulce, floral ²	18
Suma de terpenos	150 \pm 23		67 \pm 18			

* ** *** indican significancia a $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ respectivamente; ND (no determinado)

¹ Farfina et al. (2015)

² Boido (2002)

4.3.4. Análisis sensorial

Con el fin de determinar si era posible diferenciar el vino fermentado por *H. vineae* del inoculado con la cepa comercial de *S. cerevisiae* QA23, se realizó un test triangular. Cada juez debía seleccionar la muestra que consideraba diferente entre tres que se le presentaban y seleccionar la de su preferencia. En la **Figura 4.24** (Tabla) se muestran los resultados del test. De trece jueces que evaluaron las muestras, diez identificaron correctamente la diferente, por lo que se puede decir que fue fácil distinguir el vino fermentado a partir de *H. vineae* de aquel inoculado con *S. cerevisiae*. A su vez, nueve de los diez de los jueces que supieron diferenciar las fermentaciones seleccionaron la realizada con *H. vineae* como la de su preferencia. En el test descriptivo el vino fermentado con *H. vineae* fue el mejor ranqueado, tuvo una diferencia sustancial con el inoculado con la cepa comercial en cuanto a su carácter floral y el volumen en boca, tal vez debido a la mayor presencia de ácido decanoico (**Figura 4.24**).

El Merlot no pudo ser evaluado producto de un fuerte aroma reductor, lo que hacía inviable realizar el análisis. De todas maneras a partir del análisis poblacional se pudo ver que no fue la levadura inoculada *H. vineae* la responsable de llevar adelante la fermentación.

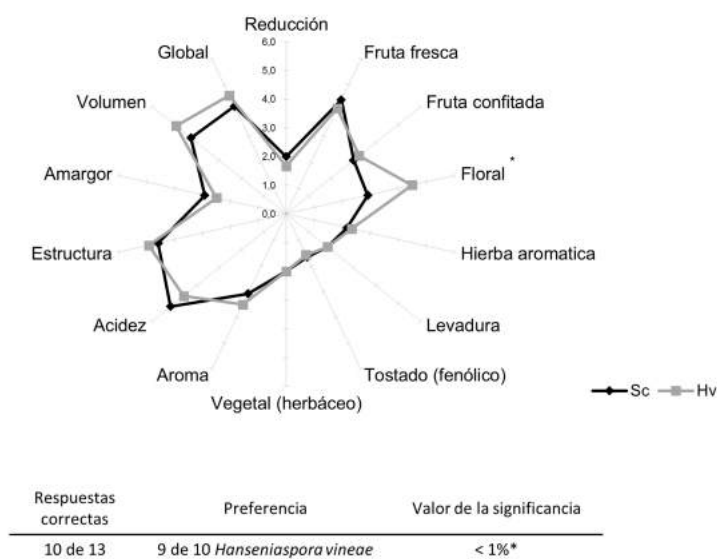


Figura 4.24: Resultados de los test descriptivo (gráfico) y del triangular (tabla) de los vinos de Macabeo fermentados con *H. vineae* y *S. cerevisiae*

4.3.5. Conclusiones

A partir de las fermentaciones realizadas a escala semi-industrial se pudo observar que *H. vineae* fue capaz de imponerse a la microbiota nativa en las fermentaciones de vino Macabeo, no en las de Merlot. El mosto de Macabeo había sido sometido a un proceso de filtrado previo a la inoculación con el fin de remover partículas sólidas y coloides del mosto, lo que seguramente haya reducido la carga de levaduras nativas en el mismo. Esto se vio reflejado en el análisis de la población de levaduras de ambos mostos, ya que en Macabeo se encontraron solo tres especies distintas de levaduras frente a once identificadas en Merlot. Para estas levaduras sería importante contemplar un tratamiento previo a la inoculación que permitiera disminuir la carga de levaduras nativas del mosto para que no compitan con la *H. vineae*. Esta levadura, como se mostró en la primer parte de esta Tesis, tiene resistencia alta al anhídrido sulfuroso, lo cual permitiría agregado de SO₂ al mosto para disminuir la carga de la microbiota nativa. Sería importante un correcto control de la temperatura durante la fermentación.

En cuanto al desempeño durante la fermentación, aquellos mostos inoculadas con *H. vineae* requirieron mas tiempo para finalizar. Esto reafirma el mejor desempeño de *S. cerevisiae* para fermentar. Sin embargo, las vinificaciones inoculadas con *H. vineae* lograron finalizar. No debe considerarse este mayor tiempo de fermentación como factor negativo, ya que de acuerdo a lo reportado por [Medina et al. \(2013\)](#) fermentaciones mas lentas favorecen organolépticamente al vino (ya que previenen volatilización de aromas deseados) y son mas eficientes energéticamente ya que demandan menos energía para refrigerarlas.

A partir del seguimiento de las poblaciones mediante distintas técnicas moleculares [Lleixa et al. \(2016\)](#), se comprobó que las cepas inoculadas de *S. cerevisiae* y *H. vineae* fueron las predominantes en sus respectivas fermentaciones, logrando *H. vineae* mantenerse en un alto porcentaje hasta la mitad de la fermentacion en Macabeo, demostrando así una alta capacidad fermentativa. En Merlot, sin embargo, *H. vineae* prácticamente no pudo recuperarse en placa mientras que *S. cerevisiae* fue la mas abundante. Mediante las técnicas independientes de cultivo como PCR-DGGE, la secuenciación de alto rendimiento (HTS) [Lleixa et al. \(2016\)](#) y la QPCR si pudo detectarse y, aunque en muy baja concentración, permaneció hasta el final de la fermentación. Estos

resultados van en concordancia con otros previamente reportados donde se indica que en la interacción entre *S. cerevisiae* y las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación, las no-*Saccharomyces* son rápidamente desplazadas por *Saccharomyces*, que puede matarlas o llevarlas a un estado de viables pero no cultivables.

El vino final obtenido fermentando a partir de mosto Macabeo e inoculado con *H. vineae* fue el preferido por el panel de cata por su notable aroma frutado y a flores sobre el fermentado con *S. cerevisiae*. Estos resultados confirman los obtenidos en otras fermentaciones mixtas realizadas con *H. vineae* [Viana et al. \(2009, 2011\)](#), donde también se obtienen altas concentraciones de acetato β -feniletílico, compuesto responsable de esos aromas. El análisis químico de los compuestos aromáticos producidos revela que los vinos fermentados a partir de *H. vineae* contienen 50 veces más de este compuesto que los inoculados con *S. cerevisiae*, lo que explica los resultados obtenidos en el análisis sensorial, y se corresponde con observaciones previas [Medina et al. \(2013\)](#) y con los resultados de la primera parte de este trabajo de Tesis .

Finalmente, la producción de los compuestos denominados como “inusuales”, N-acetil tiramina y el acetato 1H-indol-3-etanol solo se vieron en los vinos fermentados con *H. vineae* y en alta concentración. Estos compuestos podrían ser derivados del tirosol ya que éste compuesto es encontrado en altas concentraciones en los vinos fermentados con *S. cerevisiae* y en bastante menor medida en *H. vineae*. La diferencia podría explicarse por la producción de estos compuestos a partir del tirosol. Los descriptores aromáticos asociados a estos compuestos no han sido reportados, por lo que no se puede determinar cual sería su aporte a la calidad organoléptica de los vinos. Este comportamiento también pudo verse en la caracterización de las levaduras *H. vineae* en medio similar mosto. *Saccharomyces* produjo una concentración considerablemente mayor de tirosol y *H. vineae* produjo altas concentraciones del acetato 1H-indol-3-etanol, el cual también fue producido, en menor medida, por *S. cerevisiae* (ya que en ese caso no se detectó producción de N-acetil tiramina en ninguna de las microvinificaciones).

Capítulo 5

Consideraciones finales

Este trabajo se basó en la hipótesis de que un mejor conocimiento sobre el comportamiento de las levaduras no-*Saccharomyces* de la vid durante la fermentación brindará a los enólogos una mayor variedad de opciones para fermentar según sus necesidades y permitirá la diferenciación de estilos de vinos. Dentro de éste marco, el grupo de Enología ha seleccionado la especie *H. vineae* por presentar buenas características enológicas. El presente trabajo se planteó realizar la caracterización de esta especie a partir de varias cepas de *H. vineae* aisladas de viñedos uruguayos, en diferentes vendimias y de distintas variedades de uvas, para poder conocer más detalladamente el comportamiento general de la especie durante la fermentación. Hasta ahora se habían realizado algunos estudios sobre ésta especie pero en cepas puntuales y no de un conjunto de cepas representativo de la misma.

A partir de ésta caracterización se pudo ver una gran variabilidad de comportamiento dentro de las 11 cepas diferentes de *Hanseniaspora vineae*, pero sin embargo se pudieron determinar características típicas de la especie.

Todas las cepas de *H. vineae* analizadas mostraron actividad enzimática, de proteasa y de β -glucosidasa a pH 6. En ninguna de las cepas pudo identificarse actividad pectinasa.

Las 11 cepas fueron capaces de fermentar en un mosto con baja concentración de nitrógeno (100 mgN/L) lo cual es una buena cualidad a la hora de su aplicación en fermentaciones mixtas a escala industrial, ya que sugiere que las levaduras no poseen grandes requerimientos de nitrógeno para fermentar por lo que no competirían por estos nutrientes con *Saccharomyces*. Esto se traduce en una disminución de riesgos a posibles paradas de fermentación o la

obtención de defectos aromáticos.

El 80 % de las cepas *H. vineae* mostraron resistencia al SO₂ a concentraciones que suelen utilizarse en bodega (50 mg/L) para vinificaciones de calidad, lo cual las habilita para su uso a nivel industrial.

En cuanto a su capacidad de producción de compuestos aromáticos todas las cepas de *H. vineae* se destacaron por su producción de acetato β-feniletílico en altas concentraciones, unas 12 veces superior a lo cuantificado para *S. cerevisiae*. Este compuesto, como se mencionó anteriormente está asociado a descriptores agradables (floral, frutal, miel) los que serán percibidos en los vinos producidos a partir de éstas levaduras. Las levaduras de la especie *H. vineae* se caracterizaron por producir menor concentración de ácidos grasos volátiles que *S. cerevisiae*, aproximadamente 4 veces menos, lo cual es favorable, ya que en general estos compuestos suelen estar asociados a la inhibición de la fermentación por su toxicidad sobre levaduras *S. cerevisiae*, y si se encuentran en alta concentración producen aromas menos agradables. Todas las *H. vineae* produjeron concentraciones considerablemente menores de tirosol que la *S. cerevisiae* (aproximadamente 7 veces menos). Este compuesto es asociado a descriptores aromáticos no deseados. La producción de ésteres etílicos fue baja en todas las cepas de *H. vineae*, lo que pudo deberse a la falta del gen involucrado en la producción de éstos compuestos. En las fermentaciones realizadas a partir de las cepas *H. vineae* se pudieron cuantificar terpenos y sesquiterpenos. Estos son aromas varietales, florales y frutales, que normalmente provienen de las uvas. En este caso al ser cuantificados en un medio artificial se evidencia la capacidad de las levaduras *H. vineae* de producirlos *de novo*. Tanto para ésteres etílicos, terpenos y sesquiterpenos sería necesario analizar los factores que estimulan su producción (como la concentración de nitrógeno y el efecto redox ya descrito para *S. cerevisiae*) para obtener una mayor concentración en fermentaciones realizadas a partir de *H. vineae*.

Las *H. vineae* se caracterizan por una producción de glicerol de entre 5 y 7 g/L manteniéndose entre los valores promedio para éste compuesto. Sin embargo la liberación de polisacáridos dependió de la cepa estudiada y osciló entre los 150 y los 400 mg/L, muy superior a *S. cerevisiae*. Este aspecto sumado a la alta actividad proteasa y la mayor liberación de ácido decanoico en la fermentación a escala industrial (indicador de lisis celular), explican el mayor volumen en boca que se obtuvo en el Macabeo fermentado por éstas

levaduras.

Tanto para la cuantificación de indicadores de lisis celular como para la liberación de polisacáridos será necesaria la realización de nuevos ensayos para evaluar la influencia de las condiciones iniciales de fermentación sobre el comportamiento de las levaduras.

Se pudo observar que el agregado de amonio inorgánico en el medio en forma de DAP afecta negativamente la formación de los alcoholes bencílico y β -feniletílico y sus acetatos, por lo que en mostos fermentados a partir de *H. vineae* será importante realizar un correcto uso de éste nutriente para no afectar la complejidad organoléptica de los vinos obtenidos.

En medio símil mosto *H. vineae* es capaz de producir alcohol bencílico y alcohol ρ -hidroxi bencílico en 1 o 2 ordenes de magnitud superior a lo producido por *S. cerevisiae* bajo las mismas condiciones de fermentación.

Mayores niveles de los aminoácidos Phe y Trp, así como de ρ -ABA incrementaron la producción de BAL, mientras que la Tyr tuvo una influencia negativa sobre la producción de éste compuesto.

A partir de los resultados obtenidos y del estudio del genoma de *H. vineae* se sugieren dos posibles vías para la formación de BAL por éstas levaduras. La vía del corismato partiendo de azúcares y la del catabolismo de la fenilalanina, ambas vías con el fenilpiruvato como intermediario y la subsecuente formación de mandelato a través de *ARO10* decarboxilasa.

La ausencia de las vías PAL y TAL y los altos niveles de BAL producidos por *H. vineae* la convierten en un modelo eucariota ideal para mejorar la comprensión de la síntesis alternativa de bencenoides en comparación con plantas y hongos donde si están presentes las vías PAL/TAL lo que complejiza el análisis metabólico. Estos resultados abren líneas de investigación básica de alto potencial de impacto sobre el metabolismo de las levaduras.

De las fermentaciones realizadas en bodega se pudo concluir que *H. vineae* es capaz de iniciar un proceso de fermentación y si se deja seguir la fermentación de manera espontánea será *S. cerevisiae* quien se encargue de finalizarla.

Sin embargo para que esto suceda será necesario contar con uvas en perfecto estado sanitario, para partir de una carga inicial baja de levaduras nativas en el mosto para que no compitan con la *H. vineae*. En las fermentaciones de Merlot, donde no se disminuyó la carga de levaduras que venían con las uvas, sumado a que la fermentación se realizó en contacto con las cascarras para la extracción de color, *H. vineae* no logró imponerse. En éstos casos se

puede agregar anhídrido sulfuroso al mosto ya que en la caracterización de las levaduras se pudo ver que son todas resistentes a los niveles que suelen utilizarse en bodega.

En cuanto al desempeño durante la fermentación, los mostos inoculados con *H. vineae* requirieron mas tiempo para finalizarla. Esto era de esperar pero no necesariamente debe considerarse como algo negativo, ya que como se señalo en la discusión de los resultados, fermentaciones mas lentas previenen la perdida de aromas deseados y hay menor demanda de energía para refrigerar. *H. vineae* logró predominar en su fermentación manteniéndose en un alto porcentaje hasta la mitad de la fermentación, demostrando así una alta capacidad fermentativa y obteniendo la misma concentración de etanol que en los vinos inoculados con *S. cerevisiae*

Mediante identificación por técnicas moleculares independientes de cultivo, como PCR-DGGE, la secuenciación de alto rendimiento (HTS) y la QPCR, pudo detectarse la presencia de *H. vineae* hasta el final de la fermentación. Si bien fue en menor concentración que *S. cerevisiae*, se demuestra que es capaz de mantenerse durante todo el proceso tolerando las condiciones adversas propias de la fermentación.

El vino obtenido a partir del inóculo con *H. vineae* pudo diferenciarse y fue el preferido durante la evaluación sensorial frente a un panel entrenado, destacándose por sus descriptores frutados y florales que correspondió con la producción 50 veces mayor de acetato β -feniletílico que para *S. cerevisiae*.

Ciertos compuestos clasificados como “inusuales”, la N-acetil tiramina y el ester acetato 1H-indol-3-etanol solo fueron identificados en el vino fermentado con *H. vineae*. Los descriptores asociados a estos compuestos, ni su influencia en la calidad organoléptica de los vinos han sido reportados, por lo que sería algo a abordar en futuros estudios para conocer la influencia que puedan llegar a tener sobre la percepción sensorial de los vinos.

A partir del trabajo realizado en esta Tesis se logró una caracterización detallada del comportamiento de las levaduras de la especie *H. vineae* en sus capacidades enológicas a nivel de laboratorio y se demostró que son levaduras compatibles con el proceso de fermentación a escala industrial.

Se determinó que mediante su uso en bodega conjuntamente con levaduras *Saccharomyces* se obtienen vinos que destacan organolépticamente frente a aquellos fermentados mediante una cepa comercial, favoreciendo así a la diferenciación de los vinos y a la generación de diversidad.

El trabajo desarrollado durante esta Tesis podrá ser aplicado como modelo para analizar el comportamiento de otras especies de levaduras autóctonas así como para la caracterización del conjunto de flora nativa de distintos viñedos. De ésta manera las bodegas que así lo deseen podrán generar una base de datos con las características de sus propias levaduras.

Referencias bibliográficas

- Albagnac, G. (1975). La decarboxylation des acides cinnamiques substitués par les levures. Annales de Technologie Agricole, 24(133):133–141.
- Alexandre, H. and Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine – a review. Australian Journal of Grape and Wine Research, (1981):119–127.
- Alexandre, H., Heintz, D., Chassagne, D., Guilloux, M., Charpentier, C., and Feuillat, M. (2001). Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. 26(December 2000):235–240.
- Allen, M. S. and Lacey, M. J. (1993). Methoxypyrazine grape flavour: influence of climate, cultivar and viticulture. Wein-Wissenschaft, 48(3-6):211–213.
- Allen, M. S. and Lacey, M. J. (1998). Methoxypyrazines of grapes and wines. In ACS Symposium Series, volume 714, pages 31–38. American Chemical Society.
- Amerine, M. A. (1980). The Technology of Wine Making. Avi Publishing Co Inc, 4th ed edition.
- Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M., and Mas, A. (2010). Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. International Journal of Food Microbiology, 144(2):257–262.
- Andorrà, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., and Mas, A. (2011). Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. Food Microbiology, 28(8):1483–1491.

- Arévalo, M., Úbeda, J., and Briones, A. (2007). β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. Enzyme and Microbial Technology, 40(3):420–425.
- Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., and Parish, M. E. (2002). Yeast Species Associated with Orange Juice : Evaluation of Different Identification Methods. Society, 68(4):1955–1961.
- Arroyo-López, F. N., Orlić, S., Querol, A., and Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. International Journal of Food Microbiology, 131(2-3):120–127.
- Arroyo-López, F. N., Pérez-Torrado, R., Querol, A., and Barrio, E. (2010). Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. Food Microbiology, 27(5):628–637.
- Ayran, A., Wilson, B., Strauss, C., and Williams, P. (1987). The properties of glycosides of *Vitis vinifera* and the comparisons of their β -D-glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible application of enology. American Journal of Enology and Viticulture, 38:182–188.
- Backhus, L. E., DeRisi, J., Brown, P. O., and Bisson, L. F. (2001). Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions. FEMS Yeast Research, 1(2):111–125.
- Barquet, M., Martín, V., Medina, K., Pérez, G., Carrau, F., and Gaggero, C. (2012). Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces* subspecies. Applied Microbiology and Biotechnology, 93(2):807–814.
- Bartowwsy, E. J., Francis, I. L., Bellon, J. R., and Henschke, P. A. (2002). Is buttery aroma perception in wines predictable from the diacetyl concentration. Australian Journal of Grape and Wine Research, 8(3):180–185.
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J. M., Salmon, J. M., and 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.

- Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S., and Drawert, F. (1986). Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. Journal of the Science of Food and Agriculture, 37(9):927–943.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., and Gómez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: The use of maceration enzymes and enological tannins. International Journal of Food Science and Technology, 40(8):867–878.
- Bayonove, C. and Cordonnier, R. (1971). Recherches sur l’arome du muscat. III. Etude de la fraction terpenique. Ann Technol Agr, 20:247–355.
- Bayonove, C. L., Baumes, R. L., Crouzet, J., and Gunata, Y. Z. (1998). Arômes. In Oenologie, Fondements Scientifiques et Technologiques. Tec and Doc, Paris.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., and Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. Systematic Applied Microbiology, 25(2):287–93.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarede, I., and Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. International Journal of Food Microbiology, 122(3):312–320.
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., and 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. and Fleet, G. H. (1993). Yeasts-Metabolism of sugars. Wine Microbiology and Biotechnology, pages 55–75.
- Bisson, L. F. and Kunkee, R. E. (1991). Microbial Interactions During Wine Production. In Mixed Cultures in Biotechnology, pages 37–68.
- Bisson, L. F. and Maynard, A. (1999). Stuck and sluggish fermentations. American Journal of Enology and Viticulture, 50(1):107–119.
- Blouin, J. (2004). Maduración y madurez de la uva. Mundi-Prensa Libros.

- Boido, E. (2002). Modificaciones producidas por la fermentación maloláctica en la fracción aromática de los vinos Tannat. Unpublished Ph. D. thesis in Chemistry. Uruguay, Montevideo: Universidad de la Republica.
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., and Dellacassa, E. (2003). Aroma Composition of *Vitis vinifera* Cv. Tannat: the Typical Red Wine from Uruguay. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(18):5408–5413.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., and Kunkee, R. (1995). Principles and Practices of Winemaking, volume 1. Chapman and Hall New York, New York.
- Boursiquot, J.-M. (1987). Contribution à l'étude des esters hydroxycinnamoyltartriques chez le genre *Vitis*: recherche d'application taxonomique. Ministère de l'agriculture, Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier.
- Braus, G. H. (1991). Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. Microbiological Reviews, 55(3):349–370.
- Buerth, C., Heilmann, C. J., Klis, F. M., de Koster, C. G., Ernst, J. F., and Tielker, D. (2011). Growth-dependent secretome of *Candida utilis*. Microbiology, 157(9):2493–2503.
- Cabras, P. and Angioni, A. (2000). Pesticide Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(4):967–973.
- Campo, E., Do, B., Ferreira, V., and Valentin, D. (2008). Aroma properties of young Spanish monovarietal white wines: a study using sorting task, list of terms and frequency of citation. Australian Journal of Grape and Wine Research, 14(2):104–115.
- Canonica, L., Comitini, F., Oro, L., and Ciani, M. (2016). Sequential fermentation with selected immobilized non-*Saccharomyces* yeast for reduction of ethanol content in wine. Frontiers in Microbiology, 7(MAR):278.
- Carlin, S. (1998). Metodi di arricchimento di composti dell'aroma per una possibile tipicizzazione di vini Traminer. (Doctoral dissertation).

- Carrau, F., Gaggero, C., and Aguilar, P. S. (2015). Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. Trends in Biotechnology, 33(3):148–154.
- Carrau, F., Medina, K., Fariña, L., Boido, E., and Dellacassa, E. (2010). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. International Journal of Food Microbiology, 143(1-2):81–85.
- Carrau, F., Medina, K., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M., Barquet, M., Gaggero, C., Boido, E., and Dellacassa, E. (2012). Increased complexity and Chardonnay quality in spontaneous fermentation and cofermentation with *Hanseniaspora vineae*. In Sixtythird National Conference. Science, a platform for progress, page 56, Portland, Oregon, USA.
- Carrau, F. M. (2003). Characterization of yeast in relation to the ability to utilize nitrogen—Studies of aroma compounds. Unpublished Ph. D. thesis in Chemistry. Uruguay, Montevideo: Universidad de la Republica.
- Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., and Henschke, P. A. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. FEMS Microbiology Letters, 243(1):107–115.
- Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. A., and Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. FEMS Yeast Research, 8(7):1196–1207.
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., and Henschke, P. A. (1998). Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. American Journal of Enology and Viticulture, 49(3):283–288.
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., and Todd, B. E. N. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. Australian Journal of Grape and Wine Research, 3(1984):2–8.
- Chatonnet, P., Barbe, C., Boidron, J. N., and Dubourdieu, D. (1993a). Origines et incidences organoleptiques de phenols volatils dans les vins. Application

- a la maitrise de la vinification et de l'elevege. In Connaissance aromatique des cepages et qualite des vins. Montpellier (France). 9-10 Fev 1993.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., and Lavigne, V. (1993b). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. Journal of the Science of Food and Agriculture, 62(2):191–202.
- Ciani, M. and Comitini, F. (2011). Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. Annals of Microbiology, 61(1):25–32.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Research, 10(2):123–133.
- Ciani, M. and Ferraro, L. (1998). Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. Journal of Applied Microbiology, 85(2):247–254.
- Ciani, M. and Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14(2):199–203.
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J. A., Oro, L., Rodrigues, A. J., and Gonzalez, R. (2016). Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. Frontiers in Microbiology, 7:642.
- Ciani, M. and Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. Biotechnology Letters, 17(11):1247–1250.
- Clarke, C. F. (2000). New advances in coenzyme Q biosynthesis. Protoplasma, 213(3-4):134–147.
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., and Rodríguez-Vico, F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. International Journal of Food Microbiology, 98(3):301–8.

- Cocolin, L., Heisey, A., and Mills, D. A. (2001). Direct Identification of the Indigenous Yeasts in Commercial Wine Fermentations. American Journal of Enology and Viticulture, 52(1):49–53.
- Coghlan, A. (2006). The brewer's tale. New Scientist, 192(2583):32–33.
- Combina, M., Elía, a., Mercado, L., Catania, C., Ganga, a., and Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. International Journal of Food Microbiology, 99(3):237–43.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2011a). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 28(5):873–82.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2011b). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 28(5):873–82.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., and Varela, C. (2014). Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. Applied and Environmental Microbiology, 80(5):1670–1678.
- Cordente, A. G., Curtin, C. D., Varela, C., and Pretorius, I. S. (2012). Flavour-active wine yeasts.
- Cordonnier, R. (1989). Mécanismes et facteurs de formation des composés à saveurs herbacées. Revue des Œnologues, 53:25–27.
- Cordonnier, R. and Bayonove, C. (1974). Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 278:3387–3390.
- Dell'Oro, V. and Di Stefano, R. (1990). Produzione di composti aromatici nella conservazione delle uve in atmosfera di anidride carbonica. Vini d'Italia, 32(2):26–33.

- Di Stefano, R. (1985). Gli etil fenoli nei vini. Vignevini, 5:35–38.
- Díaz-Montaña, D. M. and de Jesús Ramírez Córdova, J. (2009). The Fermentative and Aromatic Ability of Kloeckera and Hanseniaspora Yeasts, pages 281–305. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J., and Hewlins, M. J. E. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 278(10):8028–8034.
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. International Journal of Food Microbiology, 147(3):170–180.
- 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.
- Dupin, I. V. S., McKinnon, B. M., Ryan, C., Boulay, M., Markides, A. J., Jones, G. P., Williams, P. J., and Waters, E. J. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8):3098–3105.
- Enzell, C. R. (1981). Influence of curing on the formation of tobacco flavour. In Walter de Gruyter, editor, Flavour'81, pages 449–478. Schreier, Berlin.
- Enzell, C. R. (1985). Biodegradation of carotenoids-an important route to aroma compounds. Pure and Applied Chemistry, 57(5):693–700.
- Epifanio, S. I., Gutierrez, A. R., Santamaría, M. P., and López, R. (1999). The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. American Journal of Enology and Viticulture, 50(2):219–224.
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., and Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on

- colour stability and wine astringency. Australian Journal of Grape and Wine Research, 7(3):153–159.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5 . 8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology, 49:329–337.
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., and Querol, A. (1998). The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, 1(2):143–8.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M. J., García-Maiquez, E., Uruburu, F., and Querol, A. (2001). Yeast Population Dynamics during the Fermentation and Biological Aging of Sherry Wines. Applied and Environmental Microbiology, 67(5):2056–2061.
- Etievant, P. X. (1991). Wine. In Dekker, M., editor, Volatile compounds in food and beverages, pages 483–546. Maarse, H, New York.
- Fang, Y. and Qian, M. C. (2006). Quantification of selected aroma-active compounds in Pinot noir wines from different grape maturities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(22):8567–8573.
- Fanzone, M., Peña-Neira, A., Gil, M., Jofré, V., Assof, M., and Zamora, F. (2012). Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. Food Research International, 45(1):402–414.
- Fariña, L., Medina, K., Urruty, M., Boido, E., Dellacassa, E., and Carrau, F. (2012). Redox effect on volatile compound formation in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chemistry, 134(2):933–939.
- Fariña, L., Villar, V., Ares, G., Carrau, F., Dellacassa, E., and Boido, E. (2015). Volatile composition and aroma profile of Uruguayan Tannat wines. Food Research International, 69:244–255.
- Favale, S., Pietromarchi, P., and Ciolfi, G. (2007). Metabolic activity and interactions between two strains, *Saccharomyces cerevisiae* r.f. bayanus (SBC2)

- and *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *uvarum* (S6u), in pure and mixed culture fermentations. VITIS - Journal of Grapevine Research, 46(1):39–43.
- Ferreira, A. M., Clímaco, M. C., and Faia, A. M. (2001). The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - A preliminary study. Journal of Applied Microbiology, 91(1):67–71.
- Feuillat, M. and Charpentier, C. (1982). Autolysis of yeasts in champagne. American Journal of Enology and Viticulture, 33(1):6–13.
- Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 86(1-2):11–22.
- Fleet, G. H. (1993). Wine microbiology and biotechnology. Taylor & Francis, New York, first edition.
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Research, 8(7):979–995.
- Flood, A. E., Johns, M. R., and White, E. T. (1996). Mutarotation of D-fructose in aqueous-ethanolic solutions and its influence on crystallisation. Carbohydrate Research, 288:45–56.
- Francis, I. L., Kassara, S., Noble, A. C., and Williams, P. J. (1998a). The contribution of glycoside precursors to Cabernet Sauvignon and Merlot aroma. In Waterhouse, A. L. and Ebeler, S. E., editors, Chemistry of Wine Flavor, ACS Symposium Series, chapter 2, pages 13–30. American Chemical Society.
- Francis, I. L., Kassara, S., Noble, A. C., and Williams, P. J. (1998b). The contribution of glycoside precursors to Cabernet Sauvignon and Merlot aroma.
- Fugelsang, K. C. and Edwards, C. G. (2007). Wine microbiology: Practical applications and procedures. Springer, New York, second edition.
- Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., and Hazelwood, L. (2016). High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. Food Microbiology, 60:147–159.

- Ganga, M. A. and Martínez, C. (2004). Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. Journal of Applied Microbiology, 96(1):76–83.
- Gao, C. and Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. Journal of Applied Microbiology, 65(5):405–409.
- Giorello, F. M., Berná, L., Greif, G., Camesasca, L., Salzman, V., Medina, K., Robello, C., Gaggero, C., Aguilar, P. S., and Carrau, F. (2014). Genome Sequence of the Native Apiculate Wine Yeast *Hanseniaspora vineae* T02/19AF. Genome announcements, 2(3):e00530–14.
- Giovani, G. and Rosi, I. (2007). Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. International Journal of Food Microbiology, 116(1):19–24.
- Giovani, G., Rosi, I., and Bertuccioli, M. (2012). Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-Saccharomyces yeast strains during alcoholic fermentation. International Journal of Food Microbiology, 160(2):113–118.
- Gonzalez, R., Quirós, M., and Morales, P. (2012). Yeast respiration of sugars by non-Saccharomyces yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. Trends in Food Science & Technology, pages 1–7.
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., and Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: A critical review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55(2):202–218.
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., and Brena, B. M. (2011). A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. Process Biochemistry, 46(1):385–389.
- Gonzalez-Viñas, M. A., Perez-Coello, M. S., Cabezudo, M. D., and Martin-Alvarez, P. J. (1998). Sensory analysis of aroma attributes of young Airen white wines during storage in the bottle. Journal of Food Quality, 21(4):285–297.

- Grando, M. S., Versini, G., Nicolini, G., and Mattivi, F. (2015). Selective use of wine yeast strains having different volatile phenols production. VITIS-Journal of Grapevine Research, 32(1):43.
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., von Wallbrunn, C., Alexandre, H., and Guilloux-Benatier, M. (2015). Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation. Food Microbiology, 50:70–77.
- Gueguen, Y., Chemardin, P., Arnaud, A., and Galzy, P. (1995). Comparative study of extracellular and intracellular β -glucosidases of a new strain of *Zygosaccharomyces bailii* isolated from fermenting agave juice. Journal of Applied Bacteriology, 78(3):270–280.
- Gueguen, Y., Chemardin, P., Janbon, J., Arnaud, A., and Galzy, P. (1996). A Very Efficient β -Glucosidase Catalyst for the Hydrolysis of Flavor Precursors of Wines and Fruit Juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(8):2336–2340.
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., and Cordonnier, R. E. (1985a). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. Journal of Chromatography A, 331:83–90.
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., and Cordonnier, R. E. (1985b). The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components cv Muscat during first development and maturation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 36(9):857–862.
- Günata, Z., Blondeel, C., Vallier, M. J., Lepoutre, J. P., Sapis, J. C., and Watanabe, N. (1998). An Endoglycosidase from Grape Berry Skin of Cv. M. Alexandria Hydrolyzing Potentially Aromatic Disaccharide Glycosides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(7):2748–2753.
- Günata, Z., Dugelay, I., Sapis, J. C., Baumes, R., and Bayonove, C. (1990). Action des glycosidases exogenes au cours de la vinification: Liberation de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 24(3):133–144.

- Guth, J. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(8):3027–3032.
- Haase, S. B. and Lew, D. J. (1997). Flow cytometric analysis of DNA content in budding yeast. Methods in Enzymology, 283:322–332.
- Harris, R. L. N., Lacey, M. J., Brown, W. V., and Allen, M. S. (1987). Determination of 2-methoxy-3-alkylpyrazines in wine by gas chromatography/mass spectrometry. VITIS-Journal of Grapevine Research, 26(4):201.
- Heard, G. and Fleet, G. (1988a). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. Journal of Applied Bacteriology, 65(1):23–28.
- Heard, G. M. and Fleet, G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. Applied and Environmental Microbiology, 50(3):727–728.
- Heard, G. M. and Fleet, G. H. (1986). Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. Journal of Applied Bacteriology, 60(6):477–481.
- Heard, G. M. and Fleet, G. H. (1988b). The effect of sulphur dioxide on yeast growth during natural and inoculated wine fermentation. Australian and New Zealand Wine Industry Journal, 3:57–60.
- Heider, J. and Fuchs, G. (1997). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. European Journal of Biochemistry, 243(3):577–596.
- Henick-Kling, T. (1993). Malolactic fermentation. In Wine Microbiology and Biotechnology, pages 289–326. Taylor & Francis, Abingdon, UK.
- Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., and Monk, P. (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. Journal of Applied Microbiology, 84:865–876.
- Henschke, P. A. (1997). Wine yeast. In Yeast sugar metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications., pages 527–560. Technomic Publishing, Lancaster, PA.

- Henschke, P. A., Costello, P. J., and Bartowsky, E. (2002). Management of malolactic fermentation: wine flavour manipulation. Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker, (461):7–14.
- Henschke, P. A. and Jiranek, V. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. Wine Microbiology and Biotechnology, pages 77–164.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P. J., and Cabezudo, M. D. (1990). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. American Journal of Enology and Viticulture, 41(4):313–318.
- Heymann, H., Noble, A. C., and Boulton, R. B. (1986). Analysis of methoxypyrazines in wines. 1. Development of a quantitative procedure. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34(2):268–271.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2006a). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. Applied and Environmental Microbiology, 72(11):7148–7155.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2007). Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. FEMS Yeast Research, 7(8):1340–1349.
- Hierro, N., González, Á., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2006b). Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: Effect of grape ripeness and cold maceration. FEMS Yeast Research, 6(1):102–111.
- Hjelmeland, A. K. and Ebeler, S. E. (2015). Glycosidically Bound Volatile Aroma Compounds in Grapes and Wine: A Review. American Journal of Enology and Viticulture, 66(1):1–11.
- Huang, C. J., Lee, S. L., and Chou, C. C. (2001). Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. Food Research International, 34(4):277–282.
- Hyun, M. W., Yun, Y. H., Kim, J. Y., and Kim, S. H. (2011). Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. Mycobiology, 39(4):257–265.

- Jackson, D., Lombard, P., and Kabinett, L. Q. (1993). Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review. American Journal of Enology and Viticulture, 44(4):409–430.
- Johnson, H. and Diéguez, R. D. (2005). Historia del vino. Blume, Barcelona, naturart edition.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. H. P. H., and Pretorius, I. S. (2003). The occurrence of non-Saccharomyces cerevisiae yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. South African Journal of Enology and Viticulture, 24(2):63–69.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., and Pretorius, I. S. (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. South African Journal of Enology and Viticulture, 27(1):15–39.
- Jolly, N. P., Varela, C., and Pretorius, I. S. (2013). Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. FEMS Yeast Research, 14(2):215–237.
- Joslin, W. S. and Ough, C. S. (1978). Cause and fate of certain C6 compounds formed enzymatically in macerated grape leaves during harvest and wine fermentation. American Journal of Enology and Viticulture, 29(1):11–17.
- Jubany, S., Tomasco, I., de León, I. P., Medina, K., Carrau, F., Arrambide, N., Naya, H., and Gaggero, C. (2008). Toward a global database for the molecular typing of Saccharomyces cerevisiae strains. FEMS Yeast Research, 8(3):472–484.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., and Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: A review. Bioresource Technology, 77(3):215–227.
- Kim, D.-H., Hong, Y.-A., and Park, H.-D. (2008). Co-fermentation of grape must by Issatchenkia orientalis and Saccharomyces cerevisiae reduces the malic acid content in wine. Biotechnology Letters, 30(9):1633–1638.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., and Stalpers, J. A. (2008). Dictionary of the Fungi. Wallingford, UK, 10 edition.

- Kunkee, R. E., Bisson, L. F., Rose, A. H., and Harrison, J. S. (1993). The Yeasts: Yeast Technology. Academic Press London.
- Kurtzman, C., Fell, J. W., and Boekhout, T. (2011a). The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., and Boekhout, T. (2011b). Gene Sequence Analyses and other DNA-Based Methods for Yeast Species Recognition. In The Yeasts: a taxonomic study, pages 137–144. Elsevier B.V.
- Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 73(4):331–371.
- Lacey, M. J., Allen, M. S., Harris, R. L. N., and Brown, W. V. (1991). Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines. American Journal of Enology and Viticulture, 42(2):103–108.
- Lambrechts, M. G. and Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma.
- Languet, P., Aguera, E., Samson, A., Ortiz-Julien, A., and Salmon, J. (2005). Valorization aromatique des mouts par l'utilisation séquentielle des levures d'espèces non-Saccharomyces et Saccharomyces. Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologicques: magazine trimestriel d'information professionnelle, 117(117):31–33.
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Le Quéré, J.-L., and Bonnarme, P. (2000). Novel Scheme for Biosynthesis of Aryl Metabolites from l-Phenylalanine in the Fungus *Bjerkandera adusta*. Applied and Environmental Microbiology, 66(4):1517–1522.
- Laurent, M.-H., Henick-Kling, T., and Acree, T. E. (1994). Changes in the aroma and odor of Chardonnay wine due to malolactic fermentation. Wein-Wissenschaft, 49(1):3–10.
- Lecas, M., Gunata, Y. Z., Sapis, J. C., and Bayonove, C. L. (1991). Purification and partial characterization of bb-glucosidase from grape. Phytochemistry, 30(2):451–454.

- Legras, J. L. and Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. FEMS Microbiology Letters, 221(2):249–255.
- Lleixa, J., Martin, V., Portillo, C., Carrau, F., Beltran, G., and Mas, A. (2016). Comparison of the performances of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking. Frontiers in Microbiology, 7:338.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., and Villa, T. G. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape must from Northwest Spain. American Journal of Enology and Viticulture, 42(2):141–144.
- López, S., Mateo, J., and Maicas, S. (2015). Screening of *Hanseniaspora* Strains for the Production of Enzymes with Potential Interest for Winemaking. Fermentation, 2(1):1.
- Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M., and Voilley, A. (1994a). Influence of Yeast Walls on the Behavior of Aroma Compounds in a Model Wine. American Journal of Enology and Viticulture, 45(1).
- Lubbers, S., Voilley, A., Feuillat, M., and Charpentier, C. (1994b). Influence of Mannoproteins from Yeast on the Aroma Intensity of a Model Wine.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, E. G., Fernández, C. R., and Pérez, M. S. (2003). Brock Biología de los microorganismos. Prentice Hall-Pearson Education Inc., 10 edition.
- Magyar, I. and Panyik, I. (1989). Biological Deacidification of Wine with *Schizosaccharomyces pombe* Entrapped in Ca-Alginate Gel. American Journal of Enology and Viticulture, 40(4):233–240.
- Magyar, I. and Tóth, T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 28(1):94–100.
- Martí-Raga, M., Martín, V., Gil, M., Sancho, M., Zamora, F., Mas, A., and Beltran, G. (2016). Contribution of yeast and base wine supplementation on sparkling wine composition. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(15):4962–4972.

- Martin, V., Boido, E., Giorello, F., Mas, A., Dellacassa, E., and Carrau, F. (2016a). Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains. Yeast, 33(7):323–328.
- Martin, V., Giorello, F., Fariña, L., Minteguiaga, M., Salzman, V., Boido, E., Aguilar, P. S., Gaggero, C., Dellacassa, E., Mas, A., and Carrau, F. (2016b). De novo synthesis of benzenoid compounds by the yeast *Hanseniaspora vineae* increases the flavor diversity of wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(22):4574–4583.
- Mateo, J. J., Jimenez, M., Huerta, T., and Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. International Journal of Food Microbiology, 14(2):153–160.
- Mauriello, G., Capece, A., D’Auria, M., Garde-Cerd??n, T., and Romano, P. (2009). SPME-GC method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. Food Microbiology, 26(3):246–252.
- McKay, A. (1988). A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. FEMS Microbiology Letters, 56(3):355–358.
- McKay, a. M. (1990). Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. Letters in Applied Microbiology, 11(1):41–44.
- Medina, K. (2014). Biodiversidad de levaduras no-*Saccharomyces*: Efecto del metabolismo secundario en el color y el aroma de vinos de calidad. Unpublished Ph. D. thesis in Biological Sciences. Uruguay, Montevideo: Universidad de la Republica.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., and Carrau, F. (2012). Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. International Journal of Food Microbiology, 157(2):245–250.
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., and Carrau, F. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. Food Chemistry, 141(3):2513–21.

- Medina, K., Ferreri, L., and Fariña, L. (2007). Aplicación de la levadura *Hanseniaspora vineae* en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación. Revista Enología, 4:1–6.
- Meganathan, R. (2001). Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 203(2):131–139.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and Leão, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. Journal of Applied Microbiology, 97(3):540–545.
- Meroth, C. B., Hammes, W. P., and Hertel, C. (2003). Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 69(12):7453–7461.
- Middelbeek, E. J., Stumm, C., and Vogels, G. D. (1980). Effects of *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 46(2):205–20.
- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., and Vasconcelos, I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. International Journal of Food Microbiology, 103(3):285–294.
- Moreno, J. J., Millán, C., Ortega, J. M., and Medina, M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. Journal Of Industrial Microbiology, 7(3):181–189.
- Mostert, T. T. (2013). Investigating the secretome of non *Saccharomyces* yeast in model wine. Unpublished M. Sc. thesis. South Africa, Stellenbosch: Institute for Wine Biotechnology, Faculty of AgriSciences. Stellenbosch University Institute, (March):98.
- Nagel, C. W., Baranowski, J. D., Wulf, L. W., and Powers, J. R. (1979). The hydroxycinnamic acid tartaric acid ester content of musts and grape varieties grown in the Pacific Northwest. American Journal of Enology and Viticulture, 30(3):198–201.

- Nguyen, H. V. and Panon, G. (1998). The yeast *Metschnikowia pulcherrima* has an inhibitory effect against various yeast species. Sciences des Aliments, 18(5):515–526.
- Nicolini, G., Mattivi, F., and Versini, G. (1994). Uso di glicosidasi esogene in mosti e vini ed attività enzimatiche collaterali tUse of exogenous glycosidases in musts and wines and enzymic side activities. Rivista di Viticoltura e di Enologia, 47(1):45–60.
- Nicolini, G., Versini, G., Larcher, R., Mattivi, F., Moser, S., Carlin, S., Bertamini, M., and Stefanini, M. (2001). Qualità potenziale e possibili miglioramenti di uve e vini Merlot. In Atti convegno 2a Mostra dei Merlot d'Italia., Aldeno.
- Ong, B. Y. and Nagel, C. W. (1978). Hydroxycinnamic acid-tartaric acid ester content in mature grapes and during the maturation of White Riesling grapes. American Journal of Enology and Viticulture, 29(4):277–281.
- Orlova, I., Marshall-Colón, A., Schnepf, J., Wood, B., Varbanova, M., Fridman, E., Blakeslee, J. J., Peer, W. A., Murphy, A. S., and Rhodes, D. (2006). Reduction of benzenoid synthesis in petunia flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport. The Plant Cell, 18(12):3458–3475.
- Padilla, B., Gil, J. V., and Manzanares, P. (2016). Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. Frontiers in Microbiology, 7:411.
- Pallmann, C., Brown, J., Olineka, T., Cocolin, L., Mills, D., and Bisson, L. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Alternative Agriculture, 3(July):198–203.
- Pando, R., Lastra, A., and Suarez, B. (2012). Screening of enzymatic activities in non-Saccharomyces cider yeast. Journal of Food Biochemistry, 36(6):683–689.
- Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E., and Carrau, F. (2011). A quick screening method to identify β -glucosidase acti-

- vity in native wine yeast strains: Application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(1):47–55.
- Pérez-Coello, M. S., Sanz, J., and Cabezudo, M. D. (1999). Determination of volatile compounds in hydroalcoholic extracts of French and American oak wood. American Journal of Enology and Viticulture, 50(2):162–165.
- Pérez-Navado, F., Albergaria, H., Hogg, T., and Girio, F. (2006). Cellular death of two non-Saccharomyces wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 108(3):336–45.
- Peynaud, E. (1996). Enología Práctica, Conocimiento y elaboración del vino. Madrid-Barcelona-Mexico, 3^o edition.
- Peynaud, E. and Domercq, S. (1959). A review of microbial problems in winemaking in France. American Journal of Enology and Viticulture, 10(2):69–77.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., and Hogg, T. (2004a). Ethanol tolerance of five non-Saccharomyces wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - Influence of different culture conditions. Food Microbiology, 21(4):439–447.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., and Hogg, T. (2004b). Ethanol tolerance of five non-Saccharomyces wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. Food Microbiology, 21(4):439–447.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast, 16(8):675–729.
- Pronk, J. T., Steensma, H. Y., and Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 12(16):1607–1633.
- Pugh, S., McKenna, R., Halloum, I., and Nielsen, D. R. (2015). Engineering *Escherichia coli* for renewable benzyl alcohol production. Metabolic Engineering Communications, 2:39–45.

- Querol, A., Barrio, E., and Ramón, D. (1992). A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. Systematic and Applied Microbiology, 15(3):439–446.
- Querol, A., Jiménez, M., and Huerta, T. (1990). Microbiological and Enological Parameters during Fermentation of Musts from Poor and Normal Grape-Harvests in the Region of Alicante (Spain). Journal of Food Science, 55(6):1603–1606.
- Quesada, M. and Cenis, J. (1995a). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. American Journal of Enology and Viticulture, 46(2):204–208.
- Quesada, M. P. and Cenis, J. L. (1995b). Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the Characterization of Wine Yeasts. American Journal of Enology and Viticulture, 46(2):204 LP – 208.
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., and Morales, P. (2014). Selection of non-Saccharomyces yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. International Journal of Food Microbiology, 181:85–91.
- Radler, F. (1993). Yeasts-metabolism of organic acids. In Fleet, G., editor, Wine Microbiology and Biotechnology, pages 165–182. Taylor & Francis, New York, first edition.
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., and Cocolina, L. (2012). *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 78(6):1987–1994.
- Rapp, A., Güntert, M., and Almy, J. (1985). Identification and significance of several sulfur-containing compounds in wine. American Journal of Enology and Viticulture, 36(3):219–221.
- Rapp, A. and Mandery, H. (1986). Wine aroma. Experientia, 42(8):873–884.
- Ravaglia, S. and Delfini, C. (1994). Inhibitory effects of medium chain fatty acids on yeasts cells growing in synthetic nutrient medium and in the sparkling Moscato wine «Asti Spumante». Wein-Wissenschaft, 49(1):40–45.

- Regueiro, L. A., Costas, C. L., and Rubio, J. E. L. (1993). Influence of viticultural and enological practices on the development of yeast populations during winemaking. American Journal of Enology and Viticulture, 44(4):405–408.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., and Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. International Journal of Food Microbiology, 134(3):201–210.
- Renouf, V., Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Applied Microbiology and Biotechnology, 75(1):149–164.
- Ribéreau-Gayon, P., Boidron, J. N., and Terrier, A. (1975). Aroma of Muscat grape varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23(6):1042–1047.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., and Lonvad, A. (2003). Tratado de Enología: volúmenes I y II. Ed. Hemisferio Sur-Mundi Prensa, Madrid.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., and Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. International Journal of Food Microbiology, 86(1-2):181–188.
- Romano, P. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 86(1-2):169–180.
- Romano, P. and Suzzi, G. (1992). Preliminary characterization of *Zygosaccharomyces* for oenological purpose. Biologia Oggi, 6:257–262.
- Romano, P. and Suzzi, G. (1993). Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeast. Journal of Applied Bacteriology, 75(6):541 – 545.
- Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., and Gómez-Plaza, E. (2012). The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. Food Chemistry, 130(3):626–631.

- Romeyer, F. (1984). Les composés phénoliques du raisin, *Vitis vinifera*: évolution au cours de la maturation du fruit et conséquences technologiques. Unpublished Ph. D. thesis Université Montpellier II.
- Rose, A. H. (1987). Responses to the chemical environment. London: Academic Press, 1987., yeast edition.
- Rosi, I., Gheri, A., Domizio, P., and Fia, G. (1999). Production of parietal macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* and their influence on malolactic fermentation. In Colloids and mouthfeel in wines, pages 35–40.
- Rosi, L., Vinella, M., and Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. Journal of Applied Bacteriology, 77(December 1994):519–527.
- Rossouw, D. and Bauer, F. F. (2016). Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. Food Microbiology, 55:32–46.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., and Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. Food Microbiology, 32(2):243–253.
- Scanes, K. T., Hohmann, S., and Prior, B. a. (1998). Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A Review. South African Journal of Enology and Viticulture, 19(1):17–24.
- Schneider, R., Kotseridis, Y., Ray, J.-L., Augier, C., and Baumes, R. (2003). Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of a stable isotope dilution assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(11):3243–3248.
- Schreier, P. (1979). Flavor composition of wines: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 12(1):59–111.
- Schreier, P. (1984). Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles. Huthig.

- Schutz, M. and Gafner, J. (1994). Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. Letters in Applied Microbiology, 19(4):253–257.
- Sefton, M. a., Francis, I. L., and Williams, P. J. (1993). The Volatile Composition of Chardonnay Juices: A Study by Flavor Precursor Analysis. American Journal of Enology and Viticulture, 44(4):359–370.
- Shimizu, K. (1993). Killer yeasts. In Wine Microbiology and Biotechnology, pages 243–264.
- Siebert, M., Bechthold, A., Melzer, M., May, U., Berger, U., Schröder, G., Schröder, J., Severin, K., and Heide, L. (1992). Ubiquinone biosynthesis Cloning of the genes coding for chorismate pyruvate-lyase and 4-hydroxybenzoate octaprenyl transferase from *Escherichia coli*. FEBS letters, 307(3):347–350.
- Smekal, O., Yasin, M., Fewson, C. A., Reid, G. A., and Chapman, S. K. (1993). L-mandelate dehydrogenase from *Rhodotorula graminis*: comparisons with the L-lactate dehydrogenase (flavocytochrome b2) from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical Journal, 290:103–107.
- Soden, A. (1999). The fermentation properties of non-*Saccharomyces* wine yeasts and their interaction with *Saccharomyces cerevisiae*. Unpublished Ph. D. Thesis University of Adelaide, Department of Horticulture, Viticulture and Oenology.
- Soden, a., Francis, I. L., Oakey, H., and Henschke, P. a. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. Australian Journal of Grape and Wine Research, 6(1):21–30.
- Sousa-Dias, S., Gonçalves, T., Leyva, J. S., Peinado, J. M., and Loureiro-Dias, M. C. (1996). Kinetics and regulation of fructose and glucose transport systems are responsible for fructophilily in *Zygosaccharomyces bailii*. Microbiology, 142(7):1733–1738.
- Starmer, W. T. and Lachance, M. A. (2011). Yeast ecology. The Yeasts, 1(1987):65–83.

- Steyer, D., Ambroset, C., Brion, C., Claudel, P., Delobel, P., Sanchez, I., Erny, C., Blondin, B., Karst, F., and Legras, J.-L. (2012). QTL mapping of the production of wine aroma compounds by yeast. BMC genomics, 13(1):573.
- Strauss, C. R., Wilson, B., Gooley, P. R., and Williams, P. J. (1986). Role of monoterpenes in grape and wine flavor. In ACS Symposium series-American Chemical Society (USA).
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., and Rensburg, P. V. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. Journal of Applied Microbiology, 91:182–190.
- Suárez-Lepe, J. and Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. Trends in Food Science & Technology, 23(1):39–50.
- Suárez Lepe, J. A. (1997). Levaduras vínicas: funcionalidad y uso en bodega. Mundi Prensa Libros S.A., Madrid.
- Sun, Z., Ning, Y., Liu, L., Liu, Y., Sun, B., Jiang, W., Yang, C., and Yang, S. (2011). Metabolic engineering of the L-phenylalanine pathway in Escherichia coli for the production of S-or R-mandelic acid. Microbial Cell Factories, 10:71.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., and Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research, 11(2):139–173.
- Swiegers, J. H. and Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. Advances in Applied Microbiology, 57(SUPPL. A):131–175.
- Swiegers, J. H., Saerens, S. M. G., and Pretorius, I. S. (2016). Novel yeast strains as tools for adjusting the flavor of fermented beverages to market specification. In Daphna Havkin-Frenkel and Nativ Dudai, editor, Biotechnology in Flavor Production, pages 62–135. John Wiley and Sons, Ltd., second edition.
- Thurston, P. A., Taylor, R., and Ahvenainen, J. (1981). Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. Journal of the Institute of Brewing, 87(2):92–95.

- Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., and Suzzi, G. (2012). Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. Food Microbiology, 29(1):18–26.
- Toit, M. and Pretorius, I. S. (2000). Microbial Spoilage and Preservation of Wine : Using Weapons from Nature ' s Own Arsenal- A Review. South African Journal of Enology and Viticulture, 21:74–96.
- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., and Dubourdieu, D. (1998). A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(12):5215–5219.
- Toriija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., and Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 79(3-4):345–352.
- Toriija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., and Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 80(1):47–53.
- Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. Applied Microbiology and Biotechnology.
- Vasserot, Y., Christiaens, H., Chemardin, P., Arnaud, A., and Galzy, P. (1989). Purification and properties of a BT-glucosidase of *Hanseniaspora vineae* Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. Journal of Applied Microbiology, 66(4):271–279.
- Versavaud, A., Dulau, L., and Hallet, J.-N. (1993). Etude écologique de la microflore levurienne spontanée du vignoble des Charentes et approche moléculaire de la diversité infraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Revue Française de Oenologie, 142(142):20–29.
- Versini, G., Carlin, S., Nicolini, G., Dellacassa, E., and Carrau, F. (1999). Updating of varietal aroma components in wines. In Vitiviniculture in the Southern Hemisphere: proceedings of the 7th Latin-American Congress of viticulture and winemaking, pages 323–349.

- Versini, G., Dalla Serra, A., and Pellegrini, R. (1984). Contributo alla conoscenza dell'aroma dei vini da macerazione carbonica. L'Enotecnico, 20(10):871–878.
- Versini, G., Orriols, I., and Dalla Serra, A. (1994). Aroma components of Galician Albariño, Loureira and Godello wines. Journal of Grapevine Research, 33(3):165–170.
- Versini, G. and Tomasi, T. (1983). Confronto tra i componenti volatili dei vini rossi ottenuti con macerazione tradizionale e macerazione carbonica [importanza differenziante del cinnamato di etile]. L'Enotecnico, 19:595–600.
- Viana, F., Belloch, C., Vallés, S., and Manzanares, P. (2011). Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: impact on 2-phenylethyl acetate production. International Journal of Food Microbiology, 151(2):235–40.
- Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S., and Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. Food Microbiology, 25(6):778–85.
- Viana, F., Gil, J. V., Vallés, S., and Manzanares, P. (2009). Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 135(1):68–74.
- Voirin, S. G., Baumes, R. L., Bittour, S. M., Gunata, Z. Y., and Bayonove, C. L. (1990). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38(6):1373–1378.
- Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., and Edwards, C. G. (2003). Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. Journal of Applied Microbiology, 94(3):349–359.
- Waters, E., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K., Colby, C., O'Neill, B., HØJ, P., and Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. Proteins, 11(2):215–225.

- Waters, E. J., Pellerin, P., and Brillouet, J. M. (1994). A Saccharomyces mannoprotein that protects wine from protein haze. Carbohydrate Polymers, 23(3):185–191.
- Whitaker, J. R. (1984). Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. Enzyme and Microbial Technology, 6(8):341–349.
- Widhalm, J. R. and Dudareva, N. (2015). A Familiar Ring to It: Biosynthesis of Plant Benzoic Acids. Molecular Plant, 8(1):83–97.
- Williams, P. J. (1993). Hydrolytic flavor release in fruit and wines through hydrolysis of nonvolatile precursors. Flavor Science: Sensible Principals and Technique, pages 287–308.
- Williams, P. J., Sefton, M. A., and Francis, I. L. (1992). Glycosidic precursors of varietal grape and wine flavor. In Teranishi, R., Takeoka, G. R., and Güntert, M., editors, Flavor Precursors. Thermal and Enzymatic Conversions, chapter 7, pages 74–86. Acs sympos edition.
- Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., and Massy-Westropp, R. A. (1982). Studies on the hydrolysis of Vitis vinifera monoterpene precursor compounds and model monoterpene. beta.-D glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30(6):1219–1223.
- Winterhalter, P. and Skouroumounis, G. K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. In Biotechnology of Aroma Compounds, pages 73–105. Springer.
- Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K., and Totsuka, A. (1991). Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. American Journal of Enology and Viticulture, 4(4):358–363.
- Yanai, T. and Sato, M. (1999). Isolation and properties of β -glucosidase produced by Debaryomyces hansenii and its application in winemaking. American Journal of Enology and Viticulture, 50(3):231–235.
- Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., and Comi, G. (1993). Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of Hanseniaspora guilliermondii or Kloeckera apiculata and Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology Letters, 15(3):235–238.

- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, a., and Masneuf-Pomarede, I. (2010). Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. Food Microbiology, 27(5):559–67.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., and Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. International Journal of Food Microbiology, 125(2):197–203.
- Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., and Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-Saccharomyces microbial community: impact on volatile thiol release. International Journal of Food Microbiology, 151(2):210–5.

APÉNDICES

Apéndice 1

Artículos publicados en el marco de éste trabajo de Tesis

n



Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*

Jessica Lleixà¹, Valentina Martín², María del C. Portillo¹, Francisco Carrau², Gemma Beltran¹ and Albert Mas^{1*}

¹ Departament Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, ² Sección Enología, Food Science and Technology Department, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

OPEN ACCESS

Edited by:

Sandra Torriani,
Università degli Studi di Verona, Italy

Reviewed by:

Matthias Sipiczki,
University of Debrecen, Hungary
Patrizia Romano,
University of Basilicata, Italy

*Correspondence:

Albert Mas
albert.mas@urv.cat

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 02 January 2016

Accepted: 03 March 2016

Published: 16 March 2016

Citation:

Lleixà J, Martín V, Portillo MC, Carrau F, Beltran G and Mas A (2016) Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 7:338. doi: 10.3389/fmicb.2016.00338

Interest in the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking has been increasing due to their positive contributions to wine quality. The non-*Saccharomyces* yeast *Hanseniaspora vineae* is an apiculate yeast that has been associated with the production of wine with good aromatic properties. However, little is known about the fermentation dynamics of *H. vineae* in natural must and its interaction with autochthonous yeasts. In the present study, we performed semi industrial fermentations of Macabeo and Merlot musts inoculated with either *H. vineae* or *S. cerevisiae*. The yeast population dynamics were monitored by plate culturing, PCR-DGGE and massive sequencing techniques. The results obtained with these techniques show that *H. vineae* was able to dominate the autochthonous microbiota in Macabeo must but not in Merlot must, which exhibited a larger, more diverse yeast population. The presence of *H. vineae* throughout most of the Macabeo fermentation resulted in more fruity and flowery wine, as indicated by the chemical analysis of the final wines, which demonstrated a strong presence of phenyl ethyl acetate at concentrations higher than the threshold of perception and approximately 50 times more than that produced in wines fermented with *S. cerevisiae*. This compound is associated with fruity, floral and honey aromas.

Keywords: non-*Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, alcoholic fermentation, PCR-DGGE, massive sequencing

INTRODUCTION

Wine is the result of the alcoholic fermentation of grape must. Alcoholic fermentation is driven by yeasts, and it consists of the transformation of sugars present in the must, glucose and fructose, into ethanol and carbon dioxide. The yeast species *Saccharomyces cerevisiae* is considered to be primarily responsible for this process. *S. cerevisiae* is known for only metabolizing sugars via the fermentative pathway when the sugar concentration is high, even in the presence of oxygen. This phenomenon is known as the Cabtree effect (Cabtree, 1929).

Winemaking is currently changing because of an emerging interest in the use of non-*Saccharomyces* yeasts during alcoholic fermentation to increase wine complexity and differentiation. Non-*Saccharomyces* yeasts are commonly found on the grape surfaces, and these

yeasts have been associated with spontaneous and unpredictable fermentation, which can result in arrested or sluggish fermentation and wine spoilage. Nevertheless, several recent studies have shown that these yeasts positively affect wine fermentation and the final wine. The positive role of non-*Saccharomyces* ranges from a better fermentation performance to improve wine quality and complexity (Fleet, 2008; Jolly et al., 2014).

Non-*Saccharomyces* yeasts can contribute to the sensorial profile of wine as a result of the production of various metabolites and the activity of certain enzymes that interact with the precursors of aromatic compounds, such as β -glucosidases, which are present in many non-*Saccharomyces* yeast but not in *S. cerevisiae*. β -glucosidases hydrolyze aromatic glycosylated precursors into free volatile compounds to improve the final wine flavor (Swangkeaw et al., 2011; Jolly et al., 2014). Many other enzymes of technological relevance are also secreted by non-*Saccharomyces* yeasts, such as pectinases. Enzymes with proteolytic activity are of key interest in enological fields because they facilitate the clarification process in wine and improve protein stability (Strauss et al., 2001; Maturano et al., 2012).

These yeasts have garnered interest in winemaking due to their beneficial effects and because consumers are demanding new wine styles. Many commercial yeast companies have also begun to promote mixed and sequential wine fermentations in order to satisfy consumer and producer demands. Therefore, companies have begun to thoroughly study and commercialize non-*Saccharomyces* strains, like *Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* (Jolly et al., 2014). Moreover, some of the yeast species that are being evaluated belong to *Hanseniaspora* spp., the main non-*Saccharomyces* yeasts in grape must that are considered apiculate yeasts due their cell morphology. Specifically, the yeast *Hanseniaspora vineae* (anamorph *Kloeckera africana*) of this genus has been of great interest because it produces several key aromatic compounds (Viana et al., 2011; Medina et al., 2013).

The strain of *H. vineae* used in this study was isolated from Uruguayan vineyards and selected due to its positive effect on wine fermentation and good contribution to the aroma profile of the final wine. *H. vineae* has been demonstrated to increase fruity aromas and produce a high amount of acetate esters, such as 2-phenylethyl acetate and ethyl acetate, in wines elaborated by sequential fermentation with *S. cerevisiae* (Viana et al., 2011; Medina et al., 2013).

In summary, the use of non-*Saccharomyces* yeasts to produce new wine styles has been increasing due to the different aromatic profiles obtained. The aim of this work was to compare the fermentation dynamics of *H. vineae* and *S. cerevisiae* and the different obtained wines after the inoculation of these two species. To this end, we used natural must from two grape varieties, Macabeo and Merlot, inoculated either with *H. vineae* or *S. cerevisiae* fermented in semi-industrial conditions. The yeast population dynamics were monitored by plate culturing, PCR-DGGE and 18S rRNA gene massive sequencing techniques. To confirm the differences between the two species, the final wines underwent a sensory evaluation, and the aromatic profile was determined.

MATERIALS AND METHODS

Yeast Strains

The commercial wine yeast strain used in this study was *Saccharomyces cerevisiae* QA23 (Lallemand®). The apiculate yeast strain used in this work, *H. vineae* T02/5AF, was isolated from Uruguayan vineyards. Strain QA23 of *S. cerevisiae* was obtained in active dry yeast (ADY) form and rehydrated according to the manufacturer's instructions (Lallemand®). The *H. vineae* strain T02/5AF was obtained in fresh paste form and rehydrated in the same manner as QA23 using warm water. The inoculation was in both cases 2×10^6 cells/ml of must.

Fermentation Conditions

The Macabeo and Merlot grape varieties were fermented at the experimental cellar of the Faculty of Enology (Mas dels Frares, Tarragona Spain). The Macabeo musts were fermented in triplicate in 100 l tanks at 18°C, and 6 kg of Merlot grapes were fermented in 8 l submerged cap fermentation tanks at 26°C. The Macabeo must was submitted to a vacuum filtration process, whereas the Merlot grapes were selectively handpicked in the vineyard.

Fermentation activity was followed by daily density monitoring using a portable densimeter (Mettler Toledo). Samples were taken once a day from each fermenter and studied as described in the following sections.

Cell Growth Measurements

Samples were taken once a day, diluted in sterile MilliQ water (Millipore Q-POD™ Advantage A10), plated on YPD medium (Glucose 2%, Peptone 2%, Yeast Extract 1%, Agar 1.7%) and lysine agar medium (Oxoid, England) plates using an automated spiral platter WASP II (Don Whitley, Scientific Limited, England), and incubated at 28°C for 48 h. The YPD medium provided the total yeast counts, whereas the lysine agar medium only provided the non-*Saccharomyces* cell counts because *S. cerevisiae* cannot grow using lysine as a unique nitrogen source. Appropriate dilution plates were counted, and 20 colonies from the must before the inoculation and the beginning (density 1070 for Macabeo and 1090 for Merlot, both of them at day 1), middle (density between 1050 and 1040) and end (density below 1000, and residual sugars below 5 g/l) of the fermentation were randomly selected and purified on YPD plates for yeast identification.

Yeast Identification

The yeasts were identified based on the RFLPs of the PCR-amplified ITS-5,8S rDNA region from the isolated colonies as described by Esteve-Zarzoso et al. (1999). The RFLP patterns of the yeast isolates were compared with those of the www.yeast-id.org (<https://www.yeast-id.org/>) based on the method described by Esteve-Zarzoso et al. (1999) and grouped to a known yeast species. Yeast identification was confirmed by sequencing the amplified D1/D2 domain of the 26S rDNA of representative colonies of each identified group as described by Kurtzman and Robnett (1998) and comparing this sequence with those of the type strains included in GenBank®. Identification

was considered appropriate with similarities higher than 99%. The sequencing was performed by Macrogen.

Saccharomyces cerevisiae cells from the isolated colonies identified as *S. cerevisiae* were further characterized by Interdelta PCR analysis as described by Legras and Karst (2003).

Massive Sequencing Analysis

DNA (5–100 ng) was extracted from 1 ml samples taken at the beginning, middle and end of the fermentation using the recommended procedure for the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), including three bead-beating steps for 3 min in a FastPrep-24 bead beater (MP Bio, Solon, OH) to homogenize the samples. The extracted DNA was stored at -20°C until further processing. A 350 bp (on average) 18S rRNA gene fragment was amplified in triplicate from each DNA sample with the universal primers FR1 (5-ANCCATTCAATCGGTANT-3) and FF390 (5-CGATAACGAACGAGACCT-3) (Chemidlin Prévost-Bouré et al., 2011). All primers had an Ion Torrent tag, and the universal primer included a 10-bp barcode unique to each amplified sample. The PCR reactions contained 5–100 ng DNA template, $1\times$ GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 mM MgCl_2 , and 2 pmol of each primer. The reaction conditions consisted of 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C , 1 min at 52°C and 1 min at 72°C , and a final extension phase for 10 min at 72°C . The PCR products were pooled by sample and cleaned using a GeneRead Size Selection kit (Qiagen, Hilden, Germany). The cleaned PCR products were submitted to the Centre for Omic Sciences (Reus, Spain), where their quality was assessed with a Bionalyzer and their quantity was adjusted for sequencing. The raw sequences were demultiplexed and quality filtered using QIIME v1.8.0 (Caporaso et al., 2010a). Reads were discarded if the average quality score of the read was <25 , if the length of the read was <200 or >400 and they contained one or more ambiguous base calls. Operational taxonomic units (OTUs) were assigned using QIIME's uclust-based (Edgar, 2010) open-reference OTU-picking workflow with a threshold of 97% pairwise identity. The OTU sequences were aligned using PYNAST (Caporaso et al., 2010b) against the SILVA 119 reference database (Pruesse et al., 2007). Taxonomic assignments were made in QIIME against the SILVA 119 database using the naive Bayesian classifier rdp (Wang et al., 2007). The template alignment of the Greengenes core set filtered at 97% similarity. The OTU taxonomy was determined using the RDP classifier retrained toward the GreenGenes bacterial 16S rRNA database (13_8 release) (DeSantis et al., 2006) at 97% similarity. Chimeric sequences were identified and removed using ChimeraSlayer (Haas et al., 2011), and a phylogenetic tree was generated from the filtered alignment using FastTree (Price et al., 2009). A final OTU table was created that excluded unaligned sequences and singletons (sequences observed just once). To avoid biases generated by differences in sequencing depth, the OTU table was rarified to an even depth of 20,000 sequences per sample in comparisons of all sample types in this study.

PCR-DGGE

The U1GC/U2 primers were used to amplify the specific U1/U2 domain of the 28S ribosomal region of yeast (Meroth et al.,

2003). The PCR amplifications were performed on a Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) using EcoTaq DNA Polymerase (Ecogen, Spain). The Dcode universal mutation detection system (Bio-Rad, Hercules, Calif.) was used to run the DGGE analysis. The amplification of the fragments and denaturing electrophoresis were performed according to Meroth et al. (2003). The bands were excised from the gels, and the DNA was eluted overnight in $40\ \mu\text{l}$ of 10 mM Tris pH 8 and 1 mM EDTA (TE) at 4°C . The DNA was re-amplified with the same pair of primers without the GC-clamp and sequenced by Macrogen. The BLASTN algorithm was applied to the GenBank database to identify sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). We considered appropriate the identification of the sequences with the corresponding type strains sequences when the sequence identity was higher than 98%.

Analysis of Volatile Compounds

The aromatic compounds were extracted using adsorption and separate elution from an isolate ENV+ cartridge packed with 1 g of highly crosslinked styrene-divinyl benzene (SDVB) polymer (40–140 μm , cod. no. 915- 0100-C), as previously reported by Boido et al. (2003). The cartridges were sequentially equilibrated with methanol (15 mL) and distilled water (20 mL). A sample of 50 mL of wine diluted with 50 mL of distilled water and containing 0.1 mL of internal standard (1-heptanol at 230 mg/L in a 50% hydroalcoholic solution) was applied with an appropriate syringe (4–5 mL/min), and the residue was washed with 15 mL of distilled water. The aromatic compounds were eluted with 30 mL of dichloromethane. The solution was dried with Na_2SO_4 , concentrated to 1.5 mL on a Vigreux column, stored at 10°C , and, immediately prior to GC-MS analysis, further concentrated to 150 μL under a gentle nitrogen stream. The GC/MS analyses were conducted using a Shimadzu-QP 2010 ULTRA (Tokyo, Japan) mass spectrometer equipped with a Stabilwax (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) (Restek) capillary column. The components of the wine aromatic compounds were identified comparing their linear retention indices with those of pure standards. (Aldrich, Milwaukee, WI). The mass spectral fragmentation patterns were also compared with those stored in databases. GC-FID and GC-MS instrumental procedures using an internal standard (1-heptanol) were applied for quantitative purposes, as described previously by Boido et al. (2003). Ethanol and residual sugars were quantified using Winescan FT 120 (WineScan FT120 Type 77110, Foss Analytical, Denmark).

Sensory Analysis

A specialized panel (13 panelists) analyzed the sensorial attributes of Macabeo and Merlot wines fermented with *H. vineae* and *S. cerevisiae*. The wines were analyzed by means of a triangle test and descriptive analysis. The aim of the triangle test was to distinguish the wine fermented with *H. vineae* from the wine fermented with *S. cerevisiae*. The descriptive test emphasized the aroma and flavor attributes: Reduction, fresh fruit, candied fruit, flowery, aromatic plant, yeast, toasted (phenolic), herbaceous, aroma, sourness, structure, bitterness, volume and global impression.

Statistical Analysis

The variance of the aromatic compounds was analyzed using the Statistica 7.1 software (StatSoft, Tulsa, OK, 1984–2005). The sensory analysis results were submitted to Student's *t*-test. The results were considered significant when the associated *p*-value was below 0.05.

RESULTS

H. vineae and *S. cerevisiae* Fermentations

The changes in the density and yeast populations during the alcoholic fermentations of both Macabeo and Merlot grapes are presented in **Figure 1**. The Macabeo must (**Figure 1A**) inoculated with *H. vineae* required a longer fermentation process (19 days) than those inoculated with *S. cerevisiae* (14 days) due to slower fermentation kinetics and a longer latency phase. However, Merlot grapes (**Figure 1B**) inoculated with *H. vineae* and with *S. cerevisiae* showed a similar fermentative progress, completing the fermentation in 9 days. This fact could be explained by the early presence of non-inoculated *S. cerevisiae* in the first stages of the fermentation.

No significant differences were observed in the ethanol concentration obtained at the end of the fermentation of both varieties (10.75 ± 0.20 for Macabeo and 12.75 ± 0.10 for Merlot wines). Although all the wines were considered as “dry” (sugar concentration below 2 g residual sugars /L), a small difference was observed in the residual sugars in the Macabeo fermentation because the musts fermented with *H. vineae* left 1.7 ± 0.3 g fructose/L, while all the other wines each of the residual sugars (glucose or fructose) were below 1 g/L.

The yeast population was quantified based on the colony growth on YPD and lysine agar medium. The total yeast population (YPD) was similar for the Macabeo and Merlot fermentations. The non-*Saccharomyces* yeasts counts (lysine agar) were slightly lower than the total yeast population counts in tanks inoculated with *H. vineae* for both grape musts. The Macabeo must was submitted to a vacuum filtration, which reduced the initial yeast population and resulted in yeast counts of 8.8×10^4 cfu/ml on YPD and 5.8×10^4 on lysine agar in must before inoculation.

Yeast Biodiversity in Merlot and Macabeo Musts

We identified only three yeast species in Macabeo must (**Figures 2A,B**), with *Candida zemplinina* being the main yeast species representing more than 80% of the yeast population. The other two yeast species identified were *Hanseniaspora uvarum* and *Torulaspora delbrueckii*. Of these, *H. uvarum* represented 12.50% of the total yeast population, whereas *T. delbrueckii* represented only 3.13% of the population. This distribution significantly differed in the yeast population recovered from Merlot must (**Figures 2C,D**). We identified up to eleven yeast species, with *C. zemplinina* and *H. uvarum* being the main species representing a percentage of 41 and 39% of the total yeast population, respectively. The low yeast diversity in Macabeo must may be due to the prefermentative filtration protocol, which reduces the yeast population. Moreover, during Merlot

fermentation the must maintains contact with grape skins, which releases yeasts during the whole process. In both musts, only non-*Saccharomyces* yeasts were detected.

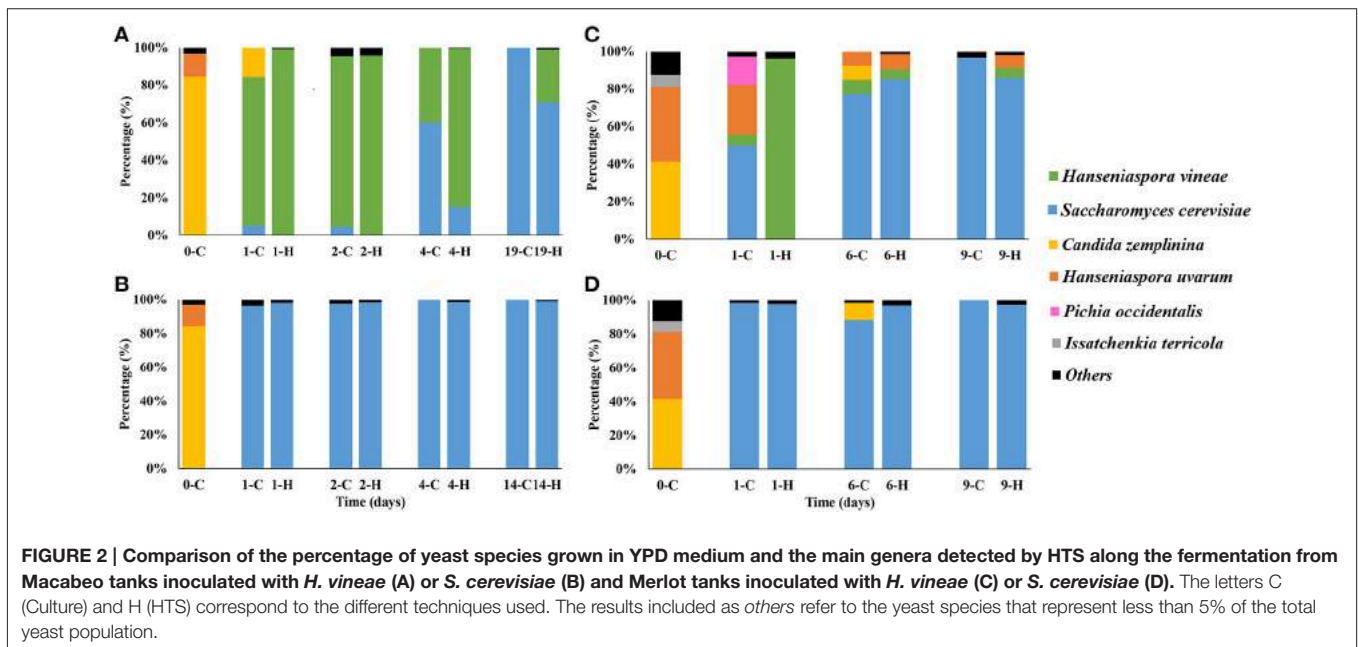
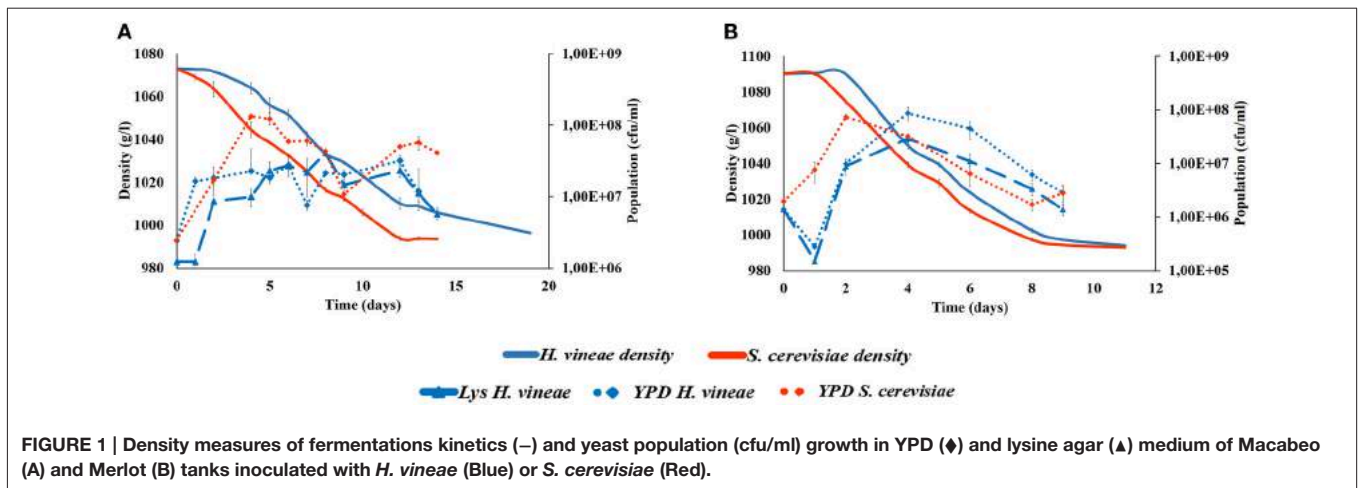
Yeast Population Dynamics during Fermentation

The yeast population dynamics during fermentation after the inoculation of *S. cerevisiae* or *H. vineae* was followed in yeast colonies grown on YPD plates based on PCR-DGGE, and the massive sequencing of the 18S rRNA gene at the beginning, middle and end of the fermentation.

For the Macabeo fermentation, the inoculated strain accounted for 80–90% of the yeast population recovered from the plates 1 and 2 days after inoculation with *H. vineae*, whereas *C. zemplinina* had completely disappeared by the second day. *S. cerevisiae* was present at the beginning of fermentation, but at a very low proportion (**Figure 2A**). Nevertheless, the *S. cerevisiae* population began to increase from the middle to the end of the fermentation, accounting for 60% of the population at the middle of the fermentation and 100% at the end of the fermentation. From this population, up to three different *S. cerevisiae* strains could be identified by interdelta analysis, although QA23 was the most abundant at the end of the fermentation (more than 90%, results not shown). Cross contamination between cellar vats is common in commercial cellars during vintage. Nevertheless, *H. vineae* represented 40% of the yeast population at the middle of the fermentation, which demonstrated the capacity of this yeast to dominate the native microbiota, and a high proportion of its population remained active after the middle of the fermentation. However, this yeast was not able to overcome the initial microbiota in Merlot fermentations inoculated with *H. vineae* (**Figure 2C**) and exhibited very low recovery on plates at the beginning and middle of the fermentation (≈ 5 –7%). Other non-*Saccharomyces* yeasts (*H. uvarum*, *C. zemplinina*, and *Pichia occidentalis*) outgrew *H. vineae* at these stages. The predominant yeast throughout the fermentation was a non-inoculated *S. cerevisiae*, which was recovered from plates and represented 50% of the total population at the beginning of the fermentation.

Macabeo and Merlot fermentations inoculated with *S. cerevisiae* showed similar yeast population patterns (**Figures 2B,D**). In both cases, the inoculated *S. cerevisiae* was able to rapidly dominate the fermentation because it was the only cultivable yeast recovered throughout the fermentation.

The PCR-DGGE profiles obtained for the DNA extracted directly from the wine during alcoholic fermentation identified the detected yeasts as *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *H. vineae*, and *C. zemplinina* (**Table 1**). *S. cerevisiae* was detected in all fermentations after the first day of inoculation, including in fermentations not inoculated with the commercial *S. cerevisiae*. Nevertheless, the *S. cerevisiae* in these latter fermentations appeared to be a different strain, as evidenced different migration patterns on DGGE gels. *S. cerevisiae* QA23 shows a particularity in PCR-DGGE because it produces a double band, which is not observed in other *S. cerevisiae* strains. All the bands excised from the gel migrating to the same height resulted in at least 99.9% sequence similarity to *S. cerevisiae* type strain. Merlot



and Macabeo musts inoculated with *H. vineae* exhibited more yeast diversity at the beginning of the fermentations than musts inoculated with *S. cerevisiae*, and *H. vineae* was detected until the end of these fermentations.

A high-throughput sequencing (HTS) approach was also used to assess the fermented wine yeast biodiversity. After the removal of low quality sequences and those failing alignment, 642,105 18S rRNA amplicon sequences were generated from 9 Macabeo and 6 Merlot wine samples. The average number of sequences per sample was 42,807, with an average length of 299 bp, and these sequences clustered into 16,302 operational taxonomic units (OTUs; 97% nucleotide identity). To avoid diversity overestimation, singletons (sequences observed only once) were eliminated, and each sample was rarified to an even depth of 20,000 sequences to avoid biases generated by differences in sequencing depth. The number of different

OTUs was then reduced to 634, and 34 genera were identified. Good's coverage index was 99.7% on average, indicating that the global yeast diversity was mostly covered. The numbers of observed OTUs did not differ between Macabeo or Merlot wine samples inoculated with *S. cerevisiae* or *H. vineae* (Figure 3A). However, the number of genera was significantly higher at the beginning of the Merlot fermentation and tended to decrease toward the end of the fermentation, whereas the number of genera in Macabeo fermentation samples was lower than that in Merlot fermentations and relatively constant throughout the fermentation (Figure 3B). Most of the yeast population in all fermentations (97.7% on average) was represented by the inoculated *S. cerevisiae* and *H. vineae* strains (Tables 1, 2), whereas other non-*Saccharomyces*, such as *H. uvarum* and *Zygosaccharomyces*, accounted for only 1.9% of the sequences, and the remaining genera represented less than 0.5% of the

TABLE 1 | The most abundant yeast genera detected by each technique in the different fermentations.

Yeast species	Macabeo with <i>H. vineae</i>				Macabeo with <i>S. cerevisiae</i>				Merlot with <i>H. vineae</i>				Merlot with <i>S. cerevisiae</i>				
	Day 1	Day 2	Day 4	Day 19	Day 1	Day 2	Day 4	Day 14	Day 1	Day 6	Day 9	Day 1	Day 6	Day 9	Day 1	Day 6	Day 9
YPD Culture (%)																	
<i>S. cerevisiae</i>	5,26	<	60,00	100,00	96,30	97,50	100,00	100,00	50,00	77,36	96,61	98,33	88,14	100,00			
<i>H. vineae</i>	78,95	90,70	40,00	-	-	-	-	-	5,88	7,55	<	-	<	-			
<i>H. uvarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	26,47	7,55	-	-	-	-			
<i>C. zemplinina</i>	15,79	-	-	-	<	<	-	-	14,71	7,55	<	-	10,17	-			
<i>P. occidentalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
HTS (%)																	
<i>S. cerevisiae</i>	<	<	15,20	70,91	97,97	98,23	98,40	98,87	<	85,25	85,93	97,67	96,78	97,20			
<i>H. vineae</i>	99,28	95,81	84,39	28,00	<	<	<	<	96,09	5,51	5,53	<	<	<			
<i>H. uvarum</i>	<	<	<	<	<	<	<	<	<	7,94	6,77	<	<	<			
<i>Candida</i>	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<			
DGGE-PCR																	
<i>S. cerevisiae</i>	-	+	++	++	+	++	++	++	+	+	++	++	++	++			
<i>H. vineae</i>	++	++	+	+	-	-	-	-	++	+	+	-	-	-			
<i>H. uvarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-			
<i>C. zemplinina</i>	+	+	+	+	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-			

The YPD-Culture and HTS results are expressed as percentages of the selected yeast specie from the total yeast population. The symbol "<" indicates that the correspondent yeast specie is present but represents less than 5% of the total yeast population. The symbol "-" indicates that the correspondent yeast specie was not detected with this technique. In case of DGGE-PCR, "++" indicates that the band is very strong, "+" indicates that the band is weak and "-" indicates that the band is non-existent.

sequences (Table 2). Some of the detected fungi were not related to alcoholic fermentation (p.e. *Aerobasidium*, *Aspergillus*, *Sporobolomyces*); however, they were mainly detected at the beginning of the fermentation, and their populations quickly decreased or disappeared (Table 2). Interestingly, *Dekkera* was only detected in Merlot samples, and we were able to observe a small but distinct increase during the fermentations with both inocula.

Volatile Compound Composition

Fifty volatile compounds produced during alcoholic fermentations of natural Macabeo musts inoculated with *H. vineae* and *S. cerevisiae* were identified and quantified in the Macabeo wines. These compounds were classified into 10 groups, (acetates, acids, alcohols, C6 compounds, carbonyl compounds, esters, phenols, lactones, unusual compounds (named here as "rares") and terpenes). Table 3 shows the mean concentration of the identified volatile compounds. To assess the possible contribution of the different components to the wine aroma, the detection threshold and aroma descriptor reported in the literature are included for each compound.

Significant differences between yeasts were only observed in three of the 10 groups of compounds (Acetates and rares in Figure 4A and alcohols in Figure 4B).

Both yeasts primarily produced alcohols and esters, and three (isobutanol, isoamyl alcohol, and phenyl ethanol) of the eleven identified alcohols reached the threshold of perception reported in the literature. Of these three alcohols, phenyl ethanol provides good aromas that are described as rose and honey-like. Among the identified esters, ethyl hexanoate reached the threshold of perception and contributes a green apple aroma. The compounds constituting the next most abundant group produced by *H. vineae* are classified as rare and included N-acetyl tyramine and 1H-indole-3-ethanol acetate ester. These compounds were not found in the wine fermented with *S. cerevisiae*.

As shown in Table 3, a total of 7 acids were identified; hexanoic, decanoic and octanoic acid showed the highest concentration, and octanoic acid exceed the odor threshold reported in the literature.

Four acetates were identified, and phenethyl acetate was the most interesting. Specifically, this compound was 50 times more abundant in wines fermented with *H. vineae* than in those fermented by *S. cerevisiae*. This compound endows wine with floral, fruity and honey-like aromas.

Six phenolic compounds were identified, as shown in Table 3. These compounds did not reach the threshold of detection, and their contribution to wine aroma is consequently expected to be insignificant. One of these compounds, 4-ethylguaiaicol, is generally attributed to the presence of *Brettanomyces*, although it was identified in wines fermented with *H. vineae*.

Six terpenes were identified, as shown in Table 3. The concentrations of these compounds were lower than the threshold, and they are consequently not expected to contribute to the wine flavor profiles.

Sensory Analysis

To evaluate the ability of *H. vineae* to produce a wine with attributes that differ from those of a wine fermented with *S.*

TABLE 2 | Percentage of main genera and species detected by HTS after the inoculation of *H. vineae* or *S. cerevisiae* on Merlot and Macabeo wines.

Days from inoculation	Macabeo <i>H. vineae</i>					Macabeo <i>S. cerevisiae</i>				Merlot <i>H. vineae</i>			Merlot <i>S. cerevisiae</i>		
	1	2	4	14	19	1	2	4	14	1	6	8	1	6	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.47	3.68	15.20	60.32	70.91	97.97	98.23	98.40	98.87	0.44	85.25	85.93	97.67	96.78	97.20
<i>Hanseniaspora vineae</i>	99.28	95.81	84.39	38.75	28.00	0.64	0.48	0.57	0.24	96.09	5.51	5.53	0.53	1.69	1.60
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0.07	0.07	0.01	<	0.01	0.05	0.02	0.01	<	0.33	7.94	6.77	0.24	0.40	0.15
<i>Zygosaccharomyces</i>	0.01	0.05	0.23	0.47	0.60	0.67	0.66	0.52	0.39	0.41	0.49	0.49	0.53	0.51	0.47
<i>Saccharomyces (others)</i>	0.01	0.03	0.08	0.31	0.39	0.55	0.54	0.43	0.44	<	0.33	0.36	0.36	0.37	0.36
<i>Aureobasidium</i>	<	<	–	0.01	–	–	–	–	–	1.83	0.03	0.02	0.33	0.05	0.05
<i>Candida</i>	0.09	0.14	0.03	0.06	0.07	0.11	0.07	0.06	0.05	0.31	0.18	0.46	0.19	0.18	0.12
<i>Pichia</i>	0.05	0.17	0.05	<	0.01	–	–	<	–	0.03	0.26	0.26	0.01	0.01	–
<i>Dekkera</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<	0.17	–	–	0.03
<i>Aspergillus</i>	–	0.01	–	–	–	–	–	–	–	0.11	<	0.01	0.03	<	–
<i>Sporobolomyces</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.08	<	–	0.02	–	–
<i>Issatchenkia</i>	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	–	<	–	0.02	0.01	–	0.01	–	–
<i>Cryptococcus</i>	–	<	–	<	–	–	–	–	–	0.07	–	–	0.01	–	–
<i>Diplodia</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.07	–	–	<	–	–
<i>Zygoascus</i>	–	–	–	–	–	<	–	–	–	0.03	–	–	0.02	0.01	0.01
<i>Rhizina</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.04	–	–	0.01	–	–
<i>Catenulostroma</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.05	–	–	–	–	–
<i>Bensingtonia</i>	–	–	–	0.04	–	–	–	–	–	<	–	–	–	–	–
<i>Saccharomycodes</i>	–	–	<	0.02	0.01	–	–	–	<	–	–	–	–	–	0.01
<i>Scheffersomyces</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.02	<	<	0.01	–	–
<i>Wickerhamomyces</i>	0.01	0.01	<	–	–	–	–	–	–	0.01	–	–	–	–	–
<i>Cladosporium</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.01	–	–	0.01	–	–
<i>Sugiyamaella</i>	0.01	0.01	<	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Trigonopsis</i>	0.01	0.01	–	–	<	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Lipomyces</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.01	0.01	–	–	–
<i>Phillipsia</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.01	–	–	–	–	–
<i>Wallemia</i>	0.01	–	–	–	–	<	–	–	–	<	–	–	–	–	–
<i>Vanderwaltozyma</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	<	–	<	–	–	–	<
<i>Cochliobolus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.01	–	–	–	–	–
<i>Malassezia</i>	–	–	–	–	–	<	–	–	–	<	–	<	–	–	–
<i>Bispora</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<	–	–	<	–	–
<i>Rhodotorula</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<	–	–	<	–	–
<i>Metschnikowia</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<	<	–	–	–	–
<i>Phoma</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<	–	<	–	–	–
<i>Agaricostilbum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<	–	<	–	–	–
<i>Baudoinia</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<	–	–	–	–	–

The symbol "<" indicates percentages values lower than 0.01 and bigger than 0. The symbol "–" indicates not detected by HTS.

cerevisiae, the produced wines were analyzed with triangle and descriptive tests.

In the triangle test of Macabeo wine (Figure 5), wine-tasters easily distinguished the wine fermented with *H. vineae* from that fermented with *S. cerevisiae*, and the majority selected the wine fermented with *H. vineae* as their preference. In the descriptive test, the wine fermented with *H. vineae* received the best rating. Notably, wine fermented by *H. vineae* showed a significantly stronger flowery aroma profile ($p = 0.037$) than wine produced with *S. cerevisiae*.

The Merlot must could not be evaluated as a consequence of a powerful reduction note that could not be corrected for the tasting.

DISCUSSION

In this work, we performed semi-industrial fermentations with *H. vineae* and *S. cerevisiae* using Macabeo and Merlot musts in order to evaluate the differences in yeast populations during fermentation and the wines produced. We followed the yeast population dynamics in both grape musts inoculated with *H. vineae* and *S. cerevisiae* by plate culturing on YPD medium, PCR-DGGE with yeast general primers, as well as yeast general primers and the HTS of 18S rRNA gene.

As expected, the fermentation of musts inoculated with *H. vineae* required more time than fermentations inoculated with *S. cerevisiae*, demonstrating the high fermentative ability of this

TABLE 3 | Average concentrations of the two fermentations (\pm Standard Deviation) in $\mu\text{g/l}$.

	<i>H. vineae</i> Average SD	<i>S. cerevisiae</i> Average SD	Odor descriptor	Odor threshold ($\mu\text{g/l}$)
ACETATES				
Isobutyl acetate	11 \pm 1	0 \pm 0*	N/A	N/A
Isoamyl acetate	222 \pm 20	218 \pm 93	Banana ^a	30
1,3-Propanediol, diacetate	99 \pm 18	160 \pm 7	N/A	N/A
Phenethyl acetate	2322 \pm 50	47 \pm 13**	Fruity, honeyed, floral ^a	250
Acetate sum	2653 \pm 89	425 \pm 100**		
ACIDS				
Isobutyric acid	74 \pm 40	0 \pm 0	Acid, fatty ^b	230
Heptanoic acid	231 \pm 28	304 \pm 35*	N/A	N/A
Hexanoic acid	330 \pm 35	777 \pm 70*	Fatty, cheese ^a	420
Octanoic acid	734 \pm 12	1757 \pm 335	Fatty ^a	500
Decanoic acid	979 \pm 31	389 \pm 212	Rancid, fat ^a	1000
9-Hexadecenoic acid	479 \pm 11	72 \pm 57	N/A	N/A
Acids sum	2825 \pm 48	3299 \pm 708		
ALCOHOLS				
Isobutyl alcohol	2388 \pm 277	1895 \pm 165	Fusel oil, chemical ^b	0,5
1-Butanol	58 \pm 9	84 \pm 38	Like wine, medicine ^a	150.000
Isoamyl alcohol	36361 \pm 4127	61355 \pm 5063*	Alcoholic, fruity at low concentration ^b	0,3
3-Methyl-1-pentanol	36 \pm 1	69 \pm 7	Like wine, nail polish ^a	40.000
3-Ethoxy-1-propanol	28 \pm 0	108 \pm 12	Fruity ^b	
Furfuryl alcohol	12 \pm 2	0 \pm 0	N/A	N/A
3-(Methylthio), 1-Propanol	321 \pm 35	599 \pm 281	Sweet, potato ^a	1000
Benzyl alcohol	37 \pm 7	0 \pm 0	Floral, rose, phenolic, balsamic ^a	200.000
Phenyl ethanol	8099 \pm 158	16830 \pm 957	Rose, honey ^a	10000
Tyrosol	1855 \pm 156	5274 \pm 3149	N/A	N/A
Tryptophol	1365 \pm 95	0 \pm 0**	N/A	N/A
Alcohols sum	50557 \pm 4276	86214 \pm 897*		
C6 COMPOUNDS				
1-Hexanol	386 \pm 7	328 \pm 50	Grass just cut ^a	2500
Trans 3-Hexen-1-ol	7 \pm 1	129 \pm 19	Green ^a	1000
Cis 3-Hexen-1-ol	120 \pm 1	0 \pm 0**	Green, kiwi ^a	400
C6 compounds sum	513 \pm 9	457 \pm 31		
CARBONYL COMPOUNDS				
Acetoin	15 \pm 13	56 \pm 59	Creamy, butter, fat ^b	0,15
Furfural	9 \pm 2	0 \pm 0	Fusel alcohol, toasted bread ^a	770
Carbonyl compounds sum	23 \pm 16	56 \pm 59		
ESTERS				
Methyl butyrate	9 \pm 4	14 \pm 7	N/A	N/A
Ethyl butyrate	62 \pm 15	158 \pm 38	N/A	N/A
Ethyl hexanoate	81 \pm 4	241 \pm 24	Green apple ^a	14
Ethyl lactate	8285 \pm 378	3071 \pm 1915	Strawberry, raspberry ^a	60.000
Ethyl octanoate	79 \pm 33	225 \pm 9	Sweet, banana, pineapple ^a	500
Ethyl 3-hydroxybutyrate	119 \pm 8	52 \pm 16	N/A	N/A
Ethyl decanoate	143 \pm 46	76 \pm 6	Sweet, hazelnut oil ^a	200
Ethyl succinate	1240 \pm 47	1775 \pm 836	Toffee, coffee ^a	1.000.000
Diethyl malate	88 \pm 6	428 \pm 165	Green ^a	760.000
Diethyl 2 hydroxy glutarate	233 \pm 6	268 \pm 67	Grape, green apple, marshmallow ^a	20.000
Diethyl succinate	4012 \pm 255	15671 \pm 6792	Overripe melon, lavender ^a	100000
Ester sum	14348 \pm 509	21979 \pm 9334		

(Continued)

TABLE 3 | Continued

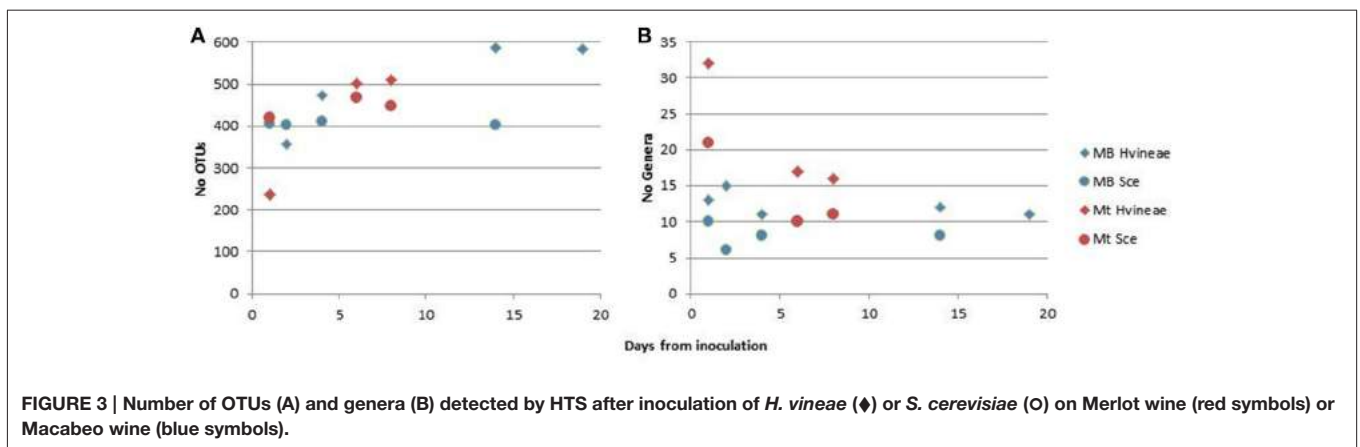
	<i>H. vineae</i> Average SD	<i>S. cerevisiae</i> Average SD	Odor descriptor	Odor threshold ($\mu\text{g/l}$)
PHENOLS				
Guaiacol	6 \pm 1	0 \pm 0	Smoky, hospital ^a	9,5
4-ethylguaiacol	73 \pm 66	0 \pm 0	Bretty flavors ^a	110
4-vinylguaiacol	33 \pm 21	28 \pm 14	Clove, curry ^a	40
Phenyl lactate	53 \pm 10	128 \pm 32	N/A	N/A
Ethyl vanillate	5 \pm 0	17 \pm 20	N/A	N/A
Acetovainillone	14 \pm 5	15 \pm 13	N/A	N/A
Phenol sum	183 \pm 41	188 \pm 11		
LACTONES				
Butyrolactone	223 \pm 1	251 \pm 6	Toasted burned ^a	1000
5-carboethoxy-gamma-butyrolactone	127 \pm 7	76 \pm 11	N/A	N/A
Lactone sum	350 \pm 8	327 \pm 17		
RARES				
N-acetyl tyramine	2040 \pm 11	0 \pm 0 ^{**}	N/A	N/A
1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester)	1377 \pm 8	0 \pm 0 ^{**}	N/A	N/A
Rare sum	3417 \pm 4	0 \pm 0 ^{***}		
TERPENES				
Linalool	12 \pm 2	28 \pm 13	Rose ^a	50
Alpha-terpineol	112 \pm 31	0 \pm 0	Floral, pine ^a	400
Citronellol	27 \pm 6	39 \pm 5	Sweet, floral ^b	18
Terpene sum	150 \pm 23	67 \pm 18		

Odor descriptor and odor thresholds reported in the literature are included.

*, **, *** indicate significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively.

^aFariña et al. (2015).

^bBoido (2002).

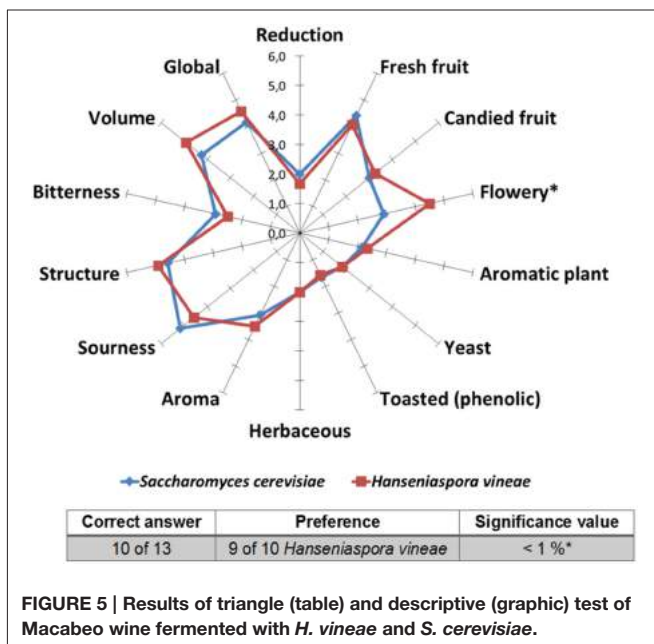
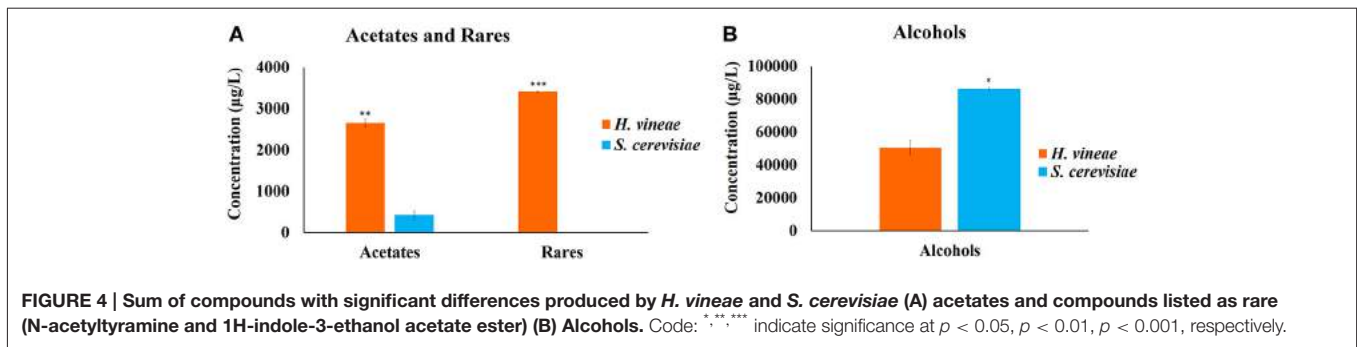


wine yeast with respect to *H. vineae*. However, rapid fermentation might not be a desired characteristic in the production of quality wines, due to flavor lost or high energetic demand for refrigeration (Medina et al., 2013).

The initial yeast diversity of the must was only analyzed after plate culturing. Before the inoculation, Merlot must presented a higher yeast diversity than Macabeo must, as evidenced by up to eleven different yeast species that were identified in the red variety, whereas the Macabeo contained only three species (*C.*

zemplanina, *H. uvarum*, and *T. delbrueckii*). As expected, only non-*Saccharomyces* yeasts were recovered by cultivation from both musts before the inoculation because *S. cerevisiae* is not present in relevant amounts in grapes and is mostly associated with cellar equipment (Pretorius, 2000; Torija et al., 2001; Beltran et al., 2002).

The PCR-DGGE analysis identified *S. cerevisiae* and *H. vineae* as the main yeasts in both the Macabeo and Merlot fermentations. *C. zemplanina* was found only in Merlot, and these



results corroborated those observed after the plate culture. Other minor yeast species were not detected by PCR-DGGE, especially if their population densities were below 10^3 – 10^4 CFU/ml or if their abundance was two orders of magnitude lower than that of the main species, as reported in previous studies (Mills et al., 2002; Prakitchaiwattana et al., 2004; Andorrà et al., 2008).

Even if must samples were not included in the HTS approach, this technique clearly detected higher levels of fungal diversity than the other techniques. Specifically, a total of 32 genera with a great diversity of OTUs were identified within each genus. The HTS technique was also able to detect yeast genera not related with fermentation, and some of these yeasts are associated with spoilage (like *Dekkera/Brettanomyces*). Although the proportion of these yeasts was very low, the changes in their proportion throughout the fermentation suggested that they were active and represented a potential risk for the spoilage of the final wine. Thus, the HTS technique confirmed the general trend obtained for the most abundant yeast populations by plate culturing and PCR-DGGE, but it also facilitated the detection and tracking of some minor yeast genera that may significantly impact the quality of the wine.

The culturing, PCR-DGGE and HTS analysis confirmed a decrease in the yeast genera diversity from the beginning to the end of fermentations, and these techniques also consistently indicated that the yeast diversity was higher in Merlot fermentations than in Macabeo fermentations. The low diversity exhibited by Macabeo must before inoculation may be a consequence of its treatment with a vacuum filter. The objective of this treatment was to clean the must and remove solid and colloidal particles, but it also reduced autochthonous yeasts and nutrients in the must. We used this protocol for two reasons: to clean the Macabeo must and to remove colloidal and solid particles and also it was affected by rain and exhibited some spoilage. Thus, we wanted to reduce the autochthonous yeast population because we planned to inoculate the must with *H. vineae*. We achieved these objectives. Furthermore, the Merlot was selectively handpicked in order to obtain the healthiest bunches of grapes. The results from plate culturing, PCR-DGGE and HTS indicate that *H. vineae* was able to overcome the autochthonous microbiota in the Macabeo must, constituting a high proportion of the yeast population until the middle of the fermentation and showing good fermentative capacity. However, *H. vineae* represented a very low proportion of the yeast population in Merlot must after the inoculation. However, after the inoculation (day 1), the percentages of the identified yeasts were different based on the method of estimation, being the population of *H. vineae* hardly recovered on plates. *S. cerevisiae* was the most abundant yeast recovered from plates, whereas it was present at much lower levels in all culture-independent methods (HTS and DGGE). This observation could be related to the well-reported interaction between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation: non-*Saccharomyces* yeasts are quickly displaced by *S. cerevisiae*, which might kill or at least result in viable but not cultivable (VBNC) statuses, as indicated in several recent reports (Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Pérez-Nevado et al., 2006; Andorrà et al., 2010, 2011; Wang et al., 2015). However, we should emphasize that these culture-independent techniques also detect DNA from dead cells, which could also be the case. At later fermentation time points, all methods again produced coincident results and identified *S. cerevisiae* as the main population. Interestingly, the dominant *S. cerevisiae* was not the inoculated strain, suggesting that a cellar-resident strain took over. Furthermore, Merlot grapes are among the latest in the harvest in this cellar, and, thus, the environmental contamination of the cellar is already

high. The *S. cerevisiae* population began to increase and became the dominant species according to HTS and produced the most intense band profile of DGGE, and this unique yeast was recovered at the end of the fermentation.

The final wine obtained by fermenting Macabeo must with *H. vineae* was preferred over the wine fermented with *S. cerevisiae* for its notable fruity and flowery aroma. This result corroborates those of studies that performed mixed fermentations with *H. vineae* and obtained high amounts of an acetate ester, phenethyl acetate, which is responsible of the fruity and flowery aroma of wine (Viana et al., 2009, 2011). The chemical analysis revealed that wines inoculated with *H. vineae* contained 50 times more phenethyl acetate than wines inoculated with *S. cerevisiae*, which explains the results of our sensory analysis and agrees with previous observations (Medina et al., 2013).

The production of N-acetyltyramine and 1H-indole-3ethanol acetate ester also differed. These compounds were abundant in wines inoculated with *H. vineae* and could not be detected in wines fermented with *S. cerevisiae*. These compounds could be derived from tyrosol, and this hypothesis is supported by the high concentrations of tyrosol in wines inoculated with *S. cerevisiae*. This difference could be explained by the production of unusual compounds from tyrosol in wines inoculated with *H. vineae*. However, aromatic descriptors associated with these compounds have not yet been reported.

CONCLUSION

Interest in the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking has been increasing. *H. vineae* is an apiculate non-*Saccharomyces* yeast that has demonstrated a good fermentative rate in Macabeo must and resulted in more flowery wines, which is likely related to the higher production of phenylethyl acetate. However, the need for inoculation with *S. cerevisiae* must be emphasized because

H. vineae is unable to finish the alcoholic fermentation. We did not use a *S. cerevisiae* strain in the inoculations with *H. vineae*, and the end of fermentation was consequently improperly controlled. Furthermore, the use of this yeast requires very healthy grape musts and is not recommended to use with grapes with a high and diverse yeast population or red musts, in which maceration with skins may be a significant source of yeast. In addition, the present study shows that the HTS technique detected not only the most abundant yeast populations obtained by plate culturing and PCR-DGGE but also some minor yeast genera that may significantly affect the quality of the wine.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JL: Performing the experiments, Design of experiments, Writing of the manuscript, Discussion of results, Performing Next Generation Sequencing, Analysis of results. VM: Performing the experiments, Design of experiments, Analysis of results, Discussion of results, Writing of the manuscript. MP: Performing Next Generation Sequencing, Analysis of results, Writing of the manuscript. FC: Design of experiments, Analysis of results, Discussion of results. GB: Design of experiments, Analysis of results, Discussion of results. AM: Design of experiments, Discussion of results, Analysis of results, Writing of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

MP is the recipient of a Beatriu de Pinòs Postdoctoral Fellowship with the support of the Ministry of Universities and Research of the Department of Economy and Knowledge of the Generalitat of Catalonia and the program COFUND Marie Curie Actions of the 7th Framework Program for R+D of EU.

REFERENCES

- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M., and Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 215–224. doi: 10.1007/s00217-010-1272-0
- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J. M., and Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of enological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiol.* 25, 849–856. doi: 10.1016/j.fm.2008.05.005
- Andorrà, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., and Mas, A. (2011). Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence *in situ* hybridisation, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiol.* 28, 1483–1491. doi: 10.1016/j.fm.2011.08.009
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., et al. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287–293. doi: 10.1078/0723-2020-00097
- Boido, E. (2002). *Modificaciones Producidas por la Fermentación Maloláctica en la Fracción Aromática de los Vinos Tannat*. Ph.D., thesis. Universidad de la República, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., et al. (2003). Aroma composition of *Vitis vinifera* cv. Tannat: the typical red wine from Uruguay. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5408–5413. doi: 10.1021/jf030087i
- Cabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* 23, 536–545. doi: 10.1042/bj0230536
- Caporaso, J. G., Bittinger, K., Bushman, F. D., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., and Knight, R. (2010b). PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267. doi: 10.1093/bioinformatics/btp636
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010a). QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
- Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., et al. (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real time quantitative PCR. *PLoS ONE* 6:e24166. doi: 10.1371/journal.pone.0024166
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microb.* 72, 5069–5072. doi: 10.1128/AEM.03006-05
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal

- transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329–337. doi: 10.1099/00207713-49-1-329
- Fariña, L., Villar, V., Ares, G., Carrau, F., Dellacassa, E., and Boido, E. (2015). Volatile composition and aroma profile of Uruguayan Tannat wines. *Food Res. Int.* 69, 244–255. doi: 10.1016/j.foodres.2014.12.029
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., et al. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 21, 494–504. doi: 10.1101/gr.112730.110
- Jolly, N. P., Varela, C., and Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–237. doi: 10.1111/1567-1364.12111
- Kurtzman, C. P., and Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331–371. doi: 10.1023/A:1001761008817
- Legras, J. L., and Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 249–255. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00205-2
- Maturano, P. Y., Rodríguez Assaf, L. A., Toro, E. M., Nally, C. M., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L. I., et al. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 43–50. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., et al. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.* 141, 2513–2521. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.056
- Meroth, C. B., Hammes, W. P., and Hertel, C. (2003). Identification and population dynamics of yeasts in Sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7453–7461. doi: 10.1128/AEM.69.12.7453-7461.2003
- Millet, V., and Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable of wine micro-organisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136–141. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x
- Mills, D. A., Johannsen, E. A., and Cocolin, L. (2002). Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4884–4893. doi: 10.1128/AEM.68.10.4884-4893.2002
- Pérez-Nevaldo, F., Albergaria, H., Hogg, T., and Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine related yeasts during mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 336–345. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012
- Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., and Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.* 4, 865–877. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.05.004
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729. doi: 10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2009). FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1641–1650. doi: 10.1093/molbev/msp077
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., et al. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188–7196. doi: 10.1093/nar/gkm864
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., and van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182–190. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C. E., and Vichitphan, K. (2011). Characterization of β -glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 423–430. doi: 10.1007/s11274-010-0474-8
- Toriya, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillaumon, J. M., and Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 345–352. doi: 10.1023/A:1012027718701
- Viana, F., Belloch, C., Vallés, S., and Manzanares, P. (2011). Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 235–240. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.005
- Viana, F., Gil, J. V., Vallés, S., and Manzanares, P. (2009). Increasing the levels of 2-phenethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 68–74. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.025
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B., Cocolin, L., Mas, A., and Rantsiou, K. (2015). Viable and culturable populations of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) during Barbera must fermentation. *Food Res Int.* 78, 195–200. doi: 10.1016/j.foodres.2015.10.014
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microb.* 73, 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.0062-07

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Lleixà, Martín, Portillo, Carrau, Beltran and Mas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Yeast

Yeast 2016; 33: 323–328

Published online 3 May 2016 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/yea.3159

ISSY32 Special Issue

Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains

Valentina Martín¹, Eduardo Boido¹, Facundo Giorello¹, Albert Mas², Eduardo Dellacassa^{3*} and Francisco Carrau¹

¹Sección Enología, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Spain

³Laboratorio de Biotecnología de Aromas, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

*Correspondence to:

E. Dellacassa, Laboratorio de Biotecnología de Aromas, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay.
E-mail: edellac@fq.edu.uy

Abstract

In several grape varieties, the dominating aryl alkyl alcohols found are the volatile group of phenylpropanoid-related compounds, such as glycosylated benzyl and 2-phenylethyl alcohol, which contribute to wine with floral and fruity aromas after being hydrolysed during fermentation. *Saccharomyces cerevisiae* is largely recognized as the main agent in grape must fermentation, but yeast strains belonging to other genera, including *Hanseniaspora*, are known to predominate during the first stages of alcoholic fermentation. Although non-*Saccharomyces* yeast strains have a well-recognized genetic diversity, understanding of their impact on wine flavour richness is still emerging. In this study, 11 *Hanseniaspora vineae* strains were used to ferment a chemically defined simil-grape fermentation medium, resembling the nutrient composition of grape juice but devoid of grape-derived secondary metabolites. GC–MS analysis was performed to determine volatile compounds in the produced wines. Our results showed that benzyl alcohol, benzyl acetate and 2-phenylethyl acetate are significantly synthesized by *H. vineae* strains. Levels of these compounds found in fermentations with 11 *H. vineae* different strains were one or two orders of magnitude higher than those measured in fermentations with a known *S. cerevisiae* wine strain. The implications for winemaking in response to the negative correlation of benzyl alcohol, benzyl acetate and 2-phenylethyl acetate production with yeast assimilable nitrogen concentrations are discussed. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: phenylpropanoids; non-*Saccharomyces*; wine yeast fermentation; *Hanseniaspora vineae*; wine aroma compounds

Received: 30 December 2015

Accepted: 27 February 2016

Introduction

Nowadays, some winemakers and brewers are rediscovering the value of using mixed cultures or spontaneous fermentation in order to increase flavour complexity (Carrau, 2006; Carrau, *et al.*, 2015). It is believed that a selected and inoculated strain of *S. cerevisiae* will suppress any native non-*Saccharomyces* species and dominate the fermentation process. Although this expectation has been widely accepted by winemakers, several studies

have revealed that non-*Saccharomyces* yeasts can indeed persist during the various stages of fermentations that are inoculated with pure cultures of *S. cerevisiae* (Mora *et al.*, 1990; Ciani *et al.*, 2010; Andorrá *et al.*, 2010; De Benedictis *et al.*, 2011; Garavaglia *et al.*, 2015). Several studies evaluated the involvement of non-*Saccharomyces* yeasts during alcoholic fermentation and their role in the metabolic impact and aroma complexity of the final product (Jolly *et al.*, 2014; Carrau *et al.*, 2015). Moreover, even though non-*Saccharomyces* yeast

strains, which account for >99% of the grape native flora, have a well-recognized genetic diversity, understanding of their impact on wine flavour richness is still emerging (Steensels *et al.*, 2014; Ugliano and Henschke, 2009). The morphological apiculate yeast genus *Hanseniaspora* accounts for about 60% of this non-*Saccharomyces* grape natural flora (Carrau *et al.*, 2015). Besides, some key aroma compounds, levels such as 2-phenylethyl acetate, increased when *H. vineae* was compared to *Saccharomyces* single-strain fermentations (Carrau, 2006; Medina *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2011).

Benzyl alcohol has been shown to contribute to wine aroma descriptors, such as fig, tobacco and chocolate, in varieties such as Cabernet Sauvignon (Francis *et al.*, 1998), while 2-phenylethyl acetate has been reported as contributing to flowery and fruity descriptors (Boido, 2002).

This study contributes to the valuable application of *H. vineae* strains to synthesize benzyl alcohol, benzyl acetate, 2-phenylethyl alcohol and 2-phenylethyl acetate in higher concentrations than those usually found in grapes, thus contributing to increasing yeast flavour diversity after fermentation. Ammonium levels modifications were tested using a chemically defined similar-grape fermentation medium in order to evaluate its effect as potential regulator for the synthesis of phenylpropanoids.

Materials and methods

Yeast strains

The *S. cerevisiae* strain used was Montrachet UCD 522 (University of California, Davis), referred to as M522 in this work, a commercial *S. cerevisiae* strain used in wine production of *H. vineae* strains were isolated from Uruguayan vineyards. The identification codes used in this work correspond to those assigned for the Sección Enología (Facultad de Química-UdelaR, Montevideo, Uruguay) yeast culture collection. The 11 *H. vineae* isolates used in this work were identified by sequencing the variable D1/D2 region from the 26S rDNA gene and differentiated as different strains by Tandem repeat tRNA PCR analysis (Barquet *et al.*, 2012).

Fermentation conditions

Chemically defined synthetic grape fermentation medium (resembling the nutrient composition of grape juice but devoid of grape-derived secondary metabolites) was used, and is referred to as 'CDG medium' in this work. It was prepared as previously described (Carrau *et al.*, 2008) but modified as follows: the total nitrogen content was adjusted to a basic amount of yeast-assimilable nitrogen value (YAN level; sum of amino acids and ammonium without proline) of 50 mg N/l and up to 250 mg N/l for the experiments with diammonium phosphate additions. The nitrogen composition, expressed in mg N/l, of the CDG medium was as follows for a YAN level of 100 mg N/l: ammonium phosphate (60.3), arginine (90.4), glutamate (60.3), proline (60.3), serine (48.2), aspartate (42.2), threonine (42.2), leucine (36.2), lysine (30.1), glutamine (24.1), isoleucine (24.1), valine (24.1), asparagine (18.1), histidine (18.1), methionine (18.1), phenylalanine (18.1), alanine (12.1), tryptophan (12.1), glycine (6) and tyrosine (2.4). The final pH for each medium was adjusted to 3.5 with concentrated HCl. Equimolar concentrations of glucose and fructose were added to reach 200 g/l and the mixed vitamins and salts used were as previously described (Henschke and Jiranek, 1993). Under our experimental conditions, Tween 80 was excluded from the medium because it was found to have a negative impact on the sensory characteristics of the resultant wines. Ergosterol was added as the only lipid supplement, at a final concentration of 10 mg/l. Inocula were prepared in the same CDG medium at 100 mg N/l YAN by incubation for 12 h in a rotary shaker at 150 rpm and 25 °C. Inoculum size for all strains was 1×10^5 cells/ml in the final medium. Fermentations were carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 125 ml medium, closed with cotton plugs to simulate microaerobic conditions (Fariña *et al.*, 2012). Static batch fermentation were conducted at 20 °C in triplicate, simulating wine-making conditions. Fermentation activity was measured as CO₂ weight loss and expressed in g/100 ml. Samples were taken once a day to measure cell growth in an improved Neubauer chamber. Samples for GC-MS analysis were taken 1 day after the end of the fermentation process and filtered through 0.45 mm pore membranes (Sartorius); SO₂ was added as sodium metabisulphite (50 mg/l).

GC–MS analysis

Aroma volatile compounds

Extraction of aroma compounds was performed using adsorption and separate elution from an Isolute (IST Ltd, Mid-Glamorgan, UK) ENV1 cartridge packed with 1 g highly crosslinked styrene–divinyl benzene (SDVB) polymer. The sample preparation and GC–MS analysis was performed as described (Boido *et al.*, 2003), using a Shimadzu QP 2010 ULTRA (Tokyo, Japan) mass spectrometer equipped with a Stabilwax (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness; Restek) capillary column.

Identification and quantification

The wine aroma components were identified by comparison of their linear retention indices, with pure standards for benzyl alcohol, benzyl acetate, 2-phenylethyl alcohol and 2-phenylethyl acetate (Aldrich, Milwaukee, WI, USA). Comparison of fragmentation patterns in the MS with those stored on the GC–MS databases was also performed (McLafferty and Stauffer, 1991; Adams 2007). GC–MS instrumental procedures using an internal standard (1-heptanol) were applied for quantitative purposes, as previously described (Versini *et al.*, 1994) and evaluated (Carlin, 1998; Boido *et al.*, 2003).

Statistical analysis

2-Phenylethyl acetate levels produced in wine by using 12 yeast strains in the CDG fermentation medium were evaluated by analysis of variance (ANOVA), as also was the effect of diammonium phosphate addition on phenylpropanoids production by *H. vineae* at four YAN levels (50, 75, 100 and 250 mg N/l). Differences between mean values were determinate by LSD test. All the ANOVA analyses were performed with Statistica v. 7.0 software.

Results and discussion

Eleven *H. vineae* strains from our native yeast collection (Sección Enología, Facultad de Química-UdelaR), including Hv025, already applied by our group in wine making (Medina *et al.*, 2013), were selected in order to compare, within the species, their ability to produce 2-phenylethyl acetate in a defined synthetic medium. A commercial *S. cerevisiae* wine strain (M522) was compared to the 11 *H. vineae* strains. The production of 2-phenylethyl acetate by wine yeasts was measured at the end of fermentation in CDG medium containing 150 mg N/l YAN (the usual YAN level found in industrial grape juice (see Materials and methods and Figure 1). As expected, the results found

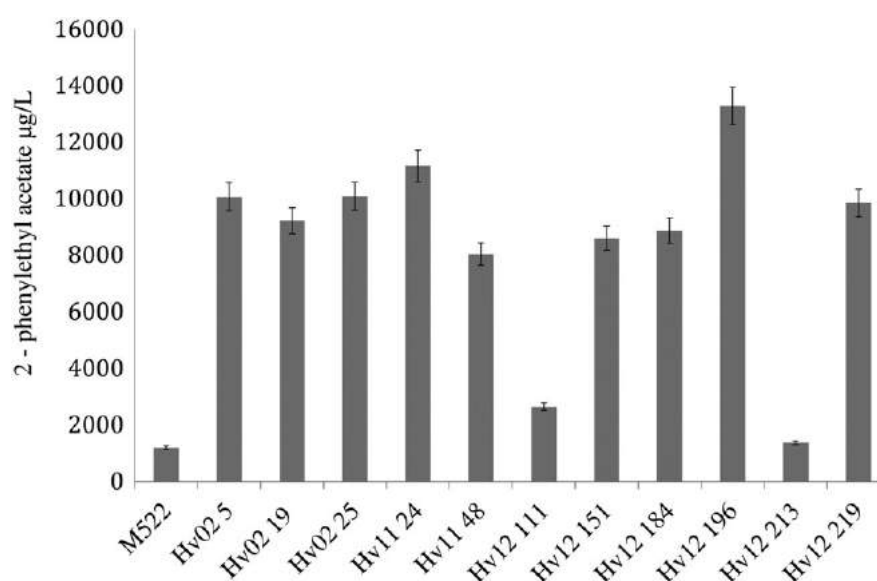


Figure 1. 2-Phenethyl acetate production by *H. vineae* strains compared to *Saccharomyces cerevisiae* strain wine yeasts (M522)

showed that the production of 2-phenylethyl acetate by the *S. cerevisiae* strain is very limited in the CDG medium compared to most of the *H. vineae* strains tested. These results are in agreement with previous reports of mixed cultures of *H. vineae*–*S. cerevisiae* in real grape juice fermentations of Chardonnay (Carrau, 2006; Medina *et al.*, 2013) and Tempranillo (Viana *et al.*, 2011). Nevertheless, as seen in Figure 1, the wide strain diversity within this species of 2-phenylethyl acetate accumulation, which accounts for 1800–13 000 µg/l in our model medium, can be appreciated. All strains clearly produce above the threshold reported for this ester (250 µg/l) (Carrau *et al.*, 2008). No correlation was found between the production of 2-phenylethyl acetate and the fermentation rates (data not shown) of the different *H. vineae* strains, although the slowest-growing strain (Hv12213) showed the lowest 2-phenylethyl acetate production. Figure 2 shows the formation of benzyl and 2-phenylethyl alcohols and the corresponding acetates at the end of fermentation. When production and accumulation of these compounds were compared for the two yeast species, only 2-phenylethyl alcohol was produced at higher levels by *S. cerevisiae*. However, the sum of 2-phenylethyl alcohol and its acetate was greater in *H. vineae*; this result clearly showed that the difference between these two species will be at the acetylation step (56% of the alcohol is acetylated in *H. vineae* compared to <2% in *S.*

cerevisiae). Interestingly, benzyl alcohol acetylation showed a very low formation rate for both species (about 2% of the alcohol was acetylated).

Effect of ammonium on phenylpropanoid compounds

Feeding experiments, changing the ammonium concentration of the artificial medium, were designed to investigate its effect as a potential pathway regulator for the formation of phenylpropanoids using the main *H. vineae* producer, strain Hv12196. Figure 3 shows the ammonium effect, where a consistent negative correlation was observed in the formation of benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol and their acetates with increased diammonium phosphate levels. A significant inhibition to the production of benzyl alcohol and 2-phenylethyl alcohol was observed at a YAN level of 250 mg N/l (78 and 5 µg/l, respectively). This behaviour in both alcohols could suggest an inhibitory effect from inorganic nitrogen at some level in the biosynthetic pathway, as was shown for the biosynthesis of other higher alcohols in *S. cerevisiae* (Carrau *et al.*, 2008). These results clearly showed that the increased use of diammonium phosphate in wine making, mainly applied for increasing ester production, will decrease the production of phenylpropanoid compounds, compromising the final flavour complexity of the wine. Further studies with other yeast-assimilable nitrogen

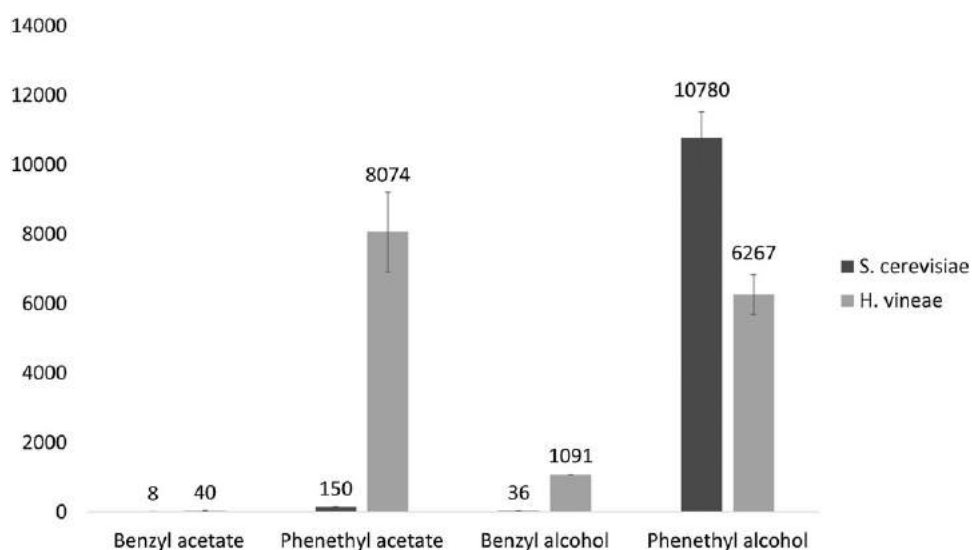


Figure 2. Production of benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol and their acetates by *H. vineae* Hv12196 strain and *S. cerevisiae* M522

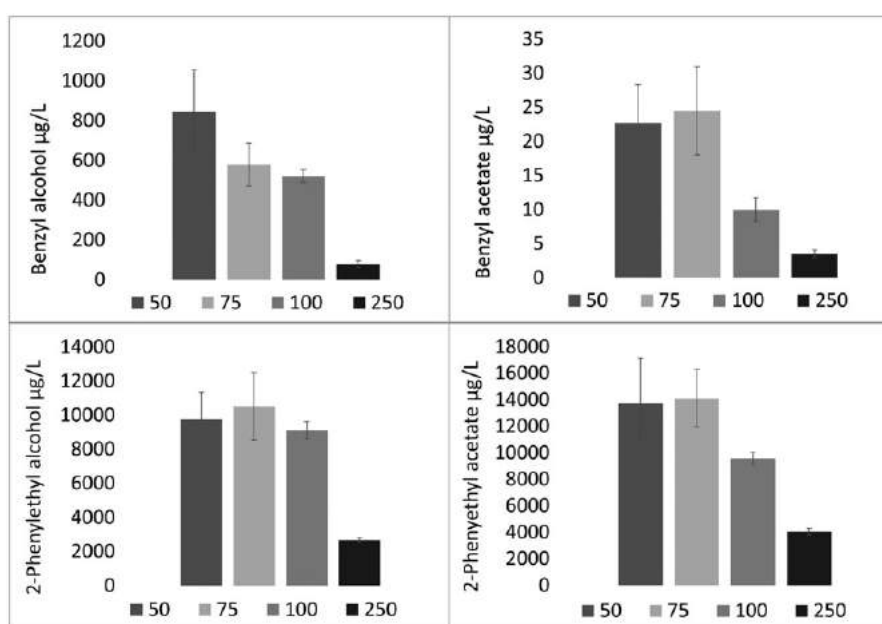


Figure 3. Production of benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol and their acetates at different concentrations of YAN adjusted with diammonium phosphate with *H. vineae* Hv12196

compounds, such as the aromatic amino acids, will improve our understanding of the metabolic pathways of phenylpropanoids.

Acknowledgements

We wish to thank Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) 437 CSIC Group Project No. 656 and CSIC Productive Sector Project No. 602 of UdelaR, Uruguay (Grant Nos ANII Postgraduate POS_NAC_2012_1_9099) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) 438 *Hanseniaspora vineae* FMV 6956 project for financial support.

References

- Adams RP. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th edn. Allured: Carol Stream, IL.
- Andorrà I, Berradre M, Rozès N, *et al.* 2010. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur Food Res Technol* **231**: 215–224.
- Barquet M, Martín V, Medina K, *et al.* 2012. Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces* subspecies. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 807–814.
- Boido E. 2002. Changes Produced by Malolactic Fermentation in the Aromatic Fraction of Tannat Wines. PhD Thesis, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.
- Boido E, Lloret A, Medina K, *et al.* 2003. Aroma composition of *Vitis vinifera* cv. Tannat: the typical red wine from Uruguay. *J Agric Food Chem* **51**: 5408–5413.
- Carlin S. 1998. Metodi di Arricchimento di Composti dell'Aroma per una possibile Tipicizzazione di vini Traminer. PhD Thesis, Università degli Studi di Udine, Udine, Italy.
- Carrau F. 2006. Native yeasts for low input winemaking: searching for wine diversity and increased complexity. In International Wine Microbiology Symposium 2006; 33–39.
- Carrau F, Gaggero C, Aguilar PS. 2015. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends Biotechnol* **33**: 148–154.
- Carrau FM, Medina K, Farina L, *et al.* 2008. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res* **8**: 1196–1207.
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* **10**: 123–133.
- De Benedictis M, Blevé G, Grieco F, *et al.* 2011. An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. *A Van Leeuwenhoek J Microb* **99**: 189–200.
- Fariña L, Medina K, Urruty M, *et al.* 2012. Redox effect on volatile compound formation in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem* **134**: 933–939.
- Francis IL, Kassara S, Noble AC, Williams PJ. 1998. The contribution of glycoside precursors to Cabernet Sauvignon and Merlot aroma. In Chemistry of Wine Flavor, Waterhouse AL, Ebeler SE (eds). ACS Symposium Series. American Chemical Society Washington, DC; 13–30.
- Garavaglia J, de Souza Schneider RDC, Mendes SDC, *et al.* 2015. Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production. *Microbiol Res* **173**: 59–65.
- Henschke PA, Jiranek V. 1993. Yeasts – metabolism of nitrogen compounds. In Wine Microbiology and Biotechnology, Fleet GH (ed). Harwood Academic Chur, Switzerland; 77–164.

- Jolly NP, Varela C, Pretorius IS. 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* **14**: 215–237.
- McLafferty FW, Stauffer DB. 1991. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, vol. 5. Wiley: Chichester.
- Medina K, Boido E, Fariña L, et al. 2013. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem* **141**: 2513–2521.
- Mora J, Barbas J, Mulet A. 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Vitic* **41**: 156–159.
- Steensels J, Snoek T, Meersman E, et al. 2014. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 947–995.
- Ugliano M, Henschke PA. 2009. Yeasts and wine flavour. In *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer: Berlin, Heidelberg; 313–392.
- Versini G, Orriols I, Dalla SA. 1994. Aroma components of Galician Albariño, Loureira and Godello wines. *Vitis* **170**: 165–170.
- Viana F, Belloch C, Vallés S, Manzanares P. 2011. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*–*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int J Food Microbiol* **151**: 235–240.

De Novo Synthesis of Benzenoid Compounds by the Yeast *Hanseniaspora vineae* Increases the Flavor Diversity of Wines

Valentina Martin,[†] Facundo Giorello,[†] Laura Fariña,^{†,‡} Manuel Minteguiaga,[§] Valentina Salzman,^{⊥,¶} Eduardo Boido,[†] Pablo S. Aguilar,^{⊥,¶} Carina Gaggero,[‡] Eduardo Dellacassa,[§] Albert Mas,^{||} and Francisco Carrau^{*,†}

[†]Sección Enología, Departamento Ciencia y Tecnología Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la Republica, 11800 Montevideo, Uruguay

[‡]Departamento de Biología, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 11600 Montevideo, Uruguay

[§]Catedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la Republica, 11800 Montevideo, Uruguay

^{||}Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Faculty of Oneology, University Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

[⊥]Laboratorio de Biología Celular de Membranas, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay

[¶]Laboratorio de Biología Celular de Membranas, IIB-INTECH, CONICET, Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Argentina

Supporting Information

ABSTRACT: Benzyl alcohol and other benzenoid-derived metabolites of particular importance in plants confer floral and fruity flavors to wines. Among the volatile aroma components in *Vitis vinifera* grape varieties, benzyl alcohol is present in its free and glycosylated forms. These compounds are considered to originate from grapes only and not from fermentative processes. We have found increased levels of benzyl alcohol in red Tannat wine compared to that in grape juice, suggesting *de novo* formation of this metabolite during vinification. In this work, we show that benzyl alcohol, benzaldehyde, *p*-hydroxybenzaldehyde, and *p*-hydroxybenzyl alcohol are synthesized *de novo* in the absence of grape-derived precursors by *Hanseniaspora vineae*. Levels of benzyl alcohol produced by 11 different *H. vineae* strains were 20–200 times higher than those measured in fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* strains. These results show that *H. vineae* contributes to flavor diversity by increasing grape variety aroma concentration in a chemically defined medium. Feeding experiments with phenylalanine, tryptophan, tyrosine, *p*-aminobenzoic acid, and ammonium in an artificial medium were tested to evaluate the effect of these compounds either as precursors or as potential pathway regulators for the formation of benzenoid-derived aromas. Genomic analysis shows that the phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) and tyrosine ammonia lyase (*TAL*) pathways, used by plants to generate benzyl alcohols from aromatic amino acids, are absent in the *H. vineae* genome. Consequently, alternative pathways derived from chorismate with mandelate as an intermediate are discussed.

KEYWORDS: benzyl alcohol, wine yeast fermentation, *Hanseniaspora vineae*, genome, *PAL/TAL* alternative biosynthetic pathway

INTRODUCTION

The importance of volatile aryl alkyl alcohols in the flavor and grape character of some cultivars of *Vitis vinifera* has been well reviewed.^{1–3} The dominating aryl alkyl alcohols found in several grape varieties are the aromatic groups of benzenoid/phenylpropanoid-related compounds (intermediates and end products) that significantly contribute to wine aroma during vinification or barrel aging.¹ Benzenoid/phenylpropanoid compounds, such as β -phenylethyl alcohol and benzyl alcohol, can represent 10–51% of the total hydrolyzed volatile fraction of grapes such as Chardonnay,⁴ Cabernet Sauvignon, Merlot,⁵ Tannat,⁶ and Pinot Noir,⁷ contributing with flavor notes described as floral or fruity.^{2,6–8} Plant benzenoids also provide numerous specialized metabolites that participate in many key functions such as plant–plant communication, antimicrobial activity, phytohormones, vitamins, plant defense, etc.⁹

Some winemakers are rediscovering the value of using mixed cultures or spontaneous fermentation to increase yeast diversity, which is expected to result in increased flavor complexity.^{10–13} Understanding of the impact of non-*Saccharomyces* yeast strains on wine flavor richness is still incipient,^{14–16} although they account for more than 99% of the grape native flora. Furthermore, within non-*Saccharomyces* grape natural flora, the morphologic apiculate yeast of the genus *Hanseniaspora* accounts for approximately $\geq 60\%$ of this natural flora.¹³

We have recently demonstrated that during white Chardonnay wine vinification, application of *Hanseniaspora*

Received: November 14, 2015

Revised: May 11, 2016

Accepted: May 19, 2016

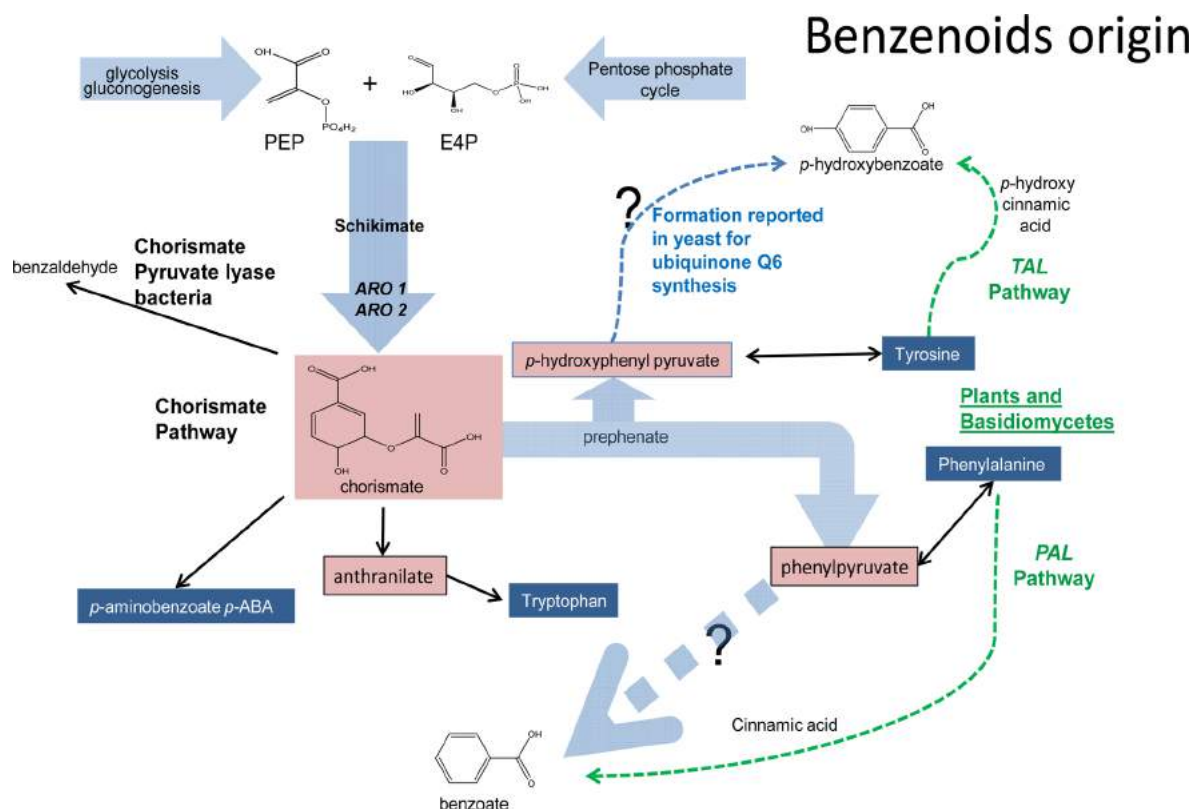


Figure 1. Shikimic acid and chorismate pathway for the synthesis of aromatic amino acids and *p*-aminobenzoic acid (*p*-ABA). The main intermediates are highlighted with a red background: phenylpyruvate, *p*-hydroxyphenyl pyruvate, and anthranilate. Green dotted lines indicate phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL) pathways that have been elucidated in plants and some filamentous fungi, where the key intermediates to benzenoids are cinnamic acids. We confirmed here that these enzymes are not present in *H. vineae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and other Saccharomycotina yeasts. The great production of benzyl-derived compounds by *H. vineae* through an alternative pathway to PAL or TAL will contribute to our understanding of the steps that are denoted with question marks.

vineae increased the levels of some aroma compounds such as β -phenylethyl acetate, compared to levels seen with conventional fermentations.^{10,17} Moreover, during our studies of red wine fermentations with the typical grape cultivar Tannat of Uruguay, we have found higher levels of total benzyl alcohol in wine than in grape juice,^{6,18} suggesting *de novo* formation of this metabolite during vinification.

Although the complete metabolic pathways leading to the formation of volatile benzenoids are still not totally understood, it is known that benzyl alcohol is formed in plants during the phenylpropanoid synthesis by the PAL enzyme (phenylalanine ammonia-lyase).⁹ This enzyme is the first of phenylpropanoid metabolism in plants and catalyzes the conversion of phenylalanine to *trans*-cinnamic acid,¹⁹ which is subsequently converted into benzyl alcohol and other derived compounds. It has been found in some Basidiomycota and Ascomycota fungi.^{20,21} This enzyme is rarely found in yeast, and although it has been reported for the Basidiomycota yeast *Rhodotorula graminis*,²² it has not been found in the subphylum Saccharomycotina. Only one study in a defined medium reported the formation of benzyl alcohol for some species of Saccharomycotina: *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*), *Candida stellata*, *Schizosaccharomyces*, and *Zygosaccharomyces*.²³ Moreover, *p*-hydroxybenzoate has been shown to be an intermediate of ubiquinone Q6 synthesis in yeast,^{24,25} although the formation pathway is not totally understood. Via labeling experiments, it was reported that *p*-hydroxybenzoate is synthesized mainly through the shikimate/chorismate pathway,

and mutants (*aro1* and *aro2*) in this pathway are able to convert Tyr to *p*-hydroxybenzoate and efficiently compensate for this situation (see Figure 1).²⁶ In Figure 1, it is shown that *Saccharomyces* uses the chorismate biosynthesis pathway for the synthesis of Phe, Tyr, Trp, and *p*-ABA.²⁷

Benzyl alcohol (BAL) has been associated with wine varieties such as Cabernet Sauvignon⁵ and aroma descriptors such as chocolate, fig, and tobacco, while benzaldehyde (BD) has been known to contribute to almond and dry fruit aroma descriptors. On the other hand, *p*-hydroxybenzyl compounds were described as fruity-sweet coconut and woody or vanilla flavors.²⁸ Some of these descriptors have also been identified in Tannat wines before and after malolactic fermentation.²⁹

In the search for new non-*Saccharomyces* yeast strains with the capacity to produce aromatic compounds in grape musts with low nitrogen content, in this work we show that *H. vineae* strains can synthesize benzylic and *p*-hydroxybenzyl alcohols *de novo* at concentrations higher than those found in grapes, thus contributing to an increase in yeast flavor after vinification. Phenolic amino acid and ammonium concentration changes in the artificial medium were also tested to evaluate the effect of these compounds as potential pathway regulators on the formation of these benzenoid compounds. As we have sequenced the genome of *H. vineae*,³⁰ putative pathways used by it to synthesize benzenoids are discussed in comparison with *S. cerevisiae* data and plant data.

Table 1. Comparison of Aryl Alkyl Metabolism-Related Genes of *H. vineae* and *S. cerevisiae* EC1118 Genomes

class of compound	enzymatic activity	genes identified ^a
higher alcohol	aromatic amino acid transferase	ARO8 (59.84), ARO9 (42.70)
	branched chain amino acid transferase	BAT1 (78.84), BAT2
	decarboxylase	ARO10 (34.1), PDC1 (80.46), PDC5, PDC6, THH3
	alcohol dehydrogenase	ADH1 , ADH2 (78.74), ADH3 (74.80), ADH4, ADH5 , ADH6 (44.74), ADH7 , SFA1 (68.16), GRE2 (50.73), YPR1, PAD1, SPE1 , OYE2 (58.06), HOM2 (78.24)
aryl alcohol dehydrogenase regulation		AAD3, AAD4, AAD6, AAD10, AAD14, AAD15, AAD16
		ARO80 (34.80), GAT2, GLN3, GZF3, DAL80
acetate esters	alcohol acetyl transferases	ATF1 , ATF2 (26.58)
volatile organic acids	aldehyde dehydrogenase	ALD2 (44.01), ALD3, ALD4 , ALD5 (53.45), ALD6 (55.07)
<i>p</i> -ABA synthesis	synthesis of <i>p</i> -ABA from chorismate	ABZ1 (40.59), ABZ2 (35.52)
aromatic amino acid synthesis	synthesis of chorismate, phenylalanine, tryptophan, and tyrosine	ARO1 (66.79), ARO2 (80.59), ARO3 (77.03), ARO4 (83.51), TRP2 (70.84), TRP3 (69.14), ARO7 (67.97), PHA2 (41.99), TYR1 (62.37)
benzyl alcohol/benzaldehyde synthesis	mandelate pathway	ARO10, PDC1, SCS7 (66.5), ALD6?, ALD2?, DLD1 (53), DLD2 (70), DLD3

^aGenes absent (struck through) or present are indicated; percentages in parentheses indicate amino acid sequence identities between both species. ARO genes requiring aromatic amino acid; ARO10, phenylpyruvate decarboxylase; ALD, aldehyde dehydrogenase; ABZ, *p*-ABA synthesis; ADH, alcohol dehydrogenase; ATF, alcohol acetyl transferase; BAT, branched chain amino acid transferase; DLD, D-lactate dehydrogenase; GRE2, NADPH-dependent methylglyoxal reductase; HOM2, aspartic β -semialdehyde dehydrogenase; OYE2, NADPH oxidoreductase; PDC, pyruvate decarboxylase; PHA2, prephenate dehydratase; SCS7, sphingolipid α -hydroxylase; TYR, prephenate dehydrogenase; TRP, tryptophan synthesis; SFA1, bifunctional alcohol dehydrogenase and formaldehyde dehydrogenase.

MATERIALS AND METHODS

Yeast Strains. The following *S. cerevisiae* strains were used: Montrachet UCD 522 (University of California, Davis, CA), termed MS22 in this work; ALG 804 commercial strain (DSM, Denmark); EC1118 (Lallemand, Canada); and 881, 882, and KU1, selected Uruguayan wine strains that have already been genetically characterized.³¹ All these *S. cerevisiae* strains are used in the commercial production of wine. *H. vineae* strains were isolated from vineyards in Uruguay, and the codes indicated in the figures are from our Enology Section's yeast culture collection. The 11 *H. vineae* isolates were identified by sequencing the variable D1/D2 region from the 26S rDNA gene and differentiated as different strains with tandem repeat tRNA polymerase chain reaction analysis.³²

Fermentation Conditions. Chemically defined synthetic grape fermentation medium (resembling the nutrient composition of grape juice but devoid of grape-derived secondary metabolites) was used and is termed CDG medium in this work. It was prepared as described previously³³ but modified as follows. The total nitrogen content was adjusted to a basic amount of yeast assimilable nitrogen (YAN level, sum of amino acids and ammonium without proline) of 50 mg of N/L for the experiments with diammonium phosphate (DAP) additions, 150 mg of N/L for simulating an industrial grape juice, and 100 mg of N/L for studying phenolic amino acid and *p*-aminobenzoic acid (*p*-ABA) effects. The latter YAN concentration was used because it resulted in a higher level of benzenoid formation. YAN values were indicated for each experiment, and shown here are the following concentrations for each nitrogen component to obtain a CDG medium with a YAN level of 100 mg of N/L (expressed in milligrams per liter): ammonium phosphate (60.3), phenylalanine (18.1), tryptophan (12.1), tyrosine (2.4), leucine (36.2), arginine (90.4), aspartate (42.2), glutamate (60.3), serine (48.2), threonine (42.2), lysine (30.1), glutamine (24.1), isoleucine (24.1), valine (24.1), histidine (18.1), asparagine (18.1), methionine (18.1), proline (60.3), alanine (12.1), and glycine (6). This medium contains 0.2 mg/L *p*-ABA, and the final pH of each medium was adjusted to 3.5 with HCl. Equimolar concentrations of glucose and fructose were added to reach 200 g/L, and the mixed vitamins and salts were as described previously.³⁴ Ergosterol was added as the only supplemented lipid at a final concentration of 10 mg/L. Inocula were prepared in the same CDG medium with a YAN level of 100 mg of N/L by incubation for 12 h in a rotary shaker at 150 rpm and 25 °C. The inoculum size was 1×10^5 cells/mL in the final medium for all strains as it was defined to improve aroma production in this medium.³⁵ Fermentations were

performed in 125 mL of medium contained in 250 mL Erlenmeyer flasks, closed with cotton plugs to simulate microaerobic conditions.³⁶ Fermentations were conducted under static batch conditions at 20 °C in triplicate. Samples were taken once a day to measure cell growth in an improved Neubauer chamber. Fermentation activity was measured as CO₂ weight loss and expressed in grams per 100 mL. Samples for GC–MS analysis were taken 1 day after fermentation was completed (except for experiments in Figure 2b as indicated); SO₂ was added as 50 mg/L sodium metabisulfite, filtered through 0.45 mm pore membranes, and kept at 4 °C until analyses were performed.

Effects of a Feeding Experiment on Benzenoid Compounds. DAP, phenylalanine (Phe), tyrosine (Tyr), tryptophan (Trp), and *p*-ABA were chosen as the YAN variables for the investigation of the effect of these amino acids and ammonium on the production of BAL, benzaldehyde (BD), *p*-hydroxybenzyl alcohol (*p*-HBAL), and *p*-hydroxybenzaldehyde (*p*-HBD). Experiments with different concentrations of each amino acid were performed always using a YAN concentration of 100 mg of N/L, substituting the amino acid concentration with DAP when the corresponding amino acid was not added, and decreasing the concentration of DAP in the medium when amino acids were added.

Analysis of the effect of ammonium on benzenoid compound production was performed at different YAN concentrations of 50, 75, and 250 mg of N/L by supplementation with DAP, using the same feeding levels that were used in our previous work with *S. cerevisiae*.³³

GC–FID and GC–MS Analysis. *Extraction of Aroma Compounds.* Extraction was performed using adsorption and separate elution from an Isolute (IST Ltd., Mid Glamorgan, U.K.) ENV1 cartridge packed with 1 g of a highly cross-linked styrene-divinylbenzene (SDVB) polymer. Treatment of samples and GC–MS analysis were performed as described previously⁶ in a Shimadzu (Tokyo, Japan) QP 2010 ULTRA mass spectrometer equipped with a Stabilwax (30 m \times 0.25 mm inside diameter, 0.25 μ m film thickness, Restek) capillary column.

Identification and Quantification. GC–FID and GC–MS instrumental procedures using an internal standard (1-heptanol) were applied for quantitative purposes, as described previously.⁶ The components of wine aromas were identified by comparison of their linear retention indices, with pure standards for BAL, BD, *p*-HBAL alcohol, and *p*-HBD (Aldrich, Milwaukee, WI). Comparison of mass spectral fragmentation patterns with those stored on databases was also performed.

***H. vineae* Genome and Gene Annotation.** *H. vineae* strains were isolated during fermentation of wine made from Tannat, the

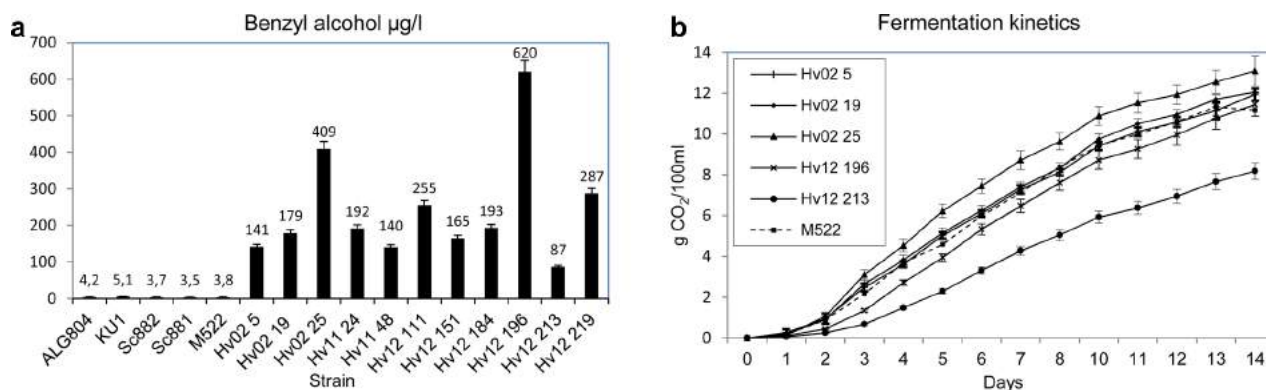


Figure 2. (a) Benzyl alcohol (BAL) production by *H. vineae* strains compared to that of *S. cerevisiae* wine yeasts (ALG804, KU1, Sc882, Sc881, and M522). Fermentations were performed in the model artificial grape medium with a yeast assimilable nitrogen (YAN) level of 150 mg of N/L at 20 °C, and samples were analyzed after fermentation for 14 days. Results showed a significant difference between species ($P \leq 0.001$) according to an LSD test of ANOVA calculated for each strain. Error bars indicate the SD of the mean. (b) Fermentation kinetics of the three most diverse (Hv0225, Hv12196, and Hv12213) and two sequenced (Hv0205 and Hv0219) strains of *H. vineae* are shown as CO₂ weight lost, compared to that of M522 (---).

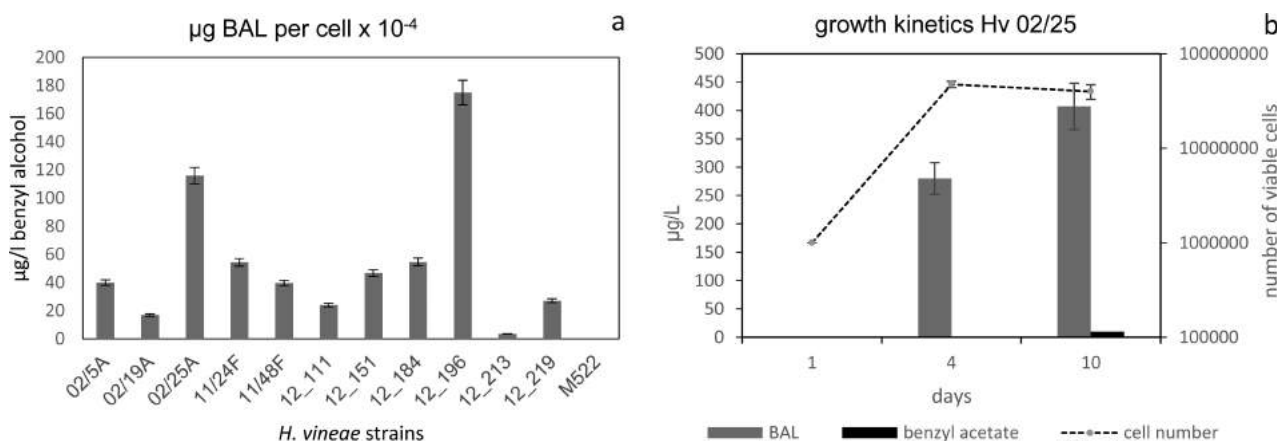


Figure 3. (a) *H. vineae* strains and *S. cerevisiae* M522 fermented in chemically defined grape (CDG) medium with a YAN level of 150 mg of N/L at 20 °C. GC analysis was used to determine benzyl alcohol (BAL) production per cell. Error bars indicate the SD of the mean. (b) Growth kinetics (---) of *H. vineae* 02/25 under the same fermentation conditions. Benzyl acetate and BAL formation during fermentation are shown as bars at the end of the exponential phase (day 4) and at the end of the stationary phase (day 10). Error bars indicate the SD of the mean.

traditional red grape of Uruguay.¹⁸ Genomic DNA from strain T02/19AF was sequenced on an Illumina Genome Analyzer Ix platform, and the processed reads were then assembled using MaSuRCA,³⁷ as was reported recently by us.³⁰ The putative open reading frames predicted with Augustus³⁸ were annotated through blastp against *S. cerevisiae* S288C proteins (see the Supporting Information). PAL/TAL genes and chorismate pyruvate lyase were searched using the following Uniprot sequences: P11544 (PAL/TAL, of *Rhodotorula gracilis*) and P26602 (chorismate pyruvate lyase, of *Escherichia coli*). Protein domains were annotated using the pfam database (<http://pfam.xfam.org/>) (see the Supporting Information). To establish orthologous clusters between *S. cerevisiae* S288C and *H. vineae*, the predicted proteins were analyzed through the OrthoMCL web server (see the Supporting Information).³⁹ This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under accession number JFAV00000000.

The presence or absence of genes was discussed according to the annotation of the genomic sequences of the *H. vineae* strain. Table 1 was built with the *H. vineae* genome compared with the industrial wine yeast *S. cerevisiae* EC1118 genome that was the strain used for the feeding experiments with amino acids and *p*-ABA shown in Figures 5 and 6.

Statistical Analysis. ANOVA of BAL in wine produced using 16 yeast strains in the CDG fermentation medium was performed.

ANOVA of the effect of the addition of DAP on benzenoid compounds at three YAN levels (50, 75, and 250 mgN/L) for *H. vineae* was also performed. The benzenoid compound concentrations were also evaluated for the effects of Phe, Tyr, Trp, and *p*-ABA in the CDG medium. STATISTICA version 7.0 was used for all the ANOVA. Differences in mean benzenoid compound concentrations were evaluated by the least significant difference test.

RESULTS AND DISCUSSION

We selected 11 different *H. vineae* strains from our native yeast collection to compare within the species the capacity for formation of BAL in the synthetic medium. The production of BAL by wine yeasts was measured at the end of fermentation in CDG medium containing a YAN level of 150 mg of N/L (a usual YAN level found in industrial grape juice) (Figure 2). Five native and commercial wine *S. cerevisiae* strains were compared to 11 *H. vineae* strains, including Hv025 that had previously been used by us for winemaking.¹⁷ It can be seen that the accumulation of BAL by *S. cerevisiae* strains is very limited in the CDG medium compared to that of the tested *H. vineae* strains. Figure 2 shows that the production of this alcohol within the species *H. vineae* varies in concentration

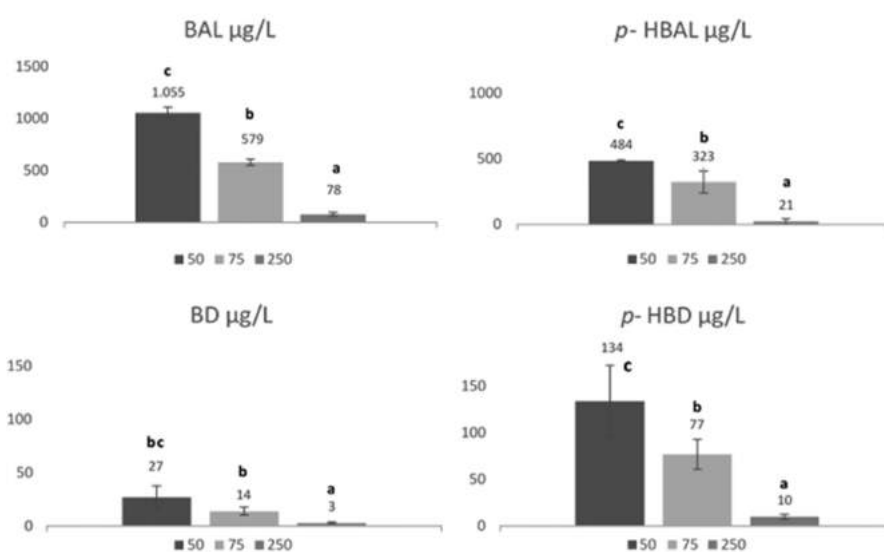


Figure 4. Formation of benzyl alcohol (BAL), benzaldehyde (BD), *p*-hydroxybenzyl alcohol (*p*-HBAL), and *p*-hydroxybenzaldehyde (*p*-HBD) by *H. vineae* 12/196 in the chemically defined grape (CDG) medium with three YAN levels, where levels of 75 and 250 mg of N/L were reached via addition of diammonium phosphate (DAP). Fermentations were conducted at 20 °C; data are expressed in micrograms per liter. Letters at each data point indicate the level of significant difference ($P \leq 0.001$) according to an LSD test of ANOVA calculated for each treatment. Error bars indicate the SD of the mean.

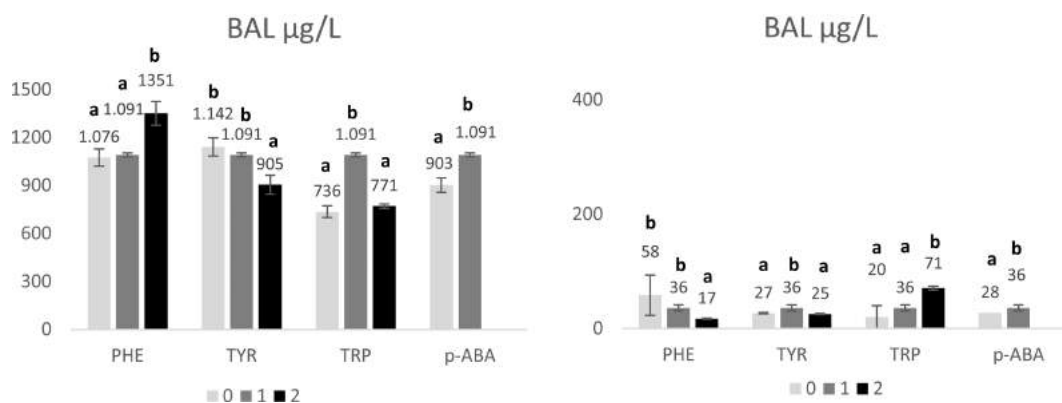


Figure 5. Benzyl alcohol formation by *H. vineae* 12/196 (left) and *S. cerevisiae* EC1118 (right) in the chemically defined grape (CDG) medium. Fermentations were performed at a constant YAN level (100 mg of N/L) but with omitted (0), normal juice concentration (1), or double-concentration (2) of the three amino acids, phenylalanine (PHE), tyrosine (TYR), and tryptophan (TRP). Diammonium phosphate (DAP) was used as the substitute of each of these amino acids according to the treatment, to maintain a YAN level of 100 mg of N/L. For *p*-aminobenzoic acid (*p*-ABA, 0.2 mg/L), only experiments with omitted and normal juice concentration were used. Fermentation was conducted at 20 °C. Letters at each data point indicate the level of significant difference ($P \leq 0.01$) according to an LSD test of ANOVA calculated for each treatment. Error bars indicate the SD of the mean.

from 87 to 620 µg/L under these conditions. The highest producer, strain Hv12196, produced a concentration level above the average sum of free and bound forms found in Tannat grape juice (385 µg/L) as previously described.⁴⁰ When the production of BAL was related to fermentation rates [estimated as the average rate between days 3 and 13, grams of CO₂ per 100 mL per day for each strain of *H. vineae* (Figure 2)] and total biomass [BAL/cell (Figure 3a)], it was confirmed that there was no correlation with these parameters ($R^2 = 0.51$ and $R^2 = 0.61$, respectively). Figure 3b shows the formation and accumulation of BAL and its acetate ester during fermentation. Interestingly, acetylation of this alcohol shows a very low formation rate (~2% of the alcohol was acetylated) when compared to that of the acetylation of β -phenylethyl alcohol that was detected previously up to 50% in *H. vineae* strains,

resulting in significantly higher concentrations of β -phenylethyl acetate.^{41,42}

Effect of Ammonium on BAL and *p*-BAL Production.

Feeding experiments with changes in ammonium concentration in the artificial medium were designed to investigate the effect of this compound as a potential pathway regulator for the formation of BAL, BD, *p*-HBAL, and *p*-HBD for the main producer strain 12/196. Figure 4 shows the effect of ammonium; a consistent negative correlation is observed in the formation of these four compounds with DAP levels (BAL $R^2 = 0.85$; *p*-HBAL $R^2 = 0.95$; BD $R^2 = 0.84$; *p*-HBD $R^2 = 0.87$). A significant decrease in the level of BAL and *p*-HBAL formation is observed with a YAN level of 250 mg of N/L (78 and 22 µg/L, respectively). Experiments with the same YAN level (250 mg of N/L), but with the amino acid mixture instead

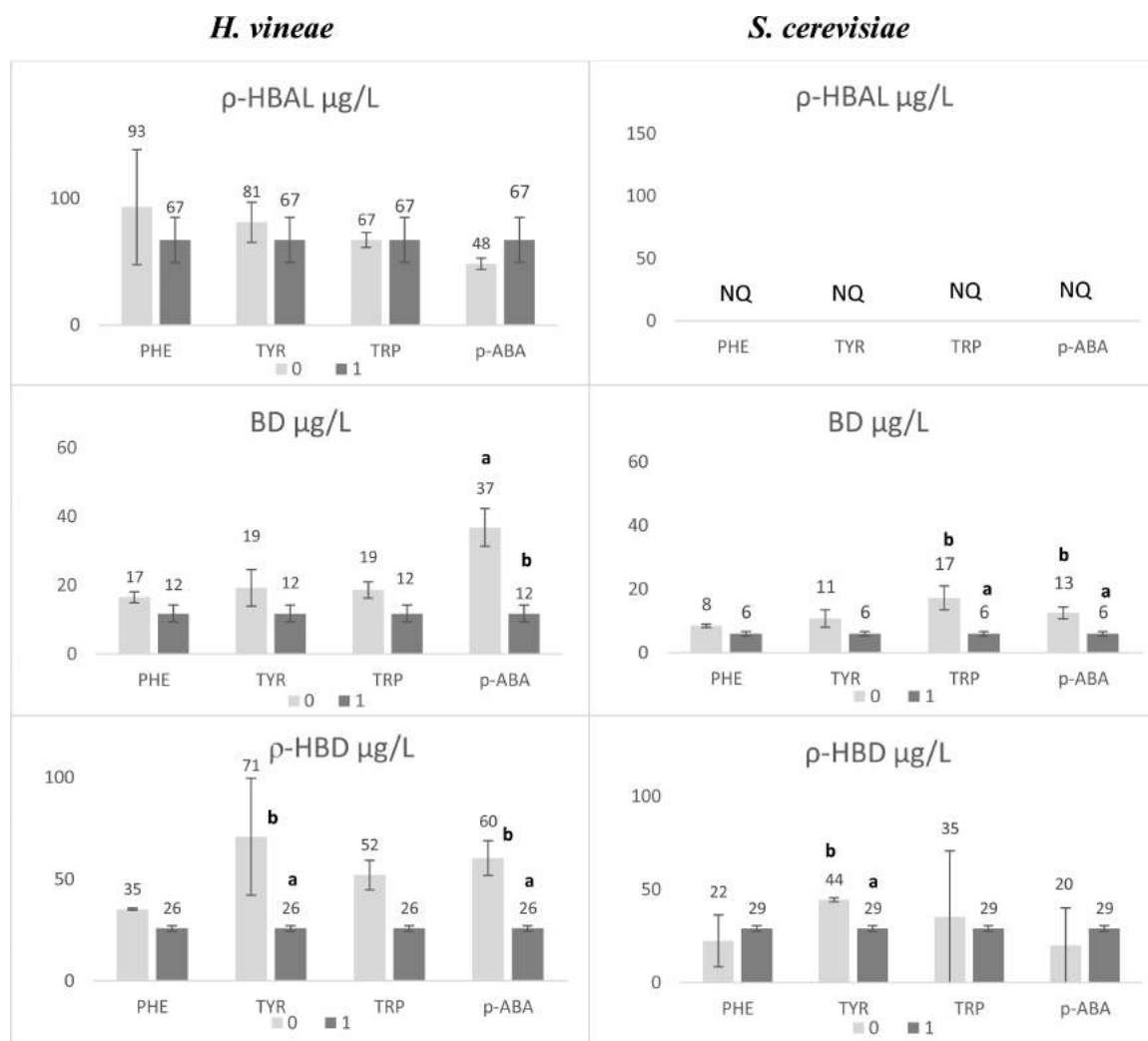


Figure 6. *p*-Hydroxybenzyl alcohol (*p*-HBAL), benzaldehyde (BD), and *p*-hydroxybenzaldehyde (*p*-HBD) formation by *H. vineae* Hv12/196 and *S. cerevisiae* EC1118 in the chemically defined grape (CDG) medium. Treatments with the same YAN level of 100 mg of N/L in the omitted (0) and normal juice concentration (1) of phenylalanine (PHE, 18.1 mg/L), tyrosine (TYR, 2.4 mg/L), and tryptophan (TRP, 12.1 mg/L). Fermentations were conducted at 20 °C. Letters at data points indicate the level of significant difference ($P \leq 0.01$) according to an LSD test of ANOVA calculated for each treatment. Error bars indicate the SD of the mean. NQ indicates not quantifiable (below the limit of quantification).

of DAP, result in a smaller decrease in the level of BAL formation [170 µg/L (data not shown)]. The similar behavior of both aldehydes, but at very low concentrations, suggested that they could be intermediates of alcohol formation. This behavior in both alcohols suggests an inhibitory effect or metabolic reorientation of inorganic nitrogen at some step in the biosynthetic pathway, as was shown for the formation of other higher alcohols in *S. cerevisiae*.³³ However, BAL does not show a similar pattern at very low YAN levels between 50 and 75 mg of N/L, where an increase in the level of production of the main higher alcohols was shown.³³ The level of BAL formation increased with the lowest YAN level up to 1055 µg/L (Figure 4) compared to 620 µg/L at a YAN level of 150 mg of N/L (Figure 2). As mentioned in the Introduction, to the best of our knowledge, only one reference was found reporting the production of BAL in a synthetic medium of up to 464 µg/L with the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.²³ In agreement with these results, although concentrations produced by *S. cerevisiae* yeasts were very low, the significant decrease in the level of BAL formation by DAP under anaerobic conditions was

also reported by us for this species.³⁶ Avoiding or delaying nitrogen supplementation during winemaking could be an interesting strategy for increasing the level of benzenoid synthesis for the final wine. Implications of the addition of DAP with respect to the decreasing level of phenolic aroma compound formation during winemaking are further discussed by us in ref 43.

Effect of Phe, Tyr, Trp, and *p*-ABA on BAL, *p*-HBAL, BD, and *p*-HBD Production. Feeding experiments were designed to investigate the effect of these compounds either as potential precursors or as pathway regulators for the formation of BAL and BD (considering phenylpyruvate as a probable precursor) and *p*-HBAL and *p*-HBD (considering *p*-hydroxyphenyl pyruvate as the other probable precursor). In Figure 5, the effect of omitting and doubling the concentration of each of the three aromatic amino acids in the medium, keeping the YAN level constant at 100 mgN/L, is shown. As expected for *H. vineae*, BAL was produced, yielding a concentration >30-fold higher than that of *S. cerevisiae* industrial strain EC1118. It could be observed for *H. vineae* that Phe and *p*-ABA addition

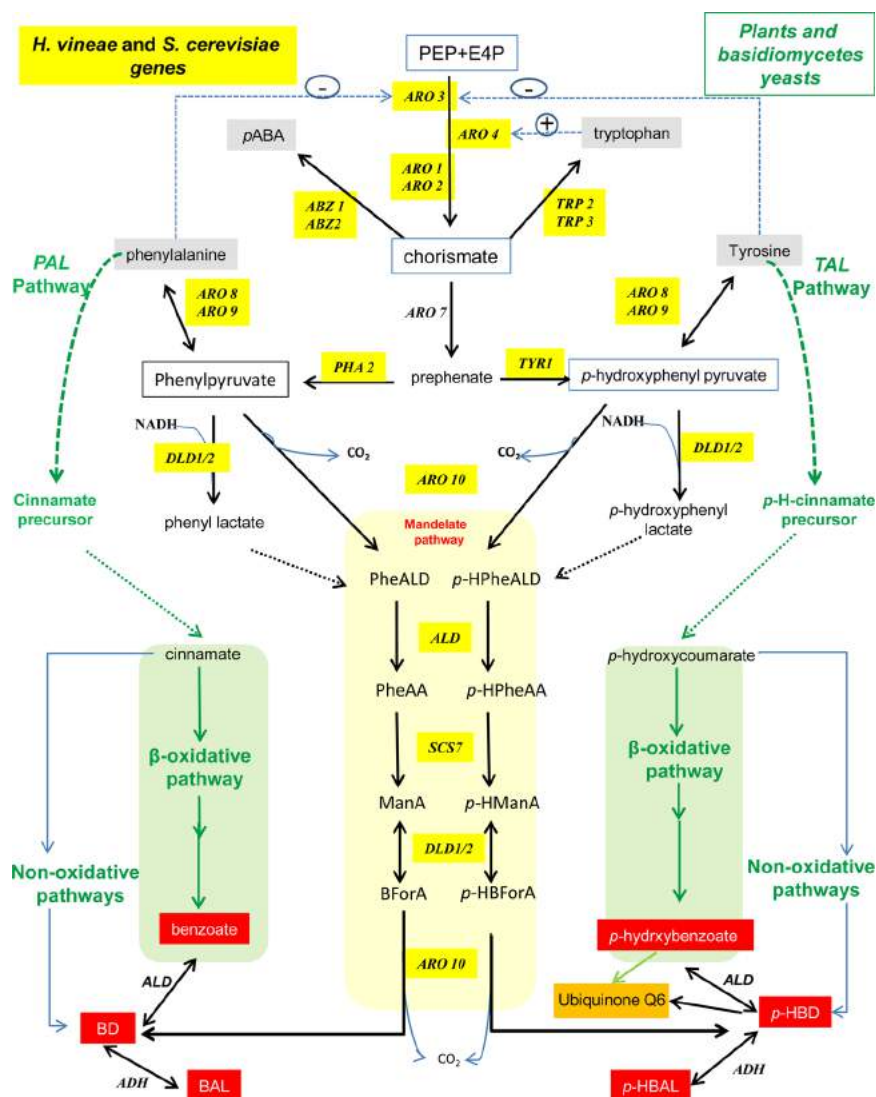


Figure 7. Proposed pathways for the formation of benzyl alcohol (BAL), benzaldehyde (BD), *p*-hydroxybenzyl alcohol (*p*-HBAL), and *p*-hydroxybenzaldehyde (*p*-HBD) in *H. vineae* through the chorismate pathway, with phenylpyruvate and *p*-hydroxyphenyl pyruvate as intermediates. The presence of genes that encode enzymes that catalyze different steps of the pathways was confirmed by genomic analysis of *H. vineae* compared with *S. cerevisiae* EC1118 (Table 1) and with plants (highlighted in yellow). Compounds in red boxes were determined by GC–MS in this work. Abbreviations: PheALD, phenylacetaldehyde; *p*-HPheALD, *p*-hydroxyphenylacetaldehyde; PheAA, phenylacetic acid; *p*-HPheAA, *p*-hydroxyphenylacetic acid; ManA, mandelic acid; *p*-HManA, *p*-hydroxymandelic acid.

significantly increased the level of production of BAL and Tyr on the other hand decreased it. The significant increase in the level of BAL formation in *H. vineae* with Trp addition at low concentrations may be explained if *de novo* synthesis of this alcohol occurs from sugars. It is known for some *S. cerevisiae* strains that Trp is a stimulator of the initial steps of the chorismate pathway unlike Phe and Tyr, which are inhibitors,²⁷ effects that are also in agreement with our results shown in Figure 5 for *S. cerevisiae* (EC1118 strain). This fact, and the fact that Trp could not be a catabolic precursor of BAL, may support the hypotheses of *de novo* synthesis of these compounds through an increase in chorismate availability in the pathway (Figures 1 and 7). However, further research expanding the dose concentrations will be needed with *H. vineae*, as a doubled Trp concentration decreased the level of accumulation of BAL, showing a bimodal behavior in Figure 5. The increase in the level of *p*-ABA affects both species equally, increasing the level of BAL formation. It was recently reported

for *S. cerevisiae* that changes in *p*-ABA synthase gene (*ABZ1*) expression have a significant effect on the synthesis of many flavor aroma compounds regulated by nitrogen, such as β -phenylethyl alcohol.⁴⁴ Our results show a similar behavior of BAL and *p*-HBAL [and β -phenylethyl alcohol (data not shown)] upon *p*-ABA addition for *H. vineae*. However, an opposite behavior is observed between the species with an increase in the level of Phe. The significant increase in the level of BAL with a doubled Phe concentration in *H. vineae* up to 1351 $\mu\text{g/L}$ supports the hypothesis that Phe catabolism capacity is increasing the flow of phenylpyruvate into the chorismate pathway.

Figure 6 shows that production of *p*-HBAL by *H. vineae* is clearly another significant difference between *H. vineae* and *S. cerevisiae*, yielding levels of production 2 orders of magnitude higher, because this compound in *Saccharomyces* final wines was under a quantifiable value.

Benzyl and *p*-Hydroxybenzyl Alcohol Formation Pathways in *H. vineae*. Three alternative routes to the PAL/TAL pathways were previously proposed to produce *p*-hydroxybenzoate in *S. cerevisiae*: the direct formation from chorismate as in some bacteria with a chorismate pyruvate-lyase,⁴⁵ a nonoxidative pathway proposed for plants with a retro-aldol reaction from *p*-hydroxycoumarate, and the peroxisome β -oxidative pathway with acetyl-CoA formation.⁴⁶ No evident gene homologies were found by us for the first alternative in *H. vineae*. Furthermore, the second and third proposed alternatives were excluded by the fact that both involve cinnamic acids or derived compounds such as vinylphenol and vinylguaicol that cannot be synthesized by *S. cerevisiae* and *H. vineae* in our CDG medium (data not shown). This observation strongly supports the fact that these two pathways are not active under our experimental conditions. In addition, the key enzymatic step proposed by some authors for the conversion of *p*-hydroxyphenyl lactate to *p*-coumarate^{24,46} was never demonstrated for yeast.

Phenylpyruvate and *p*-Hydroxyphenyl Pyruvate Pathways to Benzenoids. Table 1 shows the presence and absence of aryl alkyl alcohol metabolism-related genes in *H. vineae* compared to *S. cerevisiae*. In Figure 7, we also show the proposed pathways for the formation of BAL and *p*-HBAL from phenylpyruvate and *p*-hydroxyphenyl pyruvate, respectively.

The synthesis of benzenoids in plants through phenylpyruvate as an alternative to the PAL pathway has been suggested within multiple putative pathways¹⁹ but has not yet been biochemically proven.⁹ Furthermore, this pathway through phenylpyruvate was also proposed for the fungi *Bjerkandera adusta*;⁴⁷ however, it has not been proven, because this fungus also has the ability to form *trans*-cinnamic acid derivatives through PAL, as was stated for many basidiomycete and some ascomycete fungi.²⁰ In this report,⁴⁷ labeling studies with both Phe and cinnamic acid showed that Phe produced a higher percentage of labeled BAL in *B. adusta*, suggesting that Phe may be using two parallel pathways, through PAL and through phenylpyruvate, while the labeled cinnamic acid is using only the β -oxidative and/or the nonoxidative pathways (see Figure 7). The absence of PAL in *H. vineae* suggests that benzenoids are necessarily dependent on *de novo* synthesis from chorismate. Genomic analysis of *H. vineae* indicates the existence of all the genes that encode enzymes of the chorismate pathway, and of ARO7 (chorismate mutase) and PHA2/TYR1 genes (see Figure 7), proving that this yeast could synthesize phenylpyruvate and *p*-hydroxyphenyl pyruvate through prephenate as in *S. cerevisiae*.

Mandelate Pathway to Benzenoids in Yeast. On the basis of these studies and previous reports, we propose here the mandelate pathway as a non-cinnamic acid formation route to benzenoids, and as an alternative pathway for yeasts and other organisms that lack PAL. Although it was proposed for fungi with some unclear interpretations as discussed above,⁴⁷ the functionality of the mandelate pathway was just recently demonstrated in an engineered bacteria.⁴⁸ We proposed for *H. vineae* that ARO10, SCS7, and DLD1/2 genes may participate in this pathway. These genes are known to produce proteins with a wide functional capacity, including reactions with mandelate and phenylpyruvate or phenyllactate.^{49,50} Also, as ARO10 and DLD1 proteins are very divergent between *H. vineae* and *S. cerevisiae* (see Table 1), this may explain *H. vineae*'s capacity for the synthesis of benzenoid compounds. The results presented here, the proven function of 4-hydroxybenzoate as an

intermediate of ubiquinone and the inability of both yeast species to synthesize cinnamic acids, are in agreement with the proposed pathway in Figure 7. Gene sequence divergence of these steps and the fact that these enzymes have also been shown to display activity on either phenylpyruvate- or *p*-hydroxyphenyl pyruvate-derived compounds^{51,52} clearly suggest a similar pathway for the formation of both alcohols. Following from the mandelate pathway yielding benzoate or *p*-hydroxybenzoate (or the corresponding aldehydes), BAL and *p*-HBAL can be formed by aryl alcohol dehydrogenases (Aad) or alcohol dehydrogenases (Adh).⁵³ The mandelate, β -oxidative, and nonoxidative pathways mainly shown in plants and their relation with aromatic amino acids and the four benzenoids analyzed in this work are shown in Figure 7. Further studies at the biochemical level will be necessary to prove some of the steps that are indicated here for yeast.

In summary, the level of production of BAL and *p*-HBAL by *H. vineae* during wine fermentation was 1–2 orders of magnitude higher than that by *S. cerevisiae* under the same fermentation conditions in a chemically defined medium.

Phe/Trp/*p*-ABA and ammonium/Tyr concentration changes in the synthetic grape medium composition showed an increase and a decrease, respectively, in the level of formation of BAL. Modulation of these YAN nutrients could decrease or increase up to 17 times the total BAL produced by *H. vineae*. Doubling the Phe concentration in the medium significantly increased the level of BAL formation in *H. vineae* (up to 1351 $\mu\text{g/L}$), the opposite behavior compared to that of *S. cerevisiae*. We propose that the formation of BAL in *H. vineae* could follow two alternative origins, from sugars through chorismate and from active Phe catabolism, both routes with phenylpyruvate as an intermediate and the subsequent formation of mandelate through ARO10 decarboxylase. Protein blast searches support these putative mechanisms that may allow this species to synthesize these alcohols. The absence of the PAL and TAL routes and the high level of BAL production by *H. vineae* make it an ideal eukaryotic model for improving our understanding of the synthesis of benzenoids, as compared to plants and fungi, where the coexistence with the PAL/TAL pathways makes the metabolic analysis more complex.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05442.

Additional information as described in the text (TXT)

Additional information as described in the text (TXT)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Sección Enología, Departamento de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay. E-mail: fcarrau@fq.edu.uy. Phone: (598) 29248194. Fax: (598) 29241906.

Funding

We thank the following agencies for the financial support given to this work: CSIC Group Project 656 and CSIC Productive Sector Project 602 of UdelaR, Uruguay, and the *H. vineae* FMV 6956 project (ANII financial support).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Emiliano Santos for drawing the yeast for the table of contents graphic.

ABBREVIATIONS USED

ANOVA, analysis of variance; SD, standard deviation; BAL, benzyl alcohol; BD, benzaldehyde; *p*-HBD, *p*-hydroxybenzaldehyde; *p*-HBAL, *p*-hydroxybenzyl alcohol; CDG, chemically defined grape medium; YAN, yeast assimilable nitrogen; PHE, phenylalanine; TYR, tyrosine; TRP, tryptophan; *p*-ABA, *p*-aminobenzoic acid; DAP, diammonium phosphate; ARO, genes requiring aromatic amino acids; ARO10, phenylpyruvate decarboxylase; ALD, aldehyde dehydrogenase; ABZ, *p*-ABA synthesis; ADH, alcohol dehydrogenase; ATF, alcohol acetyl transferase; BAT, branched chain amino acid transaminase; DLD, D-lactate dehydrogenase; GRE2, NADPH-dependent methylglyoxal reductase; HOM2, aspartic β -semialdehyde dehydrogenase; OYE2, NADPH oxidoreductase; PDC, pyruvate decarboxylase; PHA2, prephenate dehydratase; SCS7, sphingolipid α -hydroxylase; TYR, prephenate dehydrogenase; TRP, tryptophan synthesis; SFA1, bifunctional alcohol dehydrogenase and formaldehyde dehydrogenase

REFERENCES

- (1) Hjelmeland, A. K.; Ebeler, S. E. Glycosidically Bound Volatile Aroma Compounds in Grapes and Wine: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2015**, *66*, 1.
- (2) Robinson, A. L.; Boss, P. K.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. Origins of Grape and Wine Aroma. Part I. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *65*, 1–24.
- (3) Versini, G.; Carlin, S.; Nicolini, G.; Dellacassa, E.; Carrau, F. In *Updating of varietal aroma components in wines*; VII Latinamerican Congress of Enology and Viticulture, Mendoza, Argentina, 1999; Asociacion de Enologos de Argentina: Mendoza, Argentina, 1999; pp 325–349.
- (4) Sefton, M.; Francis, I.; Williams, P. The volatile composition of Chardonnay juices: a study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 359–370.
- (5) Francis, I. L.; Kassara, S.; Noble, A. C.; Williams, P. J. The contribution of glycoside precursors to Cabernet Sauvignon and Merlot aroma: Sensory and compositional studies. In *Chemistry of Wine Flavor*; Waterhouse, A., Ebeler, S., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1998; pp 13–30.
- (6) Boido, E.; Lloret, A.; Medina, K.; Fariña, L.; Carrau, F.; Versini, G.; Dellacassa, E. Aroma composition of *Vitis vinifera* cv. Tannat: The typical red wine from Uruguay. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5408–5413.
- (7) Fang, Y.; Qian, M. C. Quantification of selected aroma-active compounds in Pinot noir wines from different grape maturities. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8567–8573.
- (8) González-Barreiro, C.; Rial-Otero, R.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 202–218.
- (9) Widhalm, J. R.; Dudareva, N. A Familiar Ring to It: Biosynthesis of Plant Benzoic Acids. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 83–97.
- (10) Carrau, F. In *Native yeasts for low input winemaking: Searching for wine diversity and increased complexity*; International Wine Microbiology Symposium, Tenaya Lodge, CA, April 4–5, 2006; California State University: Tenaya Lodge, CA, 2006; pp 33–39.
- (11) Steensels, J.; Verstrepen, K. J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu. Rev. Microbiol.* **2014**, *68*, 61–80.
- (12) Fleet, G. H. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 979–995.
- (13) Carrau, F.; Gaggero, C.; Aguilar, P. S. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 148–154.
- (14) Steensels, J.; Snoek, T.; Meersman, E.; Nicolino, M. P.; Voordeckers, K.; Verstrepen, K. J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, *38*, 947–995.
- (15) Ciani, M.; Comitini, F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 25–32.
- (16) Ugliano, M.; Henschke, P. A. Yeasts and wine flavour. In *Wine chemistry and biochemistry*; Springer: Berlin, 2009; pp 313–392.
- (17) Medina, K.; Boido, E.; Fariña, L.; Gioia, O.; Gomez, M. E.; Barquet, M.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Carrau, F. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2513–2521.
- (18) Carrau, F.; Boido, E.; Gaggero, C.; Medina, K.; Fariña, L.; Disegna, E.; Dellacassa, E. *Vitis vinifera* Tannat, chemical characterization and functional properties. Ten years of research. In *Multidisciplinary Approaches on Food Science and Nutrition for the XXI Century*; Filip, R., Ed.; Transworld Research Network: Kerala, India, 2011; pp 53–71.
- (19) Orlova, I.; Marshall-Colón, A.; Schnepp, J.; Wood, B.; Varbanova, M.; Fridman, E.; Blakeslee, J. J.; Peer, W. A.; Murphy, A. S.; Rhodes, D.; Pichersky, E.; Dudareva, N. Reduction of benzenoid synthesis in petunia flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport. *Plant Cell* **2006**, *18*, 3458–3475.
- (20) Hyun, M. W.; Yun, Y. H.; Kim, J. Y.; Kim, S. H. Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology* **2011**, *39*, 257–265.
- (21) Bosse, A. K.; Fraatz, M. A.; Zorn, H. Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2952–2959.
- (22) Uchiyama, K.; Kawaguchi, K.; Tochikura, T.; Ogata, K. Metabolism of Aromatic Amino Acids in Microorganisms: Part III. Metabolism of Cinnamic Acid in *Rhodotorula*. *Agric. Biol. Chem.* **1969**, *33*, 755–763.
- (23) Delfini, C.; Gaia, P.; Bardi, L.; Mariscalco, G.; Contiero, M.; Pagliara, A. Production of benzaldehyde, benzyl alcohol and benzoic acid by yeasts and *Botrytis cinerea* isolated from grape musts and wines. *Vitis* **1991**, *30*, 253–263.
- (24) Meganathan, R. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *203*, 131–139.
- (25) Parson, W. W.; Rudney, H. The biosynthesis of the benzoquinone ring of ubiquinone from *p*-hydroxybenzaldehyde and *p*-hydroxybenzoic acid in rat kidney, *Azotobacter vinelandii*, and baker's yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, *51*, 444.
- (26) Goewert, R. *Studies on the biosynthesis of ubiquinone*; St. Louis University: St. Louis, MO, 1980.
- (27) Braus, G. H. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 349–370.
- (28) Burdock, G. A. *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2009.
- (29) Gambaro, A.; Boido, E.; Zlotejablko, A.; Medina, K.; Lloret, A.; Dellacassa, E.; Carrau, F. Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, *7*, 27–32.
- (30) Giorello, F. M.; Berná, L.; Greif, G.; Camesasca, L.; Salzman, V.; Medina, K.; Robello, C.; Gaggero, C.; Aguilar, P. S.; Carrau, F. Genome sequence of the native apiculate wine yeast *Hanseniaspora vineae* T02/19AF. *Genome Announcements* **2014**, *2* (3), e00530-14.
- (31) Gonzalez Techera, A.; Jubany, S.; Carrau, F.; Gaggero, C. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Letts. Appl. Microbiol.* **2001**, *33*, 71–75.
- (32) Barquet, M.; Martín, V.; Medina, K.; Pérez, G.; Carrau, F.; Gaggero, C. Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces* subspecies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 807–814.

- (33) Carrau, F.; Medina, K.; Farina, L.; Boido, E.; Henschke, P. A.; Dellacassa, E. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 1196–1207.
- (34) Henschke, P. A.; Jiranek, V. Yeast: Metabolism of nitrogen compounds. In *Wine Microbiology and Biotechnology*; Fleet, G. H., Ed.; Harwood Academic Publishers: Reading, U.K., 1993; pp 77–164.
- (35) Carrau, F.; Medina, K.; Fariña, L.; Boido, E.; Dellacassa, E. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *143*, 81–85.
- (36) Fariña, L.; Medina, K.; Urruty, M.; Boido, E.; Dellacassa, E.; Carrau, F. Redox effect on volatile compound formation in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* **2012**, *134*, 933–939.
- (37) Zimin, A. V.; Marçais, G.; Puiu, D.; Roberts, M.; Salzberg, S. L.; Yorke, J. A. The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 2669–2677.
- (38) Stanke, M.; Diekhans, M.; Baertsch, R.; Haussler, D. Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 637–644.
- (39) Li, L.; Stoeckert, C. J.; Roos, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2178–2189.
- (40) Boido, E.; Fariña, L.; Carrau, F.; Dellacassa, E.; Cozzolino, D. Characterization of glycosylated aroma compounds in Tannat grapes and feasibility of the near infrared spectroscopy application for their prediction. *Food Anal. Meth.* **2013**, *6*, 100–111.
- (41) Carrau, F. Characterization of yeast in relation to the ability to utilize nitrogen: Studies of aroma compounds. Ph.D. Thesis, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay, 2003.
- (42) Viana, F.; Belloch, C.; Vallés, S.; Manzanares, P. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*–*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 235–240.
- (43) Martin, V.; Boido, E.; Giorello, F.; Mas, A.; Dellacassa, E.; Carrau, F. Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains. *Yeast* **2016**, n/a.
- (44) Steyer, D.; Ambroset, C.; Brion, C.; Claudel, P.; Delobel, P.; Sanchez, I.; Erny, C.; Blondin, B.; Karst, F.; Legras, J.-L. QTL mapping of the production of wine aroma compounds by yeast. *BMC Genomics* **2012**, *13*, 573.
- (45) Siebert, M.; Bechthold, A.; Melzer, M.; May, U.; Berger, U.; Schroder, G.; Schroder, J.; Severin, K.; Heide, L. Ubiquinone biosynthesis: cloning of the genes coding for chorismate pyruvate-lyase and 4-hydroxybenzoate octaprenyl transferase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **1992**, *307*, 347–350.
- (46) Clarke, C. F. New advances in coenzyme Q biosynthesis. *Protoplasma* **2000**, *213*, 134–147.
- (47) Lapadatescu, C.; Giniès, C.; Le Quéré, J.-L.; Bonnarne, P. Novel Scheme for Biosynthesis of Aryl Metabolites from l-Phenylalanine in the Fungus *Bjerkandera adusta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1517–1522.
- (48) Pugh, S.; McKenna, R.; Halloum, I.; Nielsen, D. R. Engineering *Escherichia coli* for renewable benzyl alcohol production. *Metabolic Engineering Communications* **2015**, *2*, 39–45.
- (49) Smekal, O.; Yasin, M.; Fewson, C.; Reid, G.; Chapman, S. K. L-mandelate dehydrogenase from *Rhodotorula graminis*: comparisons with the L-lactate dehydrogenase (flavocytochrome b2) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **1993**, *290*, 103–107.
- (50) Gondry, M.; Dubois, J.; Terrier, M.; Lederer, F. The catalytic role of tyrosine 254 in flavocytochrome b2 (l-lactate dehydrogenase from baker's yeast). *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 4918–4927.
- (51) Sun, Z.; Ning, Y.; Liu, L.; Liu, Y.; Sun, B.; Jiang, W.; Yang, C.; Yang, S. Metabolic engineering of the L-phenylalanine pathway in *Escherichia coli* for the production of S- or R-mandelic acid. *Microb. Cell Fact.* **2011**, *10*, 71.
- (52) Heider, J.; Fuchs, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 577–596.
- (53) Dickinson, J. R.; Salgado, L. E. J.; Hewlins, M. J. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8028–8034.

ANEXOS

