

Alcoholes no vínicos para la mejora del desarrollo del velo de flor y de las características sensoriales de los vinos Finos de la D.O. Jerez-Xérès-Sherry

Antonio Florido-Barba¹, Gustavo Cordero-Bueso^{1,*} y Jesús Manuel Cantoral¹

¹Department of Biomedicine, Biotechnology and Public Health, University of Cádiz, Spain

Abstract. The wines produced in the Jerez-Xérès-Sherry Designation of Origin fall within the category of Fortified Wines, according to Regulation 1308/2013 of the European Parliament, which stipulates that they must be exclusively fortified with wine alcohol, with an acquired alcoholic strength between 95.0% and 96.0%. However, there are other alternative alcohols whose behavior is unknown but could be equally effective in the development of biological aging, with an impact on the final product quality and lower economic costs. This study examines the effect of using malt alcohols, grape pomace, agave, sugarcane, and cereal alcohols, as well as wine alcohols obtained through different distillation methods and at varying alcohol concentrations, for fortifying wines subjected to biological aging. The development of the "flor" yeast veil will be evaluated under each aging condition and isolated and characterized using molecular techniques. Additionally, the base wine fortified with the different alcohols will be monitored and analyzed both physicochemically and organoleptically.

1 Introducción

Los vinos de licor se definen como aquellos con un grado alcohólico adquirido comprendido entre 15 y 22% vol., obtenidos a partir de mosto de uva fermentado, vino, o una mezcla de ambos, tal y como establece el Reglamento de la Unión Europea 1308/2013. Dicha ley es complementada por el Reglamento UE 934/2019, el cual estipula en su Anexo III, apéndice 1, B, la lista de vinos de licor con denominación de origen protegida en cuya elaboración se añade alcohol de vino o alcohol de uvas pasas, y cuyo grado alcohólico adquirido es igual o superior al 95% vol. e igual o inferior al 96% vol., entre las cuales se encuentran la D.O. Jerez/Xérès/Sherry.

El origen de la práctica de fortificación de los vinos se remonta al siglo XVII con el fin de mantenerlos inalterados durante las largas travesías marítimas a los que eran sometidos para su posicionamiento en los puertos de destino. La aceptación de esta tipología de productos en mercados del norte Europa, propició su auge productivo y la diversificación de la tipología de vinos generosos. En la actualidad, países como Sudáfrica, Estados Unidos o Australia, producen vinos fortificados, si bien los principales productores siguen siendo los países originarios del sur de Europa, tales como Portugal (Oporto, Madeira, Setúbal), Francia (Rosellón) o España (Jerez).

Los vinos generosos acogidos a la Denominación de Origen Jerez/Xérès/Sherry presentan una personalidad diferenciadora motivado en gran medida por las circunstancias históricas combinadas a otros factores como

las condiciones edafoclimáticas, la arquitectura de sus bodegas de envejecimiento o la tipicidad de su sistema dinámico de envejecimiento, conocido comúnmente como *Criaderas* y *Soleras*.

La crianza biológica requiere del desarrollo de una película de levaduras en la superficie del vino conocida como velo de flor. Estudios fisiológicos y moleculares confirman que las levaduras de velo de flor difieren de las levaduras comunes de fermentación, mostrando rasgos heterogéneos caracterizados por la variabilidad del contenido de ADN y de sus perfiles cromosómicos [1, 2]. Aunque el encabezado inicial de los vinos Finos o Manzanillas se haya hecho al nivel que posibilita la crianza biológica 15,0-15,5% (v/v), el mantenimiento del velo de flor precisa del periódico aporte de nutrientes que supone refrescar la bota con vino más joven. Este biofilm está constituido principalmente por levaduras que confiere a estos vinos blancos sus apreciadas y particulares características sensoriales. Durante el proceso de envejecimiento biológico, ocurren cambios importantes en la composición del vino debido al metabolismo oxidativo de las levaduras de velo de flor, que utilizan y transforman compuestos como el etanol, glicerol, ácido acético y aminoácidos produciendo acetaldehído, 2,3-butandiol y acetoina [3].

Son múltiples los estudios que ponen de manifiesto la presencia mayoritaria de levaduras de flor del género *Saccharomyces* durante la crianza biológica [4, 5], si bien

*Corresponding Author: gustavo.cordero@uca.es

estas muestran una considerable variabilidad intraespecífica que ha sido determinada a través de técnicas de amplificación simultánea de determinados locis de microsatélites [6]. No obstante, la composición de este biofilm puede no ser exclusiva en determinadas escalas de envejecimiento de ciertos solerajes, pudiendo aparecer levaduras del género no-*Saccharomyces* [7] coexistiendo y aportando matices al vino que pueden ser determinantes en su calidad final. La aplicación de técnicas de biología molecular asociadas a PCR conjuntamente con técnicas innovadoras de Next Generation Sequencing (NGS), o de secuenciación en tiempo real con tecnología de nanoporos (MinION® Oxford Nanopore), pueden generar notables avances en el conocimiento a tiempo real del genoma de los microorganismos presentes durante la crianza biológica.

La legislación europea de referencia (Reglamento UE 2019/934 de 12 de marzo de 2019) y el Pliego de Condiciones de la D.O. restringe la tipología de alcohol apta para su uso para esta categoría de productos, autorizando para ello exclusivamente alcohol obtenido a partir de la destilación de vinos. Sin embargo, no se conoce la influencia del uso de alcoholes obtenidos de diversas materias primas en las poblaciones microbianas presentes en vinos envejecidos bajo crianza biológica (Finos), así como la repercusión que tiene sobre la generación de componentes volátiles y su influencia en el perfil sensorial de los mismos. Por ello, se propone el uso alternativo para la fortificación de vinos de alcoholes obtenidos de malta, orujo de uva, agave, caña de azúcar y cereal, así como alcoholes de vino obtenidos a través de diversas técnicas de destilación. Los resultados pueden mostrar alternativas al actual uso de alcohol vitivinícola con impacto en la calidad del producto y en el coste económico de este.

2 Material y métodos

2.1 Muestreo, aislamiento, identificación y caracterización de levaduras

En una primera etapa se ha llevado a cabo un estudio a nivel laboratorio, para el cual se tomaron muestras de las diferentes escalas de envejecimiento de tres solerajes de vinos bajo crianza biológica, nombrados Fino A, Fino C y Fino Viejo o Fino E. Estos solerajes se encontraban distribuidos en diferentes puntos equidistantes la bodega La Mezquita (Bodegas Fundador S.L.U.), un emplazamiento con más de 25.000 m² de superficie y que permite hacer una segregación en zonas con condiciones termohigrométricas diferentes.

Las muestras tomadas fueron transportadas al laboratorio en condiciones de esterilidad y refrigeración para evitar alteraciones en la población de levaduras y se sometieron a aislamiento siguiendo protocolos de microbiología clásica. Se empleó YPD (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% agar) y WL-Agar (Oxoid), como medios de cultivo, y se conservaron los aislamientos glicerinandolos (Glicerol 80%) y manteniéndolos a -8 °C [8].

Para la identificación de los aislados, se utilizaron técnicas de biología molecular PCR de la región ITS del ADN ribosómico [9], y en el caso concreto de levaduras *S.*

cerevisiae, se aplicó el análisis de microsatélites multiplex o SSR [10]. Las amplificaciones se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y a análisis de imágenes con cámara provista de transiluminador UV (BioRad). Estos amplificados también se secuenciaron siguiendo protocolos similares a los descritos en [6].

Una vez identificadas las diferentes levaduras, bien a nivel de especie o de cepa, se caracterizaron a nivel bioquímico [6].

2.2 Ensayos de fortificación con diferentes alcoholes a escala de laboratorio

Posteriormente, se llevó a cabo la fortificación de un vino base de la variedad Palomino Fino con 12,38% (v/v), con los diversos alcoholes hasta obtener una graduación alcohólica final de 15,5±0,3% (v/v). Los alcoholes empleados fueron alcohol rectificado de vino 95,9% (v/v) empleado como control, alcohol neutro de vino 96,3% (v/v), aguardiente de vino 77,0% (v/v), holandá alquitara de vino 65,0% (v/v), aguardiente de orujo de uva 64,5% (v/v), alcohol neutro de grano 96,3% (v/v), aguardiente de caña 68,0% (v/v), aguardiente de malta 68,0% (v/v) y aguardiente de agave -o tequila- 55,0% (v/v).

Los 8 vinos fortificados se añadieron a frascos de cultivo celular con cuello inclinado de 25 cm² (Sigma Aldrich), destinando 9 frascos a cada tipo de vino para inocular 3 de ellos con levaduras identificadas previamente como *S. cerevisiae*, 3 frascos con monocultivos no-*Saccharomyces* y los tres restantes con una mezcla 1:1 con cada tipo de levadura.

Se procedió a un seguimiento visual diario de la formación y evolución del biofilm formado hasta la cobertura total de la superficie del vino, registrándose datos de tiempo de formación, consistencia y morfología.

La distribución poblacional del velo de flor formado de los cultivos 1:1, se evaluó mediante las técnicas de biología molecular descritas con anterioridad, al final del proceso para comparar la competencia y supervivencia de ambas levaduras.

2.3 Ensayos de los diferentes alcoholes a escala industrial (en bodega)

Para las pruebas en bodega, se procedió inicialmente a la conservación a +4 °C en cámara refrigerada del volumen necesario del vino base 11,06% (v/v) de la vendimia 2021-2022. Dicho vino se caracterizó fisicoquímicamente, determinándose parámetros como SO₂L, SO₂T, pH, acidez total, acidez volátil, alcoholes superiores y ésteres. De igual forma, preliminarmente los 8 destilados utilizados para la fortificación de dicho vino base fueron analizados (grado alcohólico, alcoholes superiores y ésteres).

Se adquirieron 30 barriles de roble americano de 8 litros de volumen, reconstruidos a partir de barricas que habían contenido previamente vino Fino. Estas barricas se montaron en la misma andana donde se tomaron posteriormente levaduras de velo de flor para formar el inóculo del soleraje de Fino A, distribuidas la mitad a nivel de suelo (solera) y la otra mitad a la altura del tercer nivel. Todos los barriles fueron pre-*envinados* durante 8 semanas

con el mismo vino base alcoholizado con alcohol rectificado vínico a 18,0% vol., con el fin de eliminar aporte indeseado producido durante el proceso de fabricación de los barriles.

Paralelamente se procedió a la preparación del inóculo de velo de flor tomando muestras representativas del biofilm desarrollado en el vino fino en crianza en la andana en cuestión. Esta muestra de levaduras fue glicerizada (glicerol 80%) para caracterizar posteriormente la distribución poblacional del inóculo empleado. Estas muestras fueron obtenidas por medios estériles e inoculadas en laboratorio en vino base sin fortificar reforzado con Ácido Glutámico 10 mM y Glicerol al 1%, introducido en un baño de metacrilato especialmente diseñado para ello. Diariamente se controló la evolución morfológica del velo de flor en desarrollo hasta que se obtuvo un biofilm que cubriera toda la superficie del baño y con la consistencia correcta

Llegado el momento, se procedió al vaciado completo de los barriles, eliminando cualquier resto de líquido que pudiese quedar retenido en su interior. Simultáneamente, se preparó la fortificación del vino base con cada uno de los alcoholes a estudiar, adicionándose al vino la cantidad necesaria de cada destilado para generar 25 litros de cada tipo de fortificado a 15,0±0,3% (v/v). Con este volumen se llenaron tres barriles por cada tipo de vino hasta las 5/6 partes de la capacidad total de éstos (6,5 litros aproximadamente), y se inocularon con el velo de flor desarrollado en laboratorio. Como prueba alternativa para evaluar el comportamiento del velo de flor a menor graduación alcohólica, se destinaron tres de los barriles a contener vino base alcoholizado a 13,5±0,3% (v/v) con alcohol rectificado de vino 95,9% (v/v), las cuales fueron inoculadas con el mismo biofilm indicado con anterioridad (Fig. 1, Fig. 2)



Figura 1. Distribución en andana de las diferentes pruebas de fortificación de vinos.



Figura 2. Imagen de la disposición de los barriles de 8 litros en 1^{er} y 3^{er} nivel de la andana.

La evolución de la crianza biológica de cada una de las pruebas se llevará a cabo mensualmente, para lo cual se extraerá 250 mL de cada barril y se someterá a un

control morfológico y poblacional mediante las técnicas de biología molecular referidas con anterioridad, así como a un seguimiento analítico y organoléptico mediante paneles de cata homologados.

2.4 Análisis de los componentes volátiles

Para el análisis de alcoholes superiores y ésteres, se procedió a la destilación de cada uno de los tipos de vinos fortificados obtenidos en cada control periódico para, posteriormente, inyectar en un cromatógrafo de gases Agilent 7890B Series GC equipado con detector de Ionización de llamas e inyector Split/Splitless a fin de determinar acetaldehído, acetoína, lactato de etilo, succinato de etilo, 2-feniletanol, metanol, 1-propanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol.

3 Resultados

En los ensayos de laboratorio, de las 7 botas muestreadas se aislaron un total de 133 colonias, 58 pertenecientes al Fino A, 37 al Fino C y 28 al Fino E.

Tras el análisis de los ITS por PCR, se obtuvieron dos perfiles diferenciados (Fig. 3), un 60% de ellos con un tamaño de 500 pb, mientras que un 40% lo hacía a un tamaño próximo a los 850-860 pb.

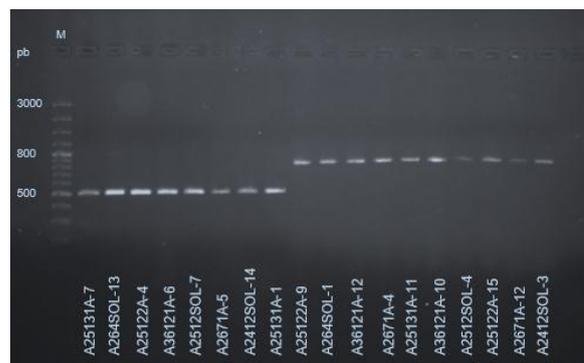


Figura 3. Ejemplo de electroforesis de algunas de las colonias aisladas. Las primeras ocho presentan un tamaño de 500 pb mientras que las siguientes diez, tienen un tamaño de 855 pb.

Posteriormente, tras la secuenciación se determinó que los dos perfiles electroforéticos obtenidos pertenecían a las especies *S. cerevisiae* y *P. kudriazevii*. En el caso de las colonias identificadas como como *S. cerevisiae* se amplificaron los loci de polimorfismos de microsatélites y se obtuvo sólo un patrón indicando que sólo existía una cepa entre las muestras de levadura aisladas.

Una vez inoculadas las dos especies de levaduras en los frascos de cultivos celulares se siguió la formación de los velos de flor mediante la observación visual de los triplicados de los vinos fortificados con los diferentes alcoholes (Fig. 4). Esto permitió determinar que aquellos vinos en los que había un monocultivo de *S. cerevisiae*, el velo de flor desarrollado era más débil y fino que en los de *P. kudriazevii*, sin embargo, esto últimos presentaban una velocidad de formación más lenta.



Figura 4. Velo de flor formado por la mezcla de *S. cerevisiae* + *P. kudriavzevii*.

Se observó que los velos con mezcla 1:1 se formaban más rápidamente, siendo más homogéneos y consistentes en cuanto morfología desde el día 20. En cuanto al tipo de vino, el fortificado con aguardiente de caña fue el que presentó mejor comportamiento en cuanto a formación de biofilm, presentando resultados desde el día 15.

Para evaluar el perfil aromático de los vinos Finos tras el proceso de crianza biológica se procedió a análisis por cromatografía de gases (Tabla 1) encontrándose diferencias en el perfil de sustancias volátiles en las pruebas realizadas. Los datos de valor de actividad práctico (OAV) y su comparación con los valores del umbral de olores teóricos (OTH) determinaron que el acetaldehído fue el componente mayoritariamente producido, a excepción del amílico 3-metil-1 butanol que fue el mayoritario para el vino fortificado con aguardiente de caña. Este hallazgo también se detectó en todos los casos con desarrollo del monocultivo de *P. kudriavzevii* en todas las bebidas fortificadas inoculadas con su monocultivo. Si se tiene en cuenta el perfil volátil del vino control fortificado con alcohol rectificado de vino, se puede llegar a la conclusión que el caso del vino encabezado con aguardiente de caña es el que presenta una mayor similitud en la generación de alcoholes superiores, acetales, y aldehídos, y con ello, en lo que respecta a los componentes volátiles del vino.

En cuanto a las pruebas realizadas a nivel industrial, el inóculo de velo de flor fue obtenido a partir de la extracción de biofilm de 25 botas aleatorias de la zona de la bodega donde se iban a desarrollar las pruebas, llevando a cabo previamente un control sensorial de éstas para verificar la ausencia de defectos, sometándose a un seguimiento visual a diario y detectándose el momento óptimo para proceder a la injercción en bodega al undécimo día de desarrollo controlado (Fig. 5).



Figura 5. Estadío final del pre-inóculo de velo de flor previo a su uso en bodega.

Se estudió la evolución del vino empleado en para la preparación del pre-inóculo de levadura de velo de flor, analizándose en el momento de realizar la inoculación de las levaduras extraídas de la bodega y a los 11 días de comenzada dicha prueba. Los resultados analíticos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos analíticos vino base en diferentes estadios evolutivos del pre-injerto de velo de flor.

	VINO BASE ANTES DE INOCULAR	VINO BASE A LOS 11 DÍAS DE INOCULAR
Grado Alcohólico (% vol)	11,06	2,66
SO ₂ L (mg/L)	5,1	3,9
SO ₂ T (mg/L)	53,8	52,9
pH	3,03	3,05
AT (g TH ₂ /L)	5,98	5,82
AV (g AcH/L)	0,26	0,15
Acetaldehído (mg/L)	53,6	65,5
Metanol (mg/L)	74,5	18,5
Propanol-2 (mg/L)	0,5	1,2
N-Propanol (mg/L)	16,9	7,4
Acetato de Etilo (mg/L)	25,6	1,5
I-Butanol (mg/L)	41,8	4,2
N-Butanol (mg/L)	1,4	0,0
Dietilacetil (mg/L)	0,0	0,0
3-metil-1-butanol (mg/L)	161,5	20,4
2-metil-1-butanol (mg/L)	39,5	4,2
I-Amílicos (mg/L)	201,0	24,6

Los resultados analíticos encontrados denotan una pérdida notable de grado alcohólico en los 11 primeros días de desarrollo del biofilm. Este comportamiento puede ser atribuible a la enérgica actividad del velo de flor desarrollado en la superficie del vino base, fomentado por el aporte de Ácido Glutámico adicionado como activador metabólico de estas levaduras. De igual manera, se puede apreciar un notable incremento de los niveles de

Tabla 1. Datos analíticos para la evaluación del perfil aromático de las pruebas de fortificación con diferentes alcoholes e inoculación con monocultivos de *Saccharomyces*, no-*Saccharomyces* y consorcio de ambas.

Compuesto (mg/L)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. kudriavzevii</i>	Mezcla 1:1	F	Sig.	OTH (mg/L)	OAV		
Alcohol Rectificado de Vino (C)							i	ii	iii
Acetaldehído ¹	786.2 ± 1.70 ^a	86.1 ± 0.28 ^c	702.4 ± 3.68 ^b	53215	<0.0001	10	78.62	8.61	70.24
Acetoína ²	2.1 ± 0.14 ^{ab}	2.4 ^a	2 ^b	13	0.03	30	0.07	0.08	0.07
Lactato de etilo ^{1,5}	6.35 ± 0.07 ^b	49.1 ± 0.14 ^a	5.25 ± 0.07 ^a	125053	<0.0001	100	0.06	0.49	0.05
Succinato de dietilo ^{1,4}	19.7 ± 0.71 ^b	27.55 ± 0.07 ^a	20.95 ± 0.21 ^b	194.1	0.0007	100	0.2	0.2755	0.21
2-Feniletanol ¹	24.55 ± 0.92 ^b	29.2 ± 0.14 ^a	25.95 ± 0.07 ^b	39.25	0.0071	10	2.49	2.92	2.6
Metanol ^{2,3}	72 ± 0.14 ^a	73.4 ± 0.14 ^a	68.55 ± 0.78 ^b	57.96	0.004	668	0.11	0.1	0.1
1-propanol ^{1,2}	44.8 ± 0.14 ^c	26.9 ± 0.14 ^a	39.85 ± 0.21 ^b	6031	<0.0001	830	0.05	0.03	0.04
Acetato de etilo ^{1,2,3}	73.9 ^b	39.5 ^a	23.05 ± 0.07 ^c	102957	<0.0001	7.5	3.19	5.27	3.07
Isobutanol ²	57.95 ± 0.21 ^b	46.15 ± 0.21 ^b	41.05 ± 0.07 ^c	4746	<0.0001	40	1.45	1.15	0.6
2-Pentanol ¹	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3-Metil-1-butanol ²	203.35 ± 0.07 ^b	202.15 ^c	223.15 ± 0.21 ^a	8784	<0.0001	65	3.13	3.11	3.43
2-Metil-1-butanol ²	47.75 ± 0.35 ^a	45.95 ± 0.21 ^b	48 ^a	44.15	0.006	65	0.73	0.7	0.74
Aguardiente de Orujo									
Acetaldehído ¹	325.15 ± 1.63 ^b	83.2 ± 0.14 ^c	343.1 ^a	52519	<0.0001	10	32.52	8.32	34.31
Acetoína ²	2.1 ^a	2.2 ^a	2.1 ^b	-	-	30	0.07	0.07	0.07
Lactato de etilo ^{1,5}	33.3 ± 1.41 ^b	38.9 ± 0.14 ^a	34.3 ^b	26.5	0.0124	100	1.11	0.39	0.34
Succinato de dietilo ^{1,4}	11.25 ± 0.07 ^b	21.3 ^a	11.25 ± 0.07 ^b	20200	<0.0001	100	0.11	0.21	0.11
2-Feniletanol ¹	23.15 ± 0.21 ^b	27.25 ± 0.07 ^a	23.3 ^b	6241	<0.0001	10	2.31	2.73	2.33
Metanol ^{2,3}	78.65 ± 0.07 ^a	78.178 ± 0.14 ^b	78.65 ± 0.07 ^a	20.17	0.0182	668	0.12	0.12	0.12
1-propanol ^{1,2}	41.55 ± 0.07 ^a	21.55 ± 0.07 ^b	41.5 ^a	79800	<0.0001	830	0.05	0.03	0.05
Acetato de etilo ^{1,2,3}	60.25 ± 0.21 ^b	40.25 ± 0.21 ^b	60.25 ± 0.21 ^a	5926	<0.0001	7.5	8.03	5.37	8.03
Isobutanol ²	65.75 ± 0.64 ^a	36.25 ± 0.07 ^b	66.25 ± 0.07 ^a	4266	<0.0001	40	1.64	0.9	1.66
2-Pentanol ¹	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3-Metil-1-butanol ²	219.9 ± 0.71 ^a	199.75 ± 0.49 ^b	220.4 ^a	1118	<0.0001	65	3.38	3.07	3.39
2-Metil-1-butanol ²	49.65 ± 0.07 ^a	39.65 ± 0.07 ^b	49.7 ^a	20100	<0.0001	65	0.76	0.61	0.76
Aguardiente de Vino									
Acetaldehído ¹	355.35 ± 0.35 ^a	85.35 ± 0.35 ^c	340.25 ± 0.35 ^b	368272	<0.0001	10	35.54	8.34	34.03
Acetoína ²	1.85 ± 0.07 ^b	2.1 ^a	1.7 ^b	49	0.0051	30	0.06	0.07	0.06
Lactato de etilo ^{1,5}	41.7 ± 0.28 ^a	29.65 ± 0.21 ^c	39.7 ± 0.28 ^b	1221	<0.0001	100	0.42	0.3	0.4
Succinato de dietilo ^{1,4}	20.2 ± 0.57 ^c	30.3 ± 0.14 ^a	22.15 ± 0.07 ^b	499.2	0.0002	100	0.2	0.3	0.22
2-Feniletanol ¹	23.9 ± 0.14 ^b	30.4 ^a	20.85 ± 0.21 ^c	2196	<0.0001	10	2.39	3.04	2.09
Metanol ^{2,3}	78.5 ± 0.28 ^b	78.3 ^b	80.75 ± 0.35 ^a	54.17	0.0044	668	0.12	0.12	0.12
1-propanol ^{1,2}	41.75 ± 0.07 ^a	21.7 ± 0.14 ^b	41.75 ± 0.07 ^a	26500	<0.0001	830	0.05	0.03	0.05
Acetato de etilo ^{1,2,3}	61.2 ^a	41.1 ± 0.14 ^b	61.2 ^a	40401	<0.0001	7.5	8.16	5.48	8.16
Isobutanol ²	66.05 ± 0.07 ^a	36.15 ± 0.07 ^b	60.1 ± 0.42 ^b	7911	<0.0001	40	1.65	0.9	1.5
2-Pentanol ¹	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3-Metil-1-butanol ²	220.55 ± 0.07 ^a	200.55 ± 0.07 ^a	211.25 ± 0.21 ^b	10927	<0.0001	65	3.39	3.09	3.25
2-Metil-1-butanol ²	49.3 ± 0.28	41.25 ± 0.07	49.55 ± 0.64	273	0.0004	65	0.76	0.63	0.76
Tequila									
Acetaldehído ¹	551.8 ± 1.98 ^b	83 ± 1.41 ^c	584.05 ± 0.07 ^a	79640	<0.0001	10	55.18	8.3	58.4
Acetoína ²	1.9 ± 0.14 ^a	1.4 ^b	2.1 ± 0.14 ^a	19.5	0.0191	30	0.06	0.05	0.07
Lactato de etilo ^{1,5}	26.15 ± 0.21 ^b	29.6 ± 0.14 ^a	25.95 ± 0.07 ^b	360.9	0.0003	100	0.26	0.3	0.26
Succinato de dietilo ^{1,4}	28.6 ± 0.14 ^b	11.35 ± 0.07 ^c	29.95 ± 0.35 ^a	4302	<0.0001	100	0.29	0.11	0.3
2-Feniletanol ¹	27.1 ± 0.14 ^b	17.5 ± 0.28 ^c	31.4 ^a	3039	<0.0001	10	2.71	1.75	3.14
Metanol ^{2,3}	71.9 ^b	74.05 ± 0.49 ^a	75.2 ± 0.28 ^a	51.8	0.0047	668	0.1	0.11	0.11
1-propanol ^{1,2}	37.4 ± 0.14 ^a	27.65 ± 0.07 ^b	33.1 ± 0.28 ^b	1364	<0.0001	830	0.05	0.03	0.04
Acetato de etilo ^{1,2,3}	38.7 ± 0.28 ^c	42.05 ± 0.78 ^b	51.45 ± 0.07 ^a	379.9	0.0002	7.5	5.16	5.60	6.86
Isobutanol ²	52.6 ± 0.28 ^b	45.55 ± 0.35 ^c	62.3 ± 0.14 ^a	1886	<0.0001	40	1.31	1.14	1.6
2-Pentanol ¹	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3-Metil-1-butanol ²	219.1 ± 0.14 ^b	198.6 ± 0.14 ^c	222 ± 0.28 ^a	8135	<0.0001	65	3.37	3.06	3.41
2-Metil-1-butanol ²	50.95 ± 0.07 ^a	45.15 ± 0.35 ^b	51.95 ± 0.35 ^a	317.2	0.0003	65	0.78	0.7	0.8

F = prueba de Fisher; Sig, análisis ANOVA unidireccional, prueba de comparación de medias (Tukey). Detección del umbral de olores por cromatografía en vinos finos teórico (OTH) [17], valor de actividad de olores práctico (OAV) calculado con la división de la concentración práctica obtenida entre la teórica de cada compuesto.

acetaldehído motivado por el propio metabolismo de etanol de la levaduras de velo de flor y una reducción sustancial del resto de alcoholes superiores, previsiblemente motivados por procesos de esterificación, aldehidificación y acetilificación en los que intervienen estas levaduras. Si se tiene en consideración la evolución química detectada en las pruebas señaladas con anterioridad a nivel laboratorio, el comportamiento del acetaldehído sí que es coincidente, si bien la evolución del 3-metil-2-butanol sigue un comportamiento inverso.

El control visual de las pruebas realizadas en bodega empleando barriles de roble americano de 8 litros, los cuales fueron llenados por triplicado con vinos fortificados con los diversos alcoholes objeto de estudio, denotaron un comportamiento similar en cuanto a la formación del biofilm, si bien se encuentra un desarrollo ligeramente más acelerado en el caso de los vinos fortificados con alcohol neutro de grano, aguardiente columna y holanda alquitara, y sobre todo en el caso del vino alcoholizado con alcohol rectificado de vino hasta 13,5±0,3% (v/v) , lo cual puede justificarse por el menor estrés al que es sometida la levadura en un medio con graduación alcohólica inferior (Tabla 3).

Tabla 3. Control visual realizado a los 12 días el inóculo para evaluar el desarrollo velo de flor en diferentes vinos fortificados. Resultados similares para pruebas colocadas a nivel de *solera* y a nivel de *2ª criadera*.

CONTROL 12 DÍAS			
TIPO ALCOHOL	ACRÓNIMO	VELOCIDAD DE DESARROLLO	MORFOLOGÍA
Alcohol Rectificado de Vino	ARV	Baja	Islotes dispersos
Alcohol Neutro de Grano	ANG	Media	Islotes agrupados
Alcohol Neutro de Vino	ANV	Baja	Islotes agrupados
Aguardiente de Orujo	ADO	Baja	Islotes dispersos
Aguardiente de Vino	AV	Baja	Islotes dispersos
Aguardiente de Malta	AM	Baja	Islotes dispersos
Aguardiente de Caña	AC	Media	Islotes agrupados
Holanda de Vino	HA	Media	Islotes agrupados
Tequila	TA	Baja	Islotes dispersos
Alcohol Rectificado de Vino 13,5% (v/v)	ARV135	Alta	Velo débil

Si se analiza comparativamente el desarrollo del velo de flor en los barriles colocados a nivel de suelo (equivalente a *solera*) y los barriles colocados en 3^{er} nivel (equivalente a *2ª criadera*), encontramos una evolución similar por tipología de vino fortificado para sendas alturas de envejecimiento. Las imágenes mostradas en la Fig. 6 y la Fig. 7, reflejan la situación de la evolución del velo de flor a los 12 días de inoculados los vinos fortificados para ambas disposiciones.

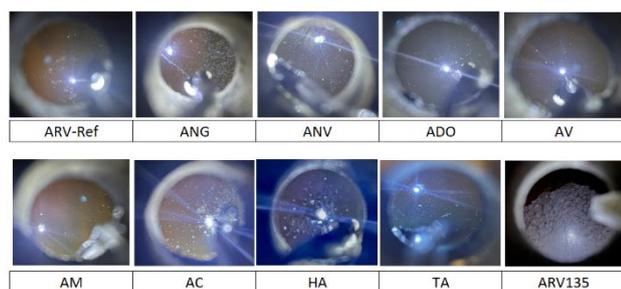


Figura 6. Imágenes control visual desarrollo velo de flor distintos vinos fortificados. Nivel bajo (*solera*).

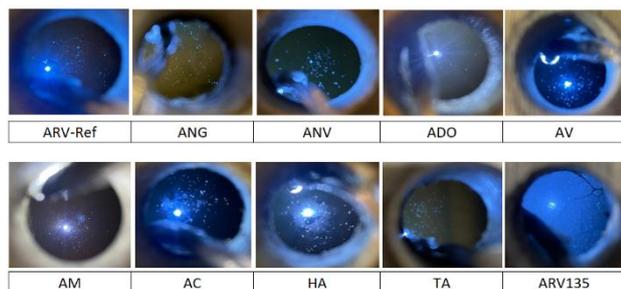


Figura 7. Imágenes control visual desarrollo velo de flor distintos vinos fortificados. 3^{er} nivel (2^a criadera).

Se puede apreciar que, en el momento del estudio, la morfología del velo de flor es casi idéntica para todas las pruebas desarrolladas, presentando indicios de desarrollo de biofilm a modo de islotes más o menos dispersos, exceptuando el caso del vino fortificado a 13,5% (v/v), en el que ya se puede apreciar un velo de consistencia baja que ya llega a cubrir prácticamente toda la superficie del vino. Este hecho es coincidente para las pruebas realizadas a nivel de suelo y las colocadas en 3er nivel de altura.

El primer control analítico de los vinos fortificados llevado a cabo a los 12 días de inoculados, ofrece los resultados recogidos en la Tabla 4.

El aumento del contenido de acetaldehído es patente en todas las pruebas realizadas, a excepción del vino fortificado con Aguardiente de Malta, en el que cabe considerar un arranque ralentizado de la actividad del velo de flor, lo cual también se ve refrendado por la no reducción del grado alcohólico. Para el caso de los vinos fortificados con Aguardiente de Vino y, especialmente, con Alcohol Neutro de Grano, el incremento de acetaldehído es muy considerable, lo cual también puede asociarse a la subida sustancial en la concentración de dietilacetil ya que éste se produce por la condensación de dos moléculas de acetaldehído y posterior combinación con el etanol.

En lo referente a la evolución de los alcoholes superiores, es destacable el incremento del 2-metil-1 butanol y 3-metil-1butanol (I-amílicos), lo cual está directamente relacionado con el comienzo de la actividad de la levadura de velo de flor a través de la síntesis de aminoácidos [11]. El resto de parámetros cromatográficos no denotan cambios sustanciales, al menos en la etapa inicial de crianza biológica estudiada.

Tal y como se puede observar atendiendo al consumo de alcohol, generación de acetaldehído, dietilacetil,

I-amílicos, y comportamiento de ésteres etílicos, se puede avanzar que el vino fortificado con Alcohol Neutro de Vino es el que muestra una evolución similar al vino de referencia, si bien, estos resultados deberán ser testados con más tiempo de evolución para todas las pruebas realizadas a fin de encontrar una alternativa viable al Alcohol Rectificado de Vino en cuanto a influencia sobre el velo de flor y la calidad del vino final.

3 Discusión y Conclusiones

Los vinos envejecidos bajo crianza biológica suponen un entorno propicio para la coexistencia de gran diversidad de microorganismos, como levaduras, bacterias u hongos [12]. Los pensamientos clásicos que argumentaban la presencia de monocultivos del género *Saccharomyces* en el desarrollo del velo de flor en vinos de Jerez, han sido refutados reiteradamente por ciertos autores [6, 13, 14, 15], los cuales aluden a un desarrollo colaborativo entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* que puede contribuir a entender la complejidad analítica y organoléptica de esta tipología de vinos, en contra de los pensamientos clásicos que asignaban la categoría de microorganismos contaminantes a éstos últimos cuando aparecían en el desarrollo del biofilm. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el desarrollo de velo de flor de monocultivos, ya sea de *Saccharomyces* como de no-*Saccharomyces*, tienen una velocidad de formación menor que en el caso en que cohabiten sinérgicamente ambos géneros de levaduras, así como una morfología más homogénea y mayor consistencia.

Como es conocido, el perfil sensorial y analítico de un vino es el resultado de la agregación de múltiples factores aportados a lo largo de su evolución [16]. En el caso de los vinos envejecidos biológicamente, esta etapa es determinante en las características que apreciará el consumidor final, tales como color, aromas o sabores [17]. La generación de componentes volátiles responsables en gran medida de estos dos últimos, ha sido verificado a través de las pruebas de laboratorio llevadas a cabo, donde *S. cerevisiae* tiene una mayor capacidad de generación de alcoholes superiores que *P. kudriavzevii*, si bien en medios en los que se daba la coexistencia de ambas especies, dichos compuestos se veían favorecidos, especialmente en el vino base fortificado con Aguardiente de Caña, mostrando un perfil aromático y volátil similar al vino fortificado con alcohol rectificado de vino empleado como referencia.

Las pruebas en desarrollo a nivel de bodega van a permitir disponer de otra variable para perseguir la optimización en la elaboración de un vino fino, como es el caso del empleo de alcoholes no vínicos en la fortificación de los vinos bases. Son sobradamente conocidas las características sensoriales y analíticas de alcoholes tan dispares en cuanto origen de la materia prima y proceso de elaboración, como pueden ser alcoholes de agave (tequila), orujo, caña o malta. Es previsible que esta diferenciación aporte peculiaridades totalmente notables al vino fortificado en el que se emplee, además de suministrar fuentes de carbono alternativas a las propias del alcohol de vino. Este último factor puede tomar extraordinaria

importancia en el caso de que las levaduras asimilen estos nutrientes mediante rutas metabólicas alternativas a las habituales, con la consiguiente formación de compuestos que pueden llegar a aportar tipicidad y matices de calidad al vino elaborado mediante crianza biológica.

Adicionalmente, las pruebas por las cuales se evalúa el comportamiento del velo de flor en vinos fortificados a

baja graduación alcohólica, así como la repercusión en sus características analíticas y sensoriales, nos permitirá establecer un punto de partida para atender la demanda de un sector emergente de consumidores que solicitan vinos con contenido de alcohol moderado, aunque manteniendo los sistemas de elaboración tradicionales tan apreciados.

Tabla 4. Resultados analíticos pruebas en bodega de diferentes vinos fortificados obtenidos en el momento de la inoculación y a los 12 días. VB-ARV: Vino base fortificado con Alcohol Rectificado de Vino 95,9% (v/v) hasta 15,0±0,3% v/v. VB-ANG: Vino base fortificado con Alcohol Neutro de Grano 96,3% (v/v) hasta 15,0±0,3% v/v. VB-ANV: Vino base fortificado con Alcohol Neutro de Vino 96,3% (v/v) hasta 15,0±0,3% v/v. VB-ADO: Vino base fortificado con Aguardiente de Orujo 64,5% (v/v) hasta 15,0±0,3% v/v. VB-AV: Vino base fortificado con Aguardiente de Vino 77,0% (v/v) hasta 15,0±0,3% v/v. VB-AM: Vino base fortificado con Aguardiente de Malta 68,0% (v/v) hasta 15,0±0,3% v/v. VB-AC: Vino base fortificado con Aguardiente de Caña 68,0% (v/v) hasta 15,0±0,3% v/v. VB-HA: Vino base fortificado con Holanda Alquitará de Vino 65,0% (v/v) hasta 15,0±0,3% v/v. VB-TA: Vino base fortificado con Tequila 55,0% (v/v) hasta 15,0±0,3% v/v. VB-ARV135: Vino base fortificado con Alcohol Rectificado de Vino 95,9% (v/v) hasta 13,5±0,3% v/v.

	VB-ARV		VB-ANG		VB-ANV		VB-ADO		VB-AV	
	INICIO	12 DÍAS								
Grado Alcohólico (% vol.)	15,0	14,8	14,9	14,8	15,0	14,9	14,9	14,8	15,3	15,1
Acetaldehído (mg/L)	53,3	169,9	53,0	373,2	47,2	123,2	161,5	207,6	59,4	237,3
Metanol (mg/L)	69,7	71,0	70,1	69,9	63,3	76,6	190,0	184,9	112,4	105,7
Propanol-2 (mg/L)	0,9	1,1	0,5	0,8	1,0	1,3	0,5	0,9	0,6	0,9
N-Propanol (mg/L)	16,5	17,0	16,4	17,0	14,6	17,4	30,9	31,8	33,1	32,1
Acetato de Etilo (mg/L)	24,8	25,1	25,0	29,2	21,3	27,2	83,1	79,9	27,7	41,2
I-Butanol (mg/L)	39,9	40,3	40,5	40,3	36,5	41,6	64,5	65,1	58,8	57,0
N-Butanol (mg/L)	1,3	0,9	1,0	1,2	0,8	1,1	2,2	1,6	2,1	1,0
Dietilacetil (mg/L)	4,3	28,1	3,6	79,9	3,1	21,8	23,3	37,5	6,0	50,1
3-metil-1-butanol (mg/L)	155,3	157,1	156,1	158,7	141,5	160,9	222,8	226,5	236,8	229,4
2-metil-1-butanol (mg/L)	37,9	39,7	38,1	39,9	34,7	40,3	57,7	59,6	56,6	56,7
I-Amilicos (mg/L)	193,2	196,8	194,2	198,6	176,2	201,2	280,5	286,1	293,4	286,1
C6-Etilo (mg/L)	0,6	0,7	1,0	0,5	0,8	1,0	2,9	1,4	1,1	0,9
Acetoína (mg/L)	2,1	0,4	1,8	0,2	1,8	0,6	7,6	1,2	2,0	1,0
Lactato de Etilo (mg/L)	31,1	26,4	41,3	29,4	39,9	43,1	53,3	31,1	48,2	28,2
Hexanol (mg/L)	1,9	1,7	2,7	1,8	2,3	2,7	8,9	6,1	4,5	2,8
C8-Etilo (mg/L)	0,8	0,5	1,2	0,4	0,1	1,0	0,2	1,5	0,3	0,9
Furfuro (mg/L)	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,6	0,9	1,1	0,5	0,7
Benzaldehído (mg/L)	0,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,2	0,3	0,1
2,3-Butanodiol D- L- (mg/L)	10,6	5,5	8,0	6,8	8,9	8,4	15,1	6,2	13,0	5,4
2,3-Butanodiol MESO (mg/L)	0,9	1,0	0,9	1,3	1,0	1,7	1,2	1,1	1,0	1,0
C10-Etilo (mg/L)	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	1,9	0,5	0,5	0,3
Succinato de Dietilo (mg/L)	8,0	3,3	8,8	3,5	5,3	5,5	8,8	4,4	7,4	3,8
C12-Etilo (mg/L)	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
2-Feniletanol (mg/L)	36,1	23,9	40,6	27,1	40,9	39,6	54,9	26,1	44,3	22,7
C14-Etilo (mg/L)	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1

	VB-AM		VB-AC		VB-HA		VB-TA		VB-ARV135	
	INICIO	12 DÍAS	INICIO	12 DÍAS						
Grado Alcohólico (% vol.)	14,9	14,9	15,1	15,0	15,1	15,0	15,3	14,9	13,4	13,3
Acetaldehído (mg/L)	54,1	51,1	55,5	98,9	55,3	80,0	51,4	203,6	50,4	72,5
Metanol (mg/L)	71,5	46,1	69,0	71,9	101,5	100,4	144,0	121,1	65,9	72,3
Propanol-2 (mg/L)	0,5	0,4	0,8	0,8	0,5	0,7	0,7	0,8	0,7	0,8
N-Propanol (mg/L)	39,4	23,8	49,2	45,6	33,7	32,1	34,7	30,0	16,2	17,5
Acetato de Etilo (mg/L)	33,7	22,1	27,6	39,4	34,1	43,5	21,2	29,7	22,5	24,5
I-Butanol (mg/L)	79,2	48,1	70,4	65,9	57,5	56,1	77,4	66,0	39,6	40,9
N-Butanol (mg/L)	1,9	1,3	1,7	1,2	0,8	0,9	1,3	1,5	1,2	1,1
Dietilacetil (mg/L)	5,1	7,8	4,3	16,7	4,3	12,1	3,9	40,5	3,3	8,8
3-metil-1-butanol (mg/L)	229,2	143,8	197,5	189,8	241,0	234,5	229,3	197,7	153,7	159,2
2-metil-1-butanol (mg/L)	66,2	43,0	47,8	46,4	53,5	54,8	58,4	51,0	37,4	40,0
I-Amilicos (mg/L)	295,4	186,8	245,3	236,2	294,5	289,3	287,7	248,7	191,1	199,2
C6-Etilo (mg/L)	1,2	0,7	0,8	0,7	1,3	1,5	1,2	0,8	1,1	0,8
Acetoína (mg/L)	1,0	0,7	2,1	0,4	1,9	1,8	1,8	0,4	2,2	1,3
Lactato de Etilo (mg/L)	37,0	19,2	34,7	20,9	51,3	47,1	47,5	23,4	55,0	27,8
Hexanol (mg/L)	2,4	1,3	2,1	1,6	4,4	4,0	2,6	1,6	3,1	1,9
C8-Etilo (mg/L)	2,4	0,8	0,1	0,9	0,2	1,6	0,4	0,9	0,1	0,7
Furfuro (mg/L)	2,0	1,2	0,4	0,6	2,1	2,2	0,6	0,2	0,5	0,6
Benzaldehído (mg/L)	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1
2,3-Butanodiol D- L- (mg/L)	7,7	4,3	14,5	6,0	9,5	10,1	12,8	6,3	11,4	6,8
2,3-Butanodiol MESO (mg/L)	0,7	0,9	0,9	0,3	0,9	0,5	0,9	0,3	1,2	1,3
C10-Etilo (mg/L)	1,8	0,6	0,6	1,0	0,7	0,5	0,7	0,5	0,3	0,3
Succinato de Dietilo (mg/L)	7,5	2,5	5,3	3,1	4,5	6,1	6,3	4,3	5,5	3,4
C12-Etilo (mg/L)	1,0	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
2-Feniletanol (mg/L)	41,4	19,9	38,8	18,7	44,1	37,3	53,0	23,6	56,1	25,2
C14-Etilo (mg/L)	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1

References

1. M. A. Pozo-Bayón, V. Moreno-Arribas, "Sherry wines", *Advances in Food and Nutrition Research* **63**, 17-40 (2011) doi: 10.1016/B978-0-12-384927-4.00002-6
2. J.L. Legras, C. Erny, C. Charpentier, "Population structure and comparative genome hybridization of European flor yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome", *PLoS ONE* **9**(10) (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0108089
3. J. Moreno-García, J. Mauricio, J. Moreno, "Rutas metabólicas importantes en la formación del velo de flor", *Enología 2015: Innovación vitivinícola. GENIOL Grupos de Investigación Enológica*, 118-121 (2015)
4. P. Martínez, L.P. Rodríguez, T. Benitez, "Factors which Affect Velum Formation by Flor Yeasts Isolated from Sherry Wine". *Syst. Appl. Microbiol* **20**, 154–157 (1997) [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80060-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80060-4)
5. J.J. Mesa, J.J. Infante, L. Rebordinos, J.A. Sanchez, J.M. Cantoral, "Influence of the Yeast Genotypes on Enological Characteristics of Sherry Wines". *Am. J. Enol. Vitic.* **51**, 15–21 (1999)
6. M. Ruiz-Muñoz, G. Cordero-Bueso, F. Benítez-Trujillo, S. Martínez, F. Pérez, J.M. Cantoral, "Rethinking about flor yeast diversity and its dynamic in the “criaderas and soleras” biological aging system". *Food Microbiology* **92**, 103553 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103553>
7. M. Ruiz-Muñoz, M. Hernández-Fernández, G. Cordero-Bueso, S. Martínez-Verdugo, F. Pérez, J.M. Cantoral, "Non-*Saccharomyces* Are Also Forming the Veil of Flor in Sherry Wines". *Fermentation* **8**(9), 456 (2022) <https://doi.org/10.3390/fermentation8090456> doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040
8. G. Cordero-Bueso, T. Arroyo, A. Serrano, "Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grapeberries", *International Journal of Food Microbiology* **145**(1), 132-139 (2011) doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040
9. J. Sabaté, J. Cano, B. Esteve-Zarzoso, "Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA", *Microbiological Research* **157**(4), 267-274 (2002) doi: 10.1078/0944-5013-00163
10. E. Vaudano, E. Garcia-Moruno, "Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis", *Food Microbiology* **25**(1), 56-64 (2008) doi: 10.1016/j.fm.2007.08.001
11. S. Cherviak, V. Gerzhikova, N. Anikina, N. Gnilomedova, A. Vesytova, "Studying the biochemical transformations in sherry wines subjected to biological aging" *E3S Web of Conferences* **222**, 03004 (2020)
12. G. Cordero-Bueso, M. Ruiz-Muñoz, M. González-Moreno, S. Chirino, M.C. Bernal-Grande, J.M. Cantoral, "The microbial diversity of Sherry wines". *Fermentation* **4**, 19 (2018) <https://doi.org/10.3390/fermentation4010019>
13. H. Alexandre, "Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* — Their ecology, genetics, and metabolism" *International Journal of Food Microbiology* **167**(2), 269–275 (2013) doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.021>
14. B. Esteve-Zarzoso, M.T. Fernández-Espinar, A. Querol, "Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing". *Antonie van Leeuwenhoek*. **85**, 151-158 (2004)
15. S. Zara, I. Mannazzu, "Detection, quantification, and identification of yeast in winemaking". P. Romano y M. Ciani (eds.), *Yeasts in the Production of Wine* (81-102). Springer Nature (2019)
16. M.L. Morales, M. Ochoa, M. Valdivia, C. Úbeda, S. Romero-Sanchez, J.I. Ibeas, E. Valero, "Volatile metabolites produced by different flor yeast strains during wine biological ageing". *Food Research International* **128**, 108771 (2019) <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108771>
17. R. Escribano, L. González-Arenzana, J. Portu, "Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones", *Journal of applied Microbiology* **124**(6), 1521-1531 (2018)
18. L. Zea, L. Moyano, J. Moreno, M. Medina, "Aroma series as fingerprints for biological ageing in fino sherry-type wines". *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 2319–2326 (2007)