



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Selección de levaduras no-Saccharomyces para la elaboración de vinos tintos de calidad
Autor/es
Rocío Escribano Viana
Director/es
Ana Rosa Gutiérrez Viguera y Lucía González Arenzana
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico

Tesis presentada como compendio de publicaciones. La edición en abierto de la misma NO incluye las partes afectadas por cesión de derechos



Selección de levaduras no-Saccharomyces para la elaboración de vinos tintos de calidad, tesis doctoral de Rocío Escribano Viana, dirigida por Ana Rosa Gutiérrez Viguera y Lucía González Arenzana (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

Tesis doctoral

Selección de levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de vinos tintos de calidad



Rocío Escribano Viana
2021



Instituto de
Ciencias de la
Vid y del Vino



Universidad de la Rioja

Departamento de Agricultura y Alimentación

Las abajo firmantes, la Dra. Ana Rosa Gutiérrez Viguera y la Dra. Lucía González Arenzana, investigadoras del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja, Universidad de La Rioja, CSIC).

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Selección de levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de vinos tintos de calidad” ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Servicio de Investigación Vitivinícola del Gobierno de La Rioja por Rocío Escribano Viana, y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con Mención Internacional.

Para que conste y tenga los efectos oportunos, firmamos el presente Certificado.

Logroño, 8 de octubre de 2021

GUTIERREZ GUTIERREZ
VIGUERA VIGUERA ANA
ANA ROSA ROSA - DNI
- DNI 16528703Y
2021.10.08
17:28:05
16528703Y +02'00'

GONZALEZ Firmado
ARENZANA digitalmente por
LUCIA - GONZALEZ
ARENZANA LUCIA
- 16587648W
16587648W Fecha: 2021.10.13
19:40:45 +02'00'

Fdo.: Dra. Ana Rosa Gutiérrez Viguera

Fdo.: Dra. Lucía González Arenzana

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de muchas personas, que de una u otra manera han participado en su desarrollo. Esta pequeña sección de la Tesis va dedicada a todas ellas.

El comienzo de esta andadura coincidió con mi inmersión en el mundo de la microbiología enológica en el Servicio de Investigación Vitivinícola del Gobierno de La Rioja, lo que tengo que agradecer enormemente a Pilar, que fue mi tutora durante esos primeros años, guiándome en todo momento.

Tengo mucho que agradecer también a mis directoras de Tesis, Ana Rosa y Lucía, que me han mostrado gran parte de los secretos que esconde este pequeño y a la vez enorme mundo de los microorganismos.

Me gustaría dar las gracias a Patri por todos esos momentos en el laboratorio y por ser una gran compañera. A Rosa, por su energía positiva cada día y por la ayuda que me ha ofrecido todo este tiempo. A Juana e Isabel, por estar dispuestas a resolver cualquier duda que pudiera surgir. Trabajar en este grupo ha sido una gran oportunidad por la que siempre estaré agradecida.

A todas las compañeras y compañeros con los que he compartido despacho durante estos años, gracias por estar ahí para lo que hiciera falta y por hacer mucho más divertidas las jornadas de trabajo. Se merecen una mención especial Laura, Carmen y Sara por todos los ratos que hemos pasado juntas y porque han hecho que hasta los lunes parecieran viernes.

Gracias a mis compañeras del laboratorio por la enorme labor que realizan cada vendimia analizando los mostos y los vinos que se elaboran durante los ensayos. Tampoco quiero olvidarme de todo el personal de campo y de bodega, sin los cuales no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo.

A Vittorio Capozzi, por darme la oportunidad de ampliar mis fronteras trabajando fuera de España, y a todos los integrantes del Dipartimento di Scienze Agrarie degli Alimenti e dell'Ambiente, en especial a Carmen Berbegal, que no pudo ofrecerme una mejor acogida, haciéndome sentir como en casa.

Gracias a mi familia por estar siempre a mi lado, especialmente a mi madre y a mi hermano, que tanto me han ayudado a recargar pilas para seguir adelante. Por último, quiero dar las gracias a Marco, por ser mi gran apoyo y por enseñarme a 'simplificar' para que todo resulte más fácil.

Presentación

Este trabajo se acoge a la modalidad de Tesis por compendio de publicaciones e incluye cinco de los artículos escritos y publicados durante el desarrollo del proyecto de investigación. La información sobre los artículos se muestra de forma detallada a continuación.

1. Título: Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts.

Autores: Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Gutiérrez, A. R., Santamaría, P.

Año de publicación: 2017

Revista, número (volumen), páginas: *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1555–1564.

DOI (Digital Object Identifier: Identificador Digital de un Objeto): <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2587-7>

Índice impacto Scimago Journal Rank (SJR) en 2017: 0.689

Posición de la revista en el área Food Science: 93/332

Cuartil: 2

Número de citas (Scopus): 32 (consultado el 6/09/2021)

2. Título: Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones.

Autores: Escribano, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A. R.

Año de publicación: 2018.

Revista, número (volumen), páginas: *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1521–1531.

DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13735>

Índice impacto Journal Citation Reports (JCR) 2018: 2.683

Posición de la revista en el área “Biotechnology & Applied Microbiology”: 67/162

Cuartil: 2

Número de citas (Scopus): 45 (consultado el 6/09/2021)

3. Título: Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts.

Autores: Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A. R.

Año de publicación: 2018.

Revista, número (volumen), páginas: *Food Research International*, 112(March), 17–24.

DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.06.018>

Índice impacto JCR 2018: 3.579

Posición de la revista en el área “Food Science & Technology”: 27/135

Cuartil: 1

Número de citas (Scopus): 36 (consultado el 6/09/2021)

4. Título: Effect of the sequential inoculation of non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* on the anthocyanins and stilbenes composition of Tempranillo wines.

Autores: Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., Gutiérrez, A. R., González-Arenzana, L.

Año de publicación: 2019.

Revista, número (volumen), páginas: *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 1–10.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00773>

Índice impacto JCR 2019: 4.236

Posición de la revista en el área “Microbiology”: 34/136

Cuartil: 1

Número de citas (Scopus): 15 (consultado el 6/09/2021)

5. Título: Do non-*Saccharomyces* yeasts work equally with three different red grape varieties?

Autores: Escribano-Viana, R., Garijo, P., López-Alfaro, I., Rosa, L., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., González Arenzana, L.

Año de publicación: 2020.

Revista, número (volumen), páginas: *Fermentation*, 6, 3.

DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation6010003>

Índice impacto SJR 2020: 0.873

Posición de la revista en el área “Food Science”: 63/332

Cuartil: 1

Número de citas (Scopus): 1 (consultado el 6/09/2021)

Índice

Lista de abreviaturas	I
Resumen/Summary	1
CAPÍTULO I	
Introducción	7
1. La elaboración del vino tinto	9
2. Compuestos sintetizados por las levaduras durante la FA	13
3. Dinámica y evolución de las poblaciones de levaduras en la FA.....	17
4. Tendencias actuales en la industria enológica.....	19
5. Contribución de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> a la calidad de los vinos	21
6. Selección de levaduras para vinificación	25
CAPÍTULO II	
Antecedentes	31
CAPÍTULO III	
Objetivos	37
CAPÍTULO IV	
Publicaciones.....	41
1. Screening of enzymatic activities within different enological non- <i>Saccharomyces</i> yeasts.....	43
2. Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non- <i>Saccharomyces</i> species and clones	57
3. Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non- <i>Saccharomyces</i> / <i>Saccharomyces</i> yeasts	73
4. Effect of the sequential inoculation of non- <i>Saccharomyces</i> / <i>Saccharomyces</i> on the anthocyanins and stilbenes composition of Tempranillo wines	85
5. Do non- <i>Saccharomyces</i> yeasts work equally with three different red grape varieties?.....	99
CAPÍTULO V	
Resultados y Discusión	119
1. Esquema del proceso de selección	121
2. Etapas iniciales de selección	121

3. Proceso de selección de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> para ser destinadas a inóculo enológico	124
3.1. Estudio de las actividades enzimáticas de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> ...	124
3.2. Comportamiento fermentativo de las distintas levaduras no- <i>Saccharomyces</i> ..	129
3.3. Efecto de la inoculación secuencial no- <i>Saccharomyces/S. cerevisiae</i> en la composición fisicoquímica y aromática de los vinos tintos	134
3.4. Estudio del efecto de la inoculación secuencial no- <i>Saccharomyces/S. cerevisiae</i> en la composición de antocianos y estilbenos de los vinos tintos.....	136
3.5. Influencia de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> seleccionadas en las características de los vinos de tres variedades de uva diferentes	139
3.6. Selección final del inóculo de levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	142
CAPÍTULO VI	
Conclusiones/Conclusions	145
Bibliografía	151

Lista de abreviaturas

A	Arilamidasa
A.	<i>Aureobasidium</i>
ADC	Análisis discriminante canónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
B.	<i>Brettanomyces</i> spp.
C.	<i>Candida</i> spp.
céls.	células
CGA	Chloramphenicol Glucose Agar
Cr.	<i>Cryptococcus</i> spp.
D.	<i>Debaryomyces</i> spp.
D.O.Ca.	Denominación de Origen Calificada
DOI	Digital Object Identifier (Identificador Digital de un Objeto)
FA	Fermentación alcohólica
FML	Fermentación maloláctica
g	gramos
H.	<i>Hanseniopsis</i> spp.
HCDC	Hidroxicinamato descarboxilasa
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector
IC	Índice de color
ICVV	Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino
IPT	Índice de Polifenoles Totales
JCR	Journal Citation Reports
Kl.	<i>Kluyveromyces</i> spp.
l	litros

M. *Metschnikowia* spp.

ml mililitros

NFA Nitrógeno Fácilmente Asimilable

ng nanogramos

O. *Oenococcus* spp.

P. *Pichia* spp.

PCR Polymerase Chain Reaction

R. *Rhodotorula* spp.

RAPD Random Amplification of Polymorphic DNA

S. *Saccharomyces* spp.

SIV Servicio de Investigación Vitivinícola

SJR Scimago Journal Rank

Sp. *Sporidiobolus* spp.

SR Sulfito reductasa

T. *Torulaspora* spp.

W. *Williopsis* spp.

Z. *Zygosaccharomyces* spp.

Resumen/Summary

Resumen

La fermentación alcohólica espontánea del vino es un proceso microbiano resultante de la acción secuencial de diferentes levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*. El uso de cultivos seleccionados de *Saccharomyces (S.) cerevisiae* en las fermentaciones es una práctica extendida en la industria enológica que ha contribuido a un mejor control de la vinificación, pero también a una simplificación de las comunidades microbianas que participan en las fermentaciones, dando lugar a una pérdida de complejidad y cierta estandarización de los vinos.

Para evitar la homogeneidad de los vinos inoculados con cepas comerciales de *S. cerevisiae*, se ha propuesto el empleo de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae*. Esta práctica permite obtener algunas de las ventajas de las fermentaciones espontáneas como una mayor complejidad organoléptica, pero con un mayor control del proceso.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de levaduras no-*Saccharomyces* para su empleo como inóculos en la elaboración de vinos tintos de calidad. El estudio comenzó con 103 aislados procedentes de diferentes ecosistemas enológicos de la Denominación de Origen Calificada (D.O.Ca.) Rioja. En una etapa inicial se llevó a cabo la caracterización clonal y el estudio de la resistencia al SO₂ de las cepas, así como la actividad killer y las posibles interacciones con otras levaduras presentes en las vinificaciones, como *S. cerevisiae* y *Brettanomyces (B.) bruxellensis*. El siguiente paso fue la caracterización de las cepas en base a su capacidad para producir enzimas de interés enológico. Se evaluaron 13 actividades enzimáticas relacionadas con el aroma, el color y la clarificación de los vinos. Los resultados mostraron una gran variabilidad intraespecífica, lo que puso de manifiesto la importancia de la selección a nivel clonal.

En la siguiente etapa del proceso de selección se estudió el comportamiento enológico y la producción de compuestos aromáticos de las cepas en fermentaciones puras. Se detectaron diferencias significativas en los parámetros analizados entre las distintas especies de levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas, mientras que en el caso de las cepas pertenecientes a la misma especie se encontraron diferencias en un menor número de parámetros. Sin embargo, entre ellos se encontraban algunos con gran impacto en la calidad del vino, como la acidez volátil. Los resultados también mostraron que ninguna de las cepas estudiadas fue capaz de completar la fermentación, lo que indicó que su empleo en vinificación requería la inoculación secuencial con *S. cerevisiae*. Por esta razón, en los siguientes ensayos se evaluaron las características de las cepas en inoculaciones secuenciales con *S. cerevisiae*. Además, se detectó que dos de las cepas de *Lachancea (L.) thermotolerans* crecían junto con *Torulasporea (T.) delbrueckii*, por lo que se decidió incluir esta combinación como inóculo mixto en los siguientes ensayos.

El proceso de selección continuó con el estudio de la evolución de la composición aromática durante la fermentación alcohólica, así como el efecto en la composición de antocianos y estilbenos de los vinos elaborados con inoculaciones secuenciales no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*. Los controles de implantación de las levaduras no-*Saccharomyces* inoculadas mostraron que las cepas de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* y los inóculos mixtos constituidos por esas mismas especies permanecieron durante más tiempo en el medio, manteniendo la proporción inicial durante los primeros días de la fermentación. Al final de la misma, solo los vinos inoculados con *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* se diferenciaron de los demás por su perfil aromático. En cuanto a los análisis relacionados con el color, los resultados mostraron que los vinos fermentados secuencialmente con *Metschnikowia (M.) pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *Zygosaccharomyces (Z.) bailii* y *Candida (C.) zeylanoides* presentaban niveles más elevados de antocianos totales y valores más altos del índice de polifenoles totales (IPT) respecto a los encontrados en los vinos elaborados solo con *S. cerevisiae*.

En la última etapa del proceso de selección se evaluó el comportamiento enológico de las levaduras seleccionadas en vinos de tres variedades de uva: Tempranillo, Garnacha y Graciano. La mayor parte de las diferencias debidas a la estrategia de inoculación se detectaron en la variedad Tempranillo. Los cambios producidos en las características del vino podrían deberse a la mayor implantación y permanencia de los inóculos durante la fermentación en esta variedad. Las cepas de no-*Saccharomyces* empleadas en los inóculos habían sido originalmente aisladas en Tempranillo, lo que podría explicar su preadaptación a las características del mosto.

A lo largo del proceso de selección, el inóculo formado por *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* había mostrado una mayor capacidad para implantarse en el medio durante la fermentación, permaneciendo durante un tiempo más prolongado en los depósitos. Por otro lado, la combinación de las características de las dos cepas que forman el inóculo permitió la liberación de compuestos de interés para la calidad del vino como lactato de etilo, glicerol o ácido láctico. Asimismo, los vinos elaborados con esta combinación de levaduras mostraron mayores contenidos de vitisina B, relevante para la estabilidad del color. Este inóculo presentaba además actividades enzimáticas interesantes para mejorar el color y el aroma del vino.

Considerando sus características positivas para la calidad de los vinos, y dado que no existe en el mercado un inóculo compuesto por estas especies de levaduras no-*Saccharomyces*, el inóculo mixto de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* podría tener potencial para ser comercializado, por lo que es el que finalmente ha sido seleccionado en este estudio.

Summary

The spontaneous alcoholic fermentation of wine is a microbial process resulting from the sequential action of different non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. The use of selected cultures of *S. cerevisiae* in fermentations is a widespread practice in the oenological industry that has contributed to better control of vinifications, but also to a simplification of the microbial communities that participate in fermentations, leading to a loss of complexity and certain standardization of the wines.

To avoid the homogeneity of the wines inoculated with commercial strains of *S. cerevisiae*, the use of selected non-*Saccharomyces* yeasts in sequential fermentations with *S. cerevisiae* has been proposed. This practice allows obtaining some of the advantages of spontaneous fermentations such as greater organoleptic complexity, but with greater control of the process.

The aim of this work was to select non-*Saccharomyces* yeast strains for its use as inoculums in the production of quality red wines. The study began with 103 isolates from different oenological ecosystems of the D.O.Ca. Rioja. In an initial stage, the clonal characterization and the study of the SO₂ resistance of the strains was carried out, as well as the killer activity and possible interactions with other yeasts present in vinifications, such as *S. cerevisiae* and *B. bruxellensis*. The next step was the characterization of the strains based on their ability to produce enzymes of oenological interest. 13 enzymatic activities related to the aroma and colour and clarification of the wines were evaluated. The results showed high intraspecific variability, which highlighted the importance of selection at clonal level.

In the next stage of the selection process, the oenological behaviour and the production of aromatic compounds of the strains in pure fermentations were studied. Significant differences were detected in the parameters analysed between the different non-*Saccharomyces* yeast species studied. In the case of the strains belonging to the same species, differences were found in a smaller number of parameters. However, among them were included parameters with a great impact on the quality of the wine, such as volatile acidity. The results also showed that none of the studied strains was able to complete the fermentation, which indicated that their use in winemaking required sequential inoculation with *S. cerevisiae*. For this reason, the following tests evaluated the characteristics of the strains in sequential inoculations with *S. cerevisiae*. Moreover, it was detected that two of the *L. thermotolerans* strains grew together with *T. delbrueckii*, so it was decided to include this combination as a mixed inoculum in the following assays.

In the next stage of the process, the evolution of the aromatic composition was evaluated, as well as the effect on the composition of anthocyanins and stilbenes of the wines sequentially fermented with non-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*. The implantation controls of the inoculated

non-*Saccharomyces* yeasts showed that *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* strains and the mixed inocula constituted by those same species remained for a longer time in the medium. In addition, it was observed that the mixed inocula maintained the initial proportions during the first days of fermentation. At the end of the fermentation, only the wines inoculated with *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans*, yeasts that remained the longest in the medium, differed from the others due to their aromatic profile. Regarding the analyses related to colour, the results showed that the wines fermented sequentially with *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *Z. bailii* and *C. zeylanoides* presented higher levels of total anthocyanins and higher values of the total polyphenol index (TPI) with respect to those found in wines made only with *S. cerevisiae*.

In the last stage of the selection process, the oenological behaviour of the selected yeasts was evaluated in wines of three grape varieties: Tempranillo, Grenache and Graciano. Most of the differences due to the inoculation strategy were detected in Tempranillo variety. The changes produced in the characteristics of the wine could be due to the greater implantation and permanence of the inocula during the fermentation in this variety. The non-*Saccharomyces* strains used in the inocula had been originally isolated in Tempranillo, which explains their pre-adaptation to the must characteristics.

Throughout the selection process, the inoculum formed by *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* had shown a greater capacity to implant in the medium during fermentation, remaining for a longer time in the tanks. On the other hand, the combination of the characteristics of the two strains that constitute the inoculum allowed the release of compounds of interest for the quality of wine such as ethyl lactate, glycerol or lactic acid. Likewise, the wines made with this combination of yeasts showed higher contents of vitisin B, relevant for color stability. This inoculum also showed interesting enzymatic activities to improve the colour and aroma of wine.

Considering its positive characteristics for the quality of the wines, and since there is no inoculum composed of these non-*Saccharomyces* yeast species on the market, the mixed inoculum of *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* could have the potential to be commercialized, which is why it is the one that has finally been selected in this study.

Capítulo I

Introducción

1. La elaboración del vino tinto

El proceso de elaboración del vino conlleva diferentes operaciones y transformaciones fisicoquímicas, bioquímicas y microbiológicas que determinan las características del producto final (Figura 1). El proceso comienza con la recolección de las uvas en el viñedo, estableciendo la fecha de vendimia en función tanto de la acumulación de azúcares en la baya como del tipo de vino que se desee elaborar. Para la elaboración de vinos tintos es recomendable mantener el desarrollo de la baya hasta obtener una mayor concentración de compuestos fenólicos extraíbles (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud-Funel, 2007). Una vez en la bodega, el primer paso es el despalillado y estrujado de las uvas. El despalillado o eliminación de los raspones de la vendimia evita que se transfieran al vino sustancias como el potasio, que da lugar a una reducción de la acidez, o los taninos agresivos que afectan negativamente a la percepción organoléptica del vino (Hashizume & Samuta, 1997; Pascual et al., 2016). Por otro lado, el estrujado de las uvas facilita el proceso de maceración, ya que provoca un aumento de las superficies de contacto entre el mosto y las partes sólidas, mejorando la disolución de los polifenoles (Hidalgo, 2011).

En general, en el proceso de elaboración de los vinos tintos, una vez se encuba la vendimia estrujada y despalillada, se incluye una etapa de maceración en la que tiene lugar la extracción de los compuestos de las partes sólidas de la uva que pasan al mosto. La maceración es responsable de gran parte de las características organolépticas que diferencian los vinos tintos de los vinos blancos. Los compuestos se extraen principalmente de los hollejos, las pepitas y eventualmente de los raspones. Las fracciones sólidas de la vendimia aportan al mosto compuestos fenólicos, además de diversas sustancias aromáticas, compuestos nitrogenados, polisacáridos y minerales (Hidalgo, 2011). Los compuestos fenólicos son responsables del color del vino, de su estabilidad durante la crianza y de algunas propiedades gustativas como la astringencia o el amargor (He et al., 2012a, 2012b; Ma et al., 2014).

La fermentación alcohólica (FA) del mosto es un proceso microbiológico complejo en el que se encuentran presentes diversos microorganismos como son levaduras y hongos filamentosos, bacterias lácticas y acéticas, siendo las levaduras las que desempeñan el papel central en dicha etapa fermentativa (Aranda, Matallana y del Olmo, 2005). Una vez iniciada la FA, las condiciones de anaerobiosis generan una presión selectiva, inhibiendo el desarrollo de los microorganismos aerobios como los hongos y las bacterias acéticas. A medida que el proceso avanza, los nutrientes se van consumiendo a favor de una producción de etanol, lo que provoca la inhibición de las especies de microorganismos sensibles a este compuesto (Henschke, 1997).

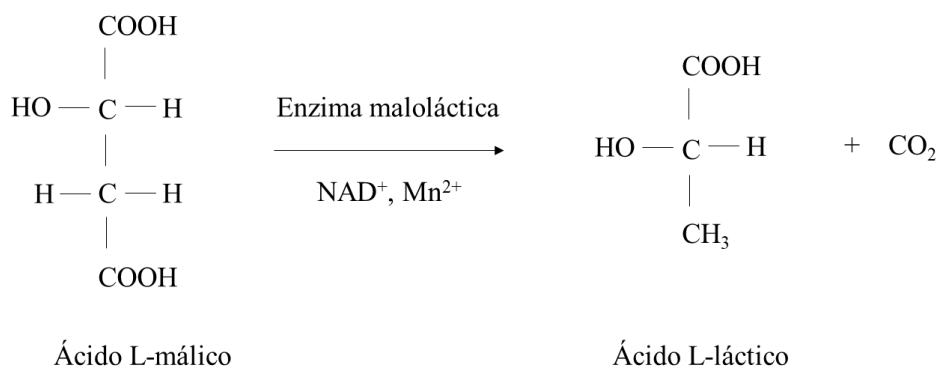
La FA consiste en la transformación de los azúcares presentes en el mosto en etanol, CO₂ y otros subproductos, llevada a cabo por levaduras, especialmente por *S. cerevisiae*. Las

reacciones que tienen lugar durante FA pueden expresarse mediante la siguiente ecuación global simplificada:



Durante la FA, además de la transformación de los azúcares en etanol y CO₂, tienen lugar muchas otras reacciones bioquímicas, químicas y fisicoquímicas que permiten la transformación del mosto en vino. Además del etanol, se producen compuestos como alcoholes superiores, ésteres, glicerol, ácido succínico, diacetilo o acetoína, entre otros (Zamora, 2009). Al mismo tiempo, algunos compuestos de la uva se transforman como consecuencia del metabolismo de las levaduras. La producción de todas estas sustancias justifica la complejidad organoléptica del vino. Se considera que la FA ha concluido cuando la concentración de azúcares residuales en el mosto se encuentra por debajo de 4 g/l, lo que suele ocurrir transcurridos 7-10 días en vinos tintos (Pizarro, Vargas & Agosin, 2007).

La segunda etapa de transformación es la fermentación maloláctica (FML), en la cual las bacterias lácticas, principalmente de la especie *Oenococcus (O.) oeni*, causan la desacidificación biológica del vino transformando el ácido L-málico (dicarboxílico) en ácido L-láctico (monocarboxílico) (Lonvaud-Funel, 2010):



Además de dar lugar a un ligero incremento en el pH, la FML tiene una influencia importante en la calidad del vino, aportando estabilidad microbiana e influyendo positivamente en el perfil aromático y gustativo del vino, siempre y cuando se lleve a cabo bajo condiciones completamente controladas (Bartowsky, 2005; Davis, Wibowo, Eschenbruch, Lee, & Fleet, 1985).

Generalmente, el inicio de la FML tiene lugar tras el prensado, una vez finalizada la FA y al igual que ésta, puede ser espontánea, por la acción de las bacterias lácticas indígenas, o bien ser inducida mediante la inoculación de un cultivo iniciador. El retraso o la prolongación de la FML aumenta el riesgo de desarrollo de microorganismos alterantes como bacterias lácticas de

los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus* o levaduras del género *Brettanomyces*, que pueden afectar negativamente a la calidad del vino debido a la producción de aminas biógenas o compuestos como el 4-etil-fenol (Abrahamse & Bartowsky, 2012). Con el fin de aumentar la eficiencia de la FML se ha propuesto la inoculación de cultivos iniciadores de bacterias lácticas en co-inoculación con las levaduras o durante la FA. Algunos autores defienden que esta estrategia de inoculación implica mejores condiciones para el desarrollo de las bacterias lácticas, ya que al inicio de la fermentación existe una mayor disponibilidad de nutrientes y hay una menor presencia de inhibidores producidos por las levaduras como el etanol, lo que permitiría la aclimatación de las bacterias lácticas a medida que aumenta la concentración de etanol durante la FA, así como la reducción del tiempo total de la vinificación (Azzolini, Tosi, Vagnoli, Krieger, & Zapparoli, 2010; Zapparoli, Tosi, Azzolini, Vagnoli, & Krieger, 2009). No obstante, existe cierto reparo en cuanto a la aplicación de esta estrategia de inoculación debido al riesgo del incremento de la acidez volátil y al posible impacto negativo en el desarrollo de las levaduras, lo que podría dar lugar a fermentaciones lentas o paradas de fermentación (Alexandre, Costello, Remize, Guzzo, & Guilloux-Benatier, 2004; Semon, Edwards, Forsyth, & Dinn, 2001).

En algunos vinos, tras las etapas de fermentación tiene lugar un periodo de envejecimiento en barrica durante el cual se producen una serie de transformaciones de carácter físico, químico e incluso biológico que provocan una serie de cambios y mejoras en sus características sensoriales, además de originar una estabilización natural de los vinos. Durante la crianza tienen lugar diversos fenómenos como el intercambio de oxígeno a través de los poros de la madera o durante los trasiegos, la precipitación de diferentes sustancias del vino, la formación de ésteres, la transformación de los compuestos polifenólicos o la cesión de sustancias procedentes de la madera de la barrica (Hidalgo, 2011).

El siguiente paso en el proceso de elaboración es la clarificación y estabilización del vino. Las operaciones de clarificación eliminan las partículas coloidales y materias en suspensión presentes en el vino que provocan turbidez. En este proceso se eliminan proteínas inestables y otras macromoléculas que posteriormente pueden desnaturalizarse y flocular, provocando turbideces o precipitados en el vino (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015). El objetivo de la estabilización es asegurar que el vino mantenga sus propiedades hasta el momento de su consumo (Vernhet, 2018).

La etapa final en la elaboración del vino es el embotellado. En algunos casos, tras el embotellado tiene lugar un periodo de envejecimiento en botella en el cual los vinos evolucionan en ausencia de oxígeno hasta que alcanzan su momento óptimo de consumo. Entre los principales cambios que se producen durante la crianza en botella se encuentra la disminución de la

astringencia y el amargor, la mejora del aroma y el incremento en la estabilidad del color (Echave, Barral, Fraga-Corral, Prieto & Simal-Gandara, 2021).

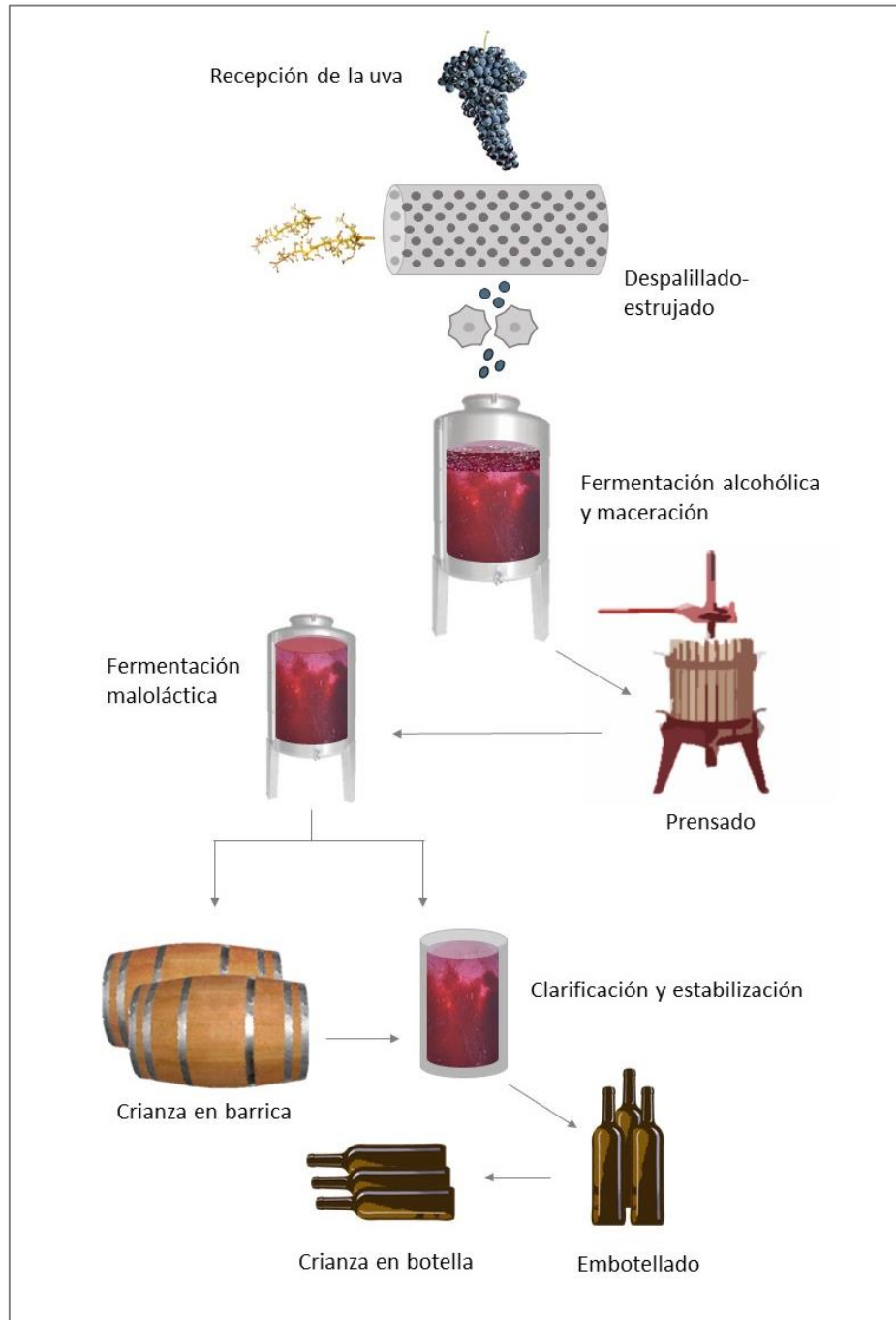


Figura 1: Esquema general del proceso de elaboración de vinos tintos. Elaboración propia.

2. Compuestos sintetizados por las levaduras durante la FA

Los compuestos sintetizados en el transcurso de la FA tienen un papel esencial en las características organolépticas del vino. Además del etanol, producto principal del metabolismo de las levaduras, durante la fermentación se liberan otros muchos compuestos que contribuyen a la complejidad aromática y gustativa del producto final (Figura 2).

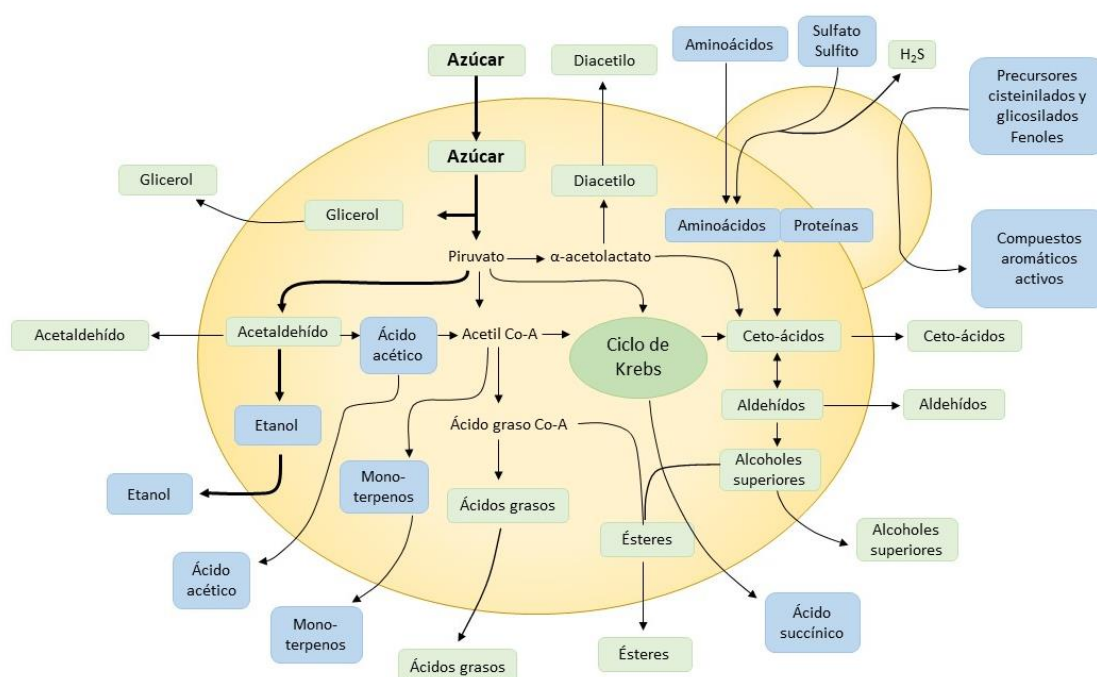


Figura 2: Compuestos formados por las levaduras durante la vinificación a partir del metabolismo de los azúcares, los aminoácidos y el azufre. (Adaptado de Swiegers, Bartowsky, Henschke, & Pretorius, 2005).

Los principales grupos de compuestos derivados del metabolismo de los carbohidratos por parte de las levaduras y que contribuyen al aroma del vino son los ácidos grasos volátiles, los alcoholes superiores, los ésteres y, en menor grado, los aldehydos (Rapp & Versini, 1995). Otros compuestos, como los fenoles volátiles o los compuestos azufrados destacan por su influencia negativa en el aroma, mientras que el glicerol lo hace por mejorar las características táctiles y gustativas del vino.

El glicerol es cuantitativamente uno de los productos más importantes de la FA, tras el etanol y el CO₂. Se trata de un compuesto no volátil, sin impacto en el aroma, pero que contribuye a la calidad del vino aportando dulzor y cuerpo (Noble & Bursick, 1984). Las levaduras forman el glicerol mediante la fermentación gliceropirúvica al inicio del proceso fermentativo. La fermentación gliceropirúvica tiene lugar cuando el acetaldehído, normalmente reducido a etanol, todavía no está presente. Durante la transformación de los primeros 100 gramos de azúcar se

forma la mayor parte del glicerol, después de la cual la producción de este compuesto se reduce (Ribéreau-Gayon et al., 2007). Los niveles de glicerol formados están influenciados por diferentes factores como la variedad de uva, el grado de madurez, la temperatura de fermentación y la cepa de levadura (Du et al., 2012; Ough, Fong, & Amerine, 1972; Radler & Schtitz, 1982; Rankine & Bridson, 1971).

Los ácidos grasos volátiles que pueden encontrarse en el vino son el ácido acético, los ácidos grasos de cadena larga (C16 y C18) y los ácidos grasos de cadena media (C8, C10 y C12). Los compuestos de este grupo que participan en el aroma son relativamente pocos, ya que muchos de ellos no son lo suficientemente volátiles. Entre los ácidos orgánicos con capacidad odorante se encuentra el ácido acético, que aporta notas a vinagre. Niveles elevados de este compuesto pueden dar lugar a defectos organolépticos, por lo que su concentración se controla habitualmente y en el caso de los vinos de la D.O.Ca. Rioja no debe ser superior a 0,8 g/l, tal y como especifica el Pliego de Condiciones de su Consejo Regulador. Otros ácidos como el ácido butanoico (mantequilla) o el ácido caprílico (olores animales) se encuentran normalmente en el vino en concentraciones por debajo del límite de detección (Rapp & Versini, 1995).

Los alcoholes superiores son aquellos alcoholes que tienen más de dos átomos de carbono y un peso molecular y un punto de ebullición superiores a los del etanol (Aranda et al., 2005). Estos compuestos pueden formarse durante la fermentación a través de dos vías. Una de ellas es la conversión de aminoácidos como la valina, la leucina, la isoleucina y la treonina, por lo que los niveles de alcoholes superiores están muy influenciados por las cantidades y tipos de fuentes nitrogenadas del mosto (Giudici, Zambonelli, & Kunkee, 1993). Otra de las formas en las que se pueden generar los alcoholes superiores y la vía más común es la formación *de novo* a partir de azúcares (Aranda et al., 2005). Los alcoholes superiores, también denominados alcoholes de fúsel, se caracterizan por aportar al vino aromas fuertes y punzantes. Se considera que a concentraciones inferiores a 300 mg/l estos compuestos contribuyen a la complejidad del vino, mientras que niveles superiores a 400 mg/l tendrían un efecto negativo en la calidad del mismo (Rapp & Mandery, 1986).

Los ésteres son compuestos producidos por las levaduras durante la fermentación como productos secundarios del metabolismo de los azúcares. Normalmente se encuentran en el vino en concentraciones superiores a su límite de detección, por lo que contribuyen en gran medida al aroma del vino, aportando aromas florales y afrutados. Los que tienen una mayor relevancia son los ésteres de acetato de alcoholes superiores como el acetato de etilo, el acetato de 2-feniletilo o el acetato de isoamilo y los ésteres etílicos de ácidos grasos saturados de cadena media como el hexanoato de etilo (Aranda et al., 2005). El acetato de etilo es el principal éster que aparece en el vino y aporta aromas desagradables que recuerdan al barniz o al esmalte de uñas, por lo que no

son deseables niveles superiores a 160 mg/l en vinos tintos (Corison, Ough, Berg, & Nelson, 1979).

Los aldehídos volátiles de cadena corta contribuyen al perfil aromático del vino aportando aromas que varían desde notas a manzana hasta los recuerdos cítricos, dependiendo de su estructura química. Junto a los ceto-ácidos, estos compuestos son clave en las reacciones bioquímicas necesarias para formar alcoholes superiores a partir de los aminoácidos y los azúcares por parte de las levaduras. Entre los aldehídos que se encuentran en el vino, el acetaldehído es el más importante, constituyendo hasta un 90% del contenido total de aldehídos de este producto (Nykänen, Nykänen & Suomalainen, 1977). Cuando se encuentra en concentraciones por encima de su nivel de percepción en el vino (100 mg/l) (Berg, Filipello, Hinreiner & Webb, 1955) este compuesto aporta aromas desagradables a manzana verde. Algunas prácticas, como el empleo de dosis elevadas de SO₂ durante la fermentación pueden provocar un incremento considerable en los niveles de acetaldehído producidos por las levaduras (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

El impacto en el perfil sensorial del vino de las cetonas, α -di-cetonas y α -hidroxicetonas formadas durante la fermentación (acetona, acetoína, 2,3-pentanodiona) es bajo, con la excepción del diacetilo. Este compuesto aporta aromas mantecosos que pueden resultar desagradables cuando se alcanzan concentraciones superiores a 1-4 mg/l (Lambrechts & Pretorius, 2000). En las etapas avanzadas de la fermentación el diacetilo puede ser metabolizado por las levaduras, formándose acetoína y butano-2,3-diona (Berry, 1995).

Otros productos del metabolismo de las levaduras que pueden influir en el aroma del vino son los fenoles volátiles. Estos compuestos son producidos a partir de los ácidos cinámicos trans-ferúlico y trans-p-cumárico, fundamentalmente por la actividad de levaduras contaminantes de los géneros *Dekkera/Brettanomyces* (Chatonnet, Dubourdieu, Boidron, & Pons, 1992; Chatonnet, Viala, & Dubourdieu, 1997). Los fenoles volátiles pueden encontrarse en el vino en concentraciones de hasta 6047 μ g/l y provocar defectos aromáticos que frecuentemente se describen como olores animales, a establo, cuero o a farmacia (Lambrechts & Pretorius, 2000). Los compuestos más importantes que dan lugar a estos defectos en los vinos tintos son los etilfenoles (4-etilfenol y 4-etilguayacol), (Domínguez, Guillén, & Barroso, 2002), con umbrales de detección de 430 y 33 μ g/l respectivamente (Boutou & Chatonnet, 2007).

Los compuestos azufrados contribuyen de forma significativa al aroma del vino debido a su elevada reactividad y sus bajos límites de percepción. Algunos de estos compuestos participan en la calidad del vino, mientras que otros, como el sulfuro de hidrógeno, son responsables de aromas indeseables. Este compuesto aporta un olor característico a huevos podridos siendo los niveles admisibles en el vino de 10-100 μ g/l (Lambrechts & Pretorius, 2000). Existen varios factores implicados en la formación de sulfuro de hidrógeno: elevados niveles de azufre

elemental, presencia de SO₂, presencia de compuestos orgánicos azufrados, elevadas concentraciones de aminoácidos como treonina, metionina y cisteína y limitación de nitrógeno (Spiropoulos & Bisson, 2000). La deficiencia de fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables en el medio provoca una acumulación de azufre por parte de la levadura. El azufre liberado se transforma espontáneamente en sulfuro de hidrógeno debido a las condiciones reductoras que se establecen en la fermentación anaeróbica a pH bajo (Linderholm, Findleton, Kumar, Hong, & Bisson, 2008). Otros compuestos de azufre que pueden contribuir al aroma del vino son el metilmercaptano, el etilmercaptano, el dimetildisulfuro o el dietildisulfuro (Kürbel & Rauhut, 1996).

Además de los compuestos producidos por el metabolismo de las levaduras, durante la FA la actividad de estos microorganismos puede dar lugar a la liberación de compuestos aromáticos a partir de los precursores presentes en el mosto. Los monoterpénoides son compuestos con importantes propiedades sensoriales producidos por las plantas, entre ellas la vid (*Vitis vinífera*) (Swiegers & Pretorius, 2005). Químicamente, estos precursores aromáticos están formados por un aglicón unido a la β-D-glucosa o a los disacáridos 6-O-α-L-arabinofuranosil-β-D-glucopiranososa, 6-O-α-L-ramnopiranosil-β-D-glucopiranososa, y 6-O-β-D-apiofuranosil-β-D-glucopiranososa. El aglicón está formado normalmente por un terpenol como linalol, nerol, geraniol, α-terpineol o citronelol. Durante la fermentación estos terpenoides pueden liberarse por la acción de enzimas glicosidasas liberadas por las levaduras como la β-glucosidasa (Fernández-González, Di Stefano, & Briones, 2003; Zoecklein, Marcy, Williams, & Jasinski, 1997).

Los tioles varietales y particularmente la 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP), el acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA) y el 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) han sido identificados como compuestos claves en el aroma de los vinos jóvenes procedentes de diversas variedades (Roland, Cavelier & Schneider, 2012). La 4MMP aporta aromas que recuerdan a boj y fruta de la pasión y el 3MH y el 3MHA tienen olores agradables a maracuyá, pomelo, grosella y guayaba (Swiegers et al., 2009). Estos tioles volátiles tienen un potencial aromático elevado, con umbrales de percepción muy bajos (0.8 ng/l para el 4MMP, 60 ng/l para el 3MH y 4 ng/l para el 3MHA) (Dubourdiou, Tominaga, Masneuf, Des Gachons, & Murat, 2006). Según los diferentes precursores de los tioles que estén implicados, existen diversas vías por las que las levaduras liberan estos compuestos. En la vía que implica los precursores cisteinilados, los conjugados son escindidos debido a la actividad β-liasa de la levadura durante los primeros días de fermentación (Tominaga, Des Gachons, & Dubourdiou, 1998). La formación a partir de precursores glutationilados ha sido estudiada recientemente e implica varias etapas que preceden la liberación del compuesto aromático (Parker, Capone, Francis, & Herderich, 2018). Una tercera vía implica compuestos insaturados en C6 como el (E)-2-hexenal, que reciben un grupo sulfhídrico durante la fermentación alcohólica (Schneider, Charrier, Razungles, & Baumes, 2006).

3. Dinámica y evolución de las poblaciones de levaduras en la FA

Las levaduras son hongos unicelulares microscópicos que se reproducen por gemación o escisión como medios de reproducción asexual, teniendo estadios sexuales que no se forman en un cuerpo fructífero (Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011). Estos microorganismos constituyen un grupo taxonómico complejo y heterogéneo, que incluye ascomicetos y basidiomicetos (Togores, 2011). Los estudios taxonómicos describen hasta 149 géneros de levaduras y más de 1500 especies (Kurtzman et al., 2011), de las cuales más de 40 han sido aisladas en el mosto y durante su fermentación (Capozzi, Garofalo, Chiriatti, Grieco, & Spano, 2015; Ciani, Comitini, Mannazzu, & Domizio, 2010; N P Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2006; Tristezza et al., 2013).

Las levaduras que se encuentran en los ambientes enológicos pueden dividirse en dos grandes grupos: las pertenecientes al género *Saccharomyces*, representadas principalmente por *S. cerevisiae* y las levaduras denominadas no-*Saccharomyces*. Estas últimas engloban a todas las especies de levaduras enológicas pertenecientes a géneros distintos de *Saccharomyces*, caracterizadas por su limitado poder fermentativo. Normalmente, las levaduras alterantes como *Dekkera/Brettanomyces* se excluyen de este grupo (Jolly, Varela, & Pretorius, 2014).

Las levaduras no-*Saccharomyces* que están presentes en el mosto y durante la FA pueden clasificarse en tres grupos diferentes: en primer lugar, se encuentran las levaduras aerobias como *Pichia (P.)* spp., *Debaryomyces (D.)* spp., *Rhodotorula (R.)* spp., *Candida* spp. o *Cryptococcus (Cr.) albidus*; en segundo lugar, las levaduras apiculadas con baja actividad fermentativa como *Hanseniaspora (H.) uvarum*, *H. guilliermondii* o *H. occidentalis* y en el tercer grupo se incluyen las levaduras con metabolismo fermentativo como *Kluyveromyces (Kl.) marxianus*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* y *Z. bailii* (Jolly et al., 2014).

El ciclo de crecimiento de las levaduras durante la FA está definido por diferentes fases de desarrollo: latencia, aceleración, crecimiento exponencial, ralentización del crecimiento, estacionaria y declive (Hidalgo, 2011) (Figura 3). Durante la fase de latencia, las levaduras se adaptan a las condiciones del medio y no se producen multiplicaciones celulares, por lo que no tiene lugar un crecimiento de la población. En la fase de aceleración, las levaduras comienzan a multiplicarse, alcanzándose poblaciones de unas 10^5 céls/ml. Esta etapa, junto con la anterior, transcurre en unas 24 horas dependiendo de la temperatura, y concluye cuando el medio se satura de anhídrido carbónico. En la siguiente fase, el crecimiento de las levaduras se produce de forma exponencial y la biomasa aumenta, sucediéndose un máximo de 4 a 5 generaciones de células. La siguiente fase, la de ralentización del crecimiento, se corresponde con la última parte de la anterior en la que, debido a los factores limitantes del medio, la población de levaduras deja de crecer. En la fase estacionaria las células no se multiplican y el crecimiento es nulo, mientras que en la última fase, la de declive, la población de levaduras disminuye ligeramente, produciéndose una

importante reducción en la población de células vivas. Las células mueren y por autólisis comienzan a secretar al medio las sustancias que contienen.

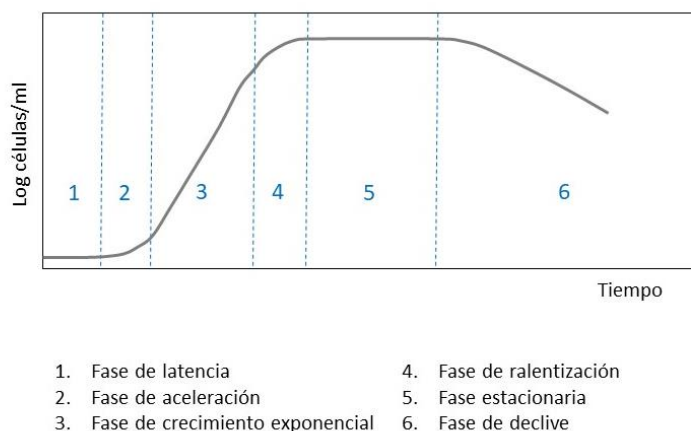


Figura 3: Fases de desarrollo de las levaduras durante la fermentación (Adaptado de Hidalgo, 2011).

La fermentación espontánea del mosto es un proceso complejo en el que interviene una sucesión de diferentes géneros y especies de levaduras. En las vinificaciones espontáneas las levaduras encontradas en el mosto durante las primeras horas se corresponden con los géneros que se detectan normalmente en la uva, mayoritariamente *Hanseniaspora/Kloeckera* junto con *Candida* (Jolly et al., 2014; Zamora, 2009). La presencia de especies fermentativas como *S. cerevisiae* y *S. bayanus* en la superficie de las uvas es reducida, mientras que en las instalaciones de la bodega este tipo de levaduras son abundantes. El contacto de la vendimia con los distintos materiales de la bodega hace que estas levaduras pasen al mosto y comiencen a multiplicarse (Garijo, 2013). De esta forma, transcurridas unas 20 horas, las levaduras del género *Saccharomyces* y especialmente *S. cerevisiae* comienzan a desarrollarse, coexistiendo con las levaduras no-*Saccharomyces* (Aranda et al., 2005). En este momento, *Pichia* y *Metschnikowia* son normalmente los géneros de levaduras no-*Saccharomyces* más abundantes (Zamora, 2009). Pasados unos tres o cuatro días de fermentación, *S. cerevisiae* es la levadura mayoritaria y la responsable de completar la FA del mosto. En las fermentaciones en las que se produce un consumo rápido y completo de los azúcares, no se encuentra ninguna otra especie además de *S. cerevisiae* de forma significativa al final de la fermentación. Si las condiciones son desfavorables, se puede producir la contaminación del vino con levaduras alterantes (Ribéreau-Gayon et al., 2007).

La sucesión de levaduras que tiene lugar durante el desarrollo de la FA está relacionada con las variaciones en las condiciones del medio. A pesar de la permanencia de algunas levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación, la mayoría desaparecen en las primeras etapas del proceso. La inhibición ejercida por los efectos combinados del sulfuroso (SO_2), el pH bajo, la

concentración elevada de etanol y la deficiencia de oxígeno dificultan su desarrollo en el medio (Combina et al., 2005). Las levaduras no-*Saccharomyces* capaces de permanecer en las etapas finales de la fermentación se caracterizan por una mayor tolerancia al etanol (Combina et al., 2005; Lin et al., 2020; Pina, Santos, Couto, & Hogg, 2004). De forma general, factores como el aumento en la concentración de etanol, el ambiente anaeróbico y las mayores temperaturas durante la fermentación, favorecen el dominio de *S. cerevisiae*, que presenta una mayor tolerancia a esas condiciones (Albergaria & Arneborg, 2016; Bauer & Pretorius, 2019). Como han revelado algunos estudios, además de los ambientales, existen otros factores como los mecanismos de contacto célula-célula que pueden provocar la inhibición de las levaduras no-*Saccharomyces* en presencia de concentraciones altas de *S. cerevisiae* (Nissen, Nielsen, & Arneborg, 2003). Por otro lado, las características particulares de cada especie definen el momento hasta el cual pueden permanecer en el medio. Los parámetros de crecimiento varían entre las especies y entre las cepas de la misma especie, que pueden presentar cinéticas diferentes (Jolly et al., 2014).

4. Tendencias actuales en la industria enológica

Como se ha descrito en el apartado anterior, las FA espontáneas son complejos procesos microbianos llevados a cabo por la acción secuencial de diferentes levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* indígenas. La gran diversidad de especies implicadas en el proceso da lugar a vinos con una mayor complejidad. Sin embargo, este tipo de fermentaciones a menudo se han relacionado con fases de latencia y tiempos de fermentación largos, elevados contenidos de azúcares residuales y aparición de defectos organolépticos (Varela et al., 2009). Estas desventajas, unidas a la falta de predictibilidad y de control del proceso, han provocado que en la industria enológica se empleen alternativas a las fermentaciones espontáneas con el fin de conseguir procesos más controlados.

En la actualidad la estrategia habitual para la elaboración del vino implica la inoculación en el mosto de cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas en forma de levaduras secas activas (LSA). La aplicación de esta técnica de elaboración presenta algunas ventajas como la reducción de la fase de latencia, la fermentación rápida y completa del mosto y una gran reproducibilidad en el producto final (Krieger-Weber, 2009; Romano, Capece, & Jespersen, 2006). Sin embargo, esta práctica también provoca una estandarización de los vinos obtenidos como consecuencia de la reducción de la diversidad de las poblaciones microbianas involucradas en la FA (Rainieri & Pretorius, 2000; Romano, Fiore, Paraggio, Caruso, & Capece, 2003). Algunos autores han afirmado que el empleo generalizado de inóculos comerciales en las fermentaciones de vinos de diferentes variedades y orígenes enmascara el *bouquet* particular característico de las distintas

regiones vitivinícolas del mundo (Cordero-Bueso, Esteve-Zarzoso, Cabellos, Gil-Díaz, & Arroyo, 2013; Swiegers & Pretorius, 2005).

Para evitar la homogeneización de los vinos inoculados con cepas comerciales de *S. cerevisiae*, se ha propuesto el empleo de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae*. Esta práctica permite obtener algunas de las ventajas de las fermentaciones espontáneas como la mayor complejidad organoléptica, pero con un mayor control del proceso, evitando las paradas de fermentación o los posibles defectos en el vino provocados por la microbiota indígena (Jolly et al., 2006; Rojas, Gil, Piñaga, & Manzanares, 2003; Romano et al., 2003).

Actualmente muchas bodegas y regiones vitivinícolas han apostado por los programas de selección de levaduras autóctonas con aislados procedentes del propio ecosistema de la bodega o de sus viñedos. Esta tendencia se basa en la idea de que las levaduras aisladas de estos ambientes enológicos están más adaptadas a la ecología y las características tecnológicas de los mostos de la región de la que proceden (Querol, Huerta, Barrio, & Ramon, 1992; Schvarczová, Štefániková, Jankura, & Kolek, 2017). El empleo de levaduras autóctonas puede ser una herramienta útil para mejorar las características de los vinos típicos de una región debido a su adaptación al medio y a su capacidad para exaltar las peculiaridades del producto (Bae, Fleet, & Heard, 2006; Lopes, Rodríguez, Sangorrín, Querol, & Caballero, 2007; Rodríguez et al., 2010; Tristezza et al., 2014).

Además de evitar la homogeneización y mejorar la calidad de los vinos, el empleo de levaduras no-*Saccharomyces* se ha propuesto como herramienta para solucionar algunos de los problemas a los que se enfrenta el sector vitivinícola en la actualidad como son el cambio climático o la disminución de la utilización del SO₂.

El cambio climático tiene una influencia importante en la fenología de la vid y la composición de la uva, afectando de esta forma al proceso de vinificación y las características del vino. Entre los efectos del cambio climático más importantes se encuentra el incremento de las concentraciones de azúcar, que da lugar a vinos con mayores niveles de etanol, menor acidez y la modificación de compuestos aromáticos varietales (Mira de Orduña, 2010). Además, las elevadas temperaturas pueden provocar una menor síntesis de antocianinas en la uva (Downey, Dokoozlian, & Krstic, 2006; Spayd, Tarara, Mee, & Ferguson, 2002). Este efecto puede hacer que se retrase la fecha de vendimia con el fin de optimizar la madurez fenólica de las uvas, lo que también provoca que se alcancen mayores concentraciones de azúcar en los mostos obtenidos. Los efectos del cambio climático, unidos a la preferencia de los consumidores por vinos con un menor grado alcohólico (Maturano et al., 2019), han despertado el interés de la industria enológica en conseguir vinos con niveles reducidos de etanol.

Otro reto actual del sector enológico es la elaboración de vinos con bajo o nulo contenido en SO₂ añadido. La etapa inicial del proceso de vinificación, previa al dominio del medio por levaduras de la especie *S. cerevisiae*, representa un gran riesgo para el desarrollo de microorganismos alterantes en las elaboraciones sin SO₂. Una de las técnicas que están atrayendo el interés para contrarrestar la ausencia de este antiséptico es el empleo de cepas de levaduras con capacidad bioprotectora. La bioprotección consiste en la inoculación de la cepa de levadura en el momento del encubado para evitar la proliferación en el mosto de microorganismos indeseados y ha sido propuesta como una alternativa a la adición de SO₂ (Simonin et al., 2020).

5. Contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* a la calidad de los vinos

Aunque *S. cerevisiae* es considerada la levadura responsable de la FA, muchas otras especies de levaduras no-*Saccharomyces* están presentes durante gran parte de este proceso, participando en las primeras etapas de la fermentación y contribuyendo a las características organolépticas del vino (Benito, Calderón, & Benito, 2019b; Del Fresno et al., 2017; Morata et al., 2018). Tradicionalmente, las levaduras no-*Saccharomyces* han sido consideradas poco relevantes e incluso levaduras alterantes, debido a que eran frecuentemente aisladas de vinos defectuosos (Jolly et al., 2014), así como por su elevada producción de compuestos que podían resultar negativos para la calidad del vino como el ácido acético, el acetato de etilo, el acetaldehído o la acetoína (Comitini et al., 2011). Sin embargo, la literatura ha demostrado que, mediante programas de selección adecuados, las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* pueden tener una influencia positiva en las características del vino (Benito et al., 2015; Ciani et al., 2010; Lambrechts & Pretorius, 2000; Liu et al., 2017; Loira et al., 2015; Medina et al., 2013).

Como indican algunos estudios, las características diferenciales encontradas en vinos fermentados en presencia de levaduras no-*Saccharomyces* pueden deberse a su capacidad para secretar enzimas como esterasas, glicosidasas, lipasas, β-glucosidasas, proteasas o celulasas, entre otras, que actúan sobre los sustratos presentes en el medio mejorando algunas etapas del proceso como la maceración, la filtración y clarificación, el rendimiento y la extracción de color o las características del vino, especialmente el aroma (Charoenchai, Fleet, Henschke, & Todd, 1997; Dizey & Bisson, 2000; Lagace & Bisson, 1990; Strauss, Jolly, Lambrechts, & Van Rensburg, 2001).

Algunas de estas enzimas, como las pectolíticas, proteolíticas, celulolíticas y hemicelulolíticas, llamadas genéricamente enzimas de maceración, actúan sobre los componentes estructurales de la uva y de esta forma dan lugar al aumento del rendimiento en mosto, la clarificación, la extracción de color o la filtración del vino. Dado que, como se ha descrito en la bibliografía, *S. cerevisiae* no es considerada una productora destacable de enzimas (Belda et al.,

2016a; Charoenchai et al., 1997), es interesante estudiar el potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para producir enzimas que contribuyan a la mejora del proceso de elaboración y las características del vino. En el trabajo realizado por Maturano y colaboradores (2012), en el que se estudió la producción de enzimas en fermentaciones puras y mixtas de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, *T. delbrueckii* mostró la mayor producción de enzimas pectinasas, proteasas, amilasas y xilanasas tanto en un cultivo puro como en uno mixto. La presencia de pectinasa, β -xilosidasa y β -glucosidasa en levaduras no-*Saccharomyces* fue estudiada por Hong y colaboradores (2019), encontrando cepas de los géneros *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Candida*, y *Debaryomyces* que presentaban las tres actividades estudiadas. Por su parte, Belda y colaboradores (2016a) detectaron actividad poligalacturonasa en *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *Aureobasidium* (A.) *pullulans*. Además, observaron mejoras en la maceración, la clarificación y la extracción de compuestos fenólicos en vinificaciones a escala semiindustrial realizadas con *M. pulcherrima*. Como puede extraerse de los resultados obtenidos en los diferentes trabajos disponibles en la literatura, las levaduras no-*Saccharomyces* pueden contribuir a la mejora de la calidad de los vinos mediante la acción de las enzimas que son capaces de producir.

Además de la producción de enzimas de interés enológico, las levaduras no-*Saccharomyces* tienen otras características que pueden contribuir a la calidad del vino como la liberación de metabolitos secundarios, la reducción del grado alcohólico y la acidez volátil, la modulación de la acidez mediante la acidificación y desacidificación biológica o el efecto bioprotector (Dutraive et al., 2019; Gobbi et al., 2013; Hidalgo, 2011; Kapsopoulou, Mourtzini, Anthoulas, & Nerantzis, 2007; Quirós, Rojas, Gonzalez, & Morales, 2014; Simonin et al., 2020; Vilela, 2018).

Algunas levaduras no-*Saccharomyces* liberan compuestos como el glicerol, responsable de aportar al vino atributos como suavidad, dulzura o complejidad (Ciani & Ferraro, 1996), por lo que el aumento de su concentración en los vinos inoculados con estas levaduras puede contribuir a la mejora de sus características organolépticas. Ciani y Ferraro (1996) observaron un aumento de la concentración de glicerol en vinos elaborados con células inmovilizadas de *C. stellata*, que presentaron además menores niveles de ácido acético que los elaborados con *S. cerevisiae*. Otros estudios han demostrado la capacidad de diferentes cepas de levaduras no-*Saccharomyces* pertenecientes a especies como *L. thermotolerans*, *Schizosaccharomyces* (*Sch.*) *pombe*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* o *P. kluyveri* para producir un aumento en la concentración de glicerol (Belda et al., 2017; Del Fresno et al., 2017; Dutraive et al., 2019; González-Royo et al., 2015).

En el actual contexto de cambio climático, la capacidad para reducir el grado alcohólico del vino es otra de las características que pueden ser deseables en un inóculo. El empleo de levaduras no-*Saccharomyces* en la vinificación en fermentaciones mixtas o secuenciales ha demostrado ser efectivo para conseguir la reducción del grado alcohólico en los vinos elaborados. En estudios como el de Benito y colaboradores (2013) se lograron reducciones medias del contenido en alcohol del 0,5% (v/v) empleando una cepa de *Sch. pombe* en inoculaciones secuenciales con *S. cerevisiae*. En vinificaciones llevadas a cabo coinoculando *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae*, Gobbi y colaboradores (2013) consiguieron una reducción media del grado alcohólico de casi 1% (v/v) respecto a las vinificaciones puras con *S. cerevisiae* sin aumentar el contenido en azúcares residuales. En trabajos como el de Contreras y colaboradores (2014), otras levaduras no-*Saccharomyces* como *M. pulcherrima* también han demostrado su utilidad para reducir el contenido en alcohol de los vinos, logrando una disminución media en el grado alcohólico de 1,6% (v/v) en inoculaciones secuenciales con *S. cerevisiae*. Por otro lado, algunos estudios han propuesto la respiración de azúcares por parte de las levaduras no-*Saccharomyces* como estrategia para conseguir la reducción del contenido en alcohol del vino (Gonzalez, Quirós, & Morales, 2013; Quirós et al., 2014). Las levaduras Crabtree positivas, como *S. cerevisiae*, continúan fermentando en condiciones de aireación siempre que los azúcares se mantengan por encima de cierto límite. Sin embargo, en las levaduras Crabtree negativas el metabolismo fermentativo en presencia de oxígeno sería muy limitado. La selección de cepas para este tipo de aplicaciones específicas requiere el estudio de sus cocientes de respiración y un control de los metabolitos producidos como el ácido acético, cuyos niveles pueden ser elevados en condiciones de aireación.

El ácido acético es el principal compuesto responsable de la acidez volátil, afectando negativamente a la calidad del vino. Diversos estudios han demostrado la capacidad de especies de levaduras no-*Saccharomyces* como *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* y *C. zemplinina* para reducir los niveles de ácido acético en el vino (Bely, Stoeckle, Masneuf-Pomarède, & Dubourdieu, 2008; Gobbi et al., 2013; Rantsiou et al., 2012; Renault et al., 2009; Vilela-Moura, Schuller, Mendes-Faia, & Côrte-Real, 2008; Vilela, 2018).

Las levaduras no-*Saccharomyces* también se pueden emplear para modular la acidez de los vinos. En vinos con una acidez insuficiente, levaduras como *L. thermotolerans* son capaces de elevar este parámetro gracias a la producción de ácido láctico (Gobbi et al., 2013; Kapsopoulou et al., 2007). Por otro lado, en vinos de zonas frías puede ser interesante una reducción de la acidez, que puede conseguirse mediante la degradación del ácido málico por parte de las levaduras mediante la fermentación maloalcohólica. En este proceso el ácido málico se metaboliza hasta su transformación en etanol. Las levaduras del género *Schizosaccharomyces* pueden llegar a

metabolizar hasta el 90% del ácido málico produciendo poca acidez volátil (Hidalgo, 2011), por lo que pueden ser empleadas para la desacidificación del vino.

En la actualidad, una de las alternativas que se han propuesto al empleo del SO₂ como agente antimicrobiano es la bioprotección. Las levaduras no-*Saccharomyces* dominan de forma natural las primeras etapas de la fermentación, por lo que son candidatas idóneas como inóculos bioprotectores del vino. Estudios como los realizados por Simonin y colaboradores (2018, 2020) han evaluado la capacidad bioprotectora de levaduras no-*Saccharomyces* en el vino con resultados prometedores. La siembra de especies de levaduras no-*Saccharomyces* como *T. delbrueckii* o *M. pulcherrima* al inicio del proceso de elaboración limitó la proliferación de microorganismos alterantes como *B. bruxellensis* y bacterias acéticas con un efecto similar al de la adición de SO₂.

Uno de los mecanismos que poseen algunas levaduras para la regulación de las poblaciones microbianas es la producción de toxinas capaces de eliminar o inhibir a otros microorganismos. Estas toxinas, denominadas como factor killer, son proteínas o glicoproteínas cuya acción es mediada por receptores específicos de la pared celular del microorganismo sensible (García, Esteve-Zarzoso, & Arroyo, 2016). El factor killer, que fue descubierto en primer lugar en una cepa de *S. cerevisiae*, ha sido detectado también en otros géneros como *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Ustilago*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Williopsis*, *Kluyveromyces* o *Zygosaccharomyces* (Magliani, Conti, Gerloni, Bertolotti, & Polonelli, 1997). Los trabajos realizados por Ciani y Fatichenti (2001) muestran la capacidad de la levadura *Tetrapisispora phaffii* (anteriormente *Kluyveromyces phaffii*) para producir una toxina activa contra levaduras que pueden provocar contaminaciones en las etapas prefermentativas. Otras levaduras capaces de secretar toxinas killer, *Kl. wickerhamii* y *P. anómala* han mostrado ser efectivas para inhibir el desarrollo de levaduras alterantes del género *Dekkera/Brettanomyces* (Comitini & Ciani, 2011; Comitini, Ingeniis De, Pepe, Mannazzu, & Ciani, 2004). Además de las toxinas killer, las levaduras son capaces de liberar otros compuestos con actividad antimicrobiana, como es el caso de *M. pulcherrima* y la producción de pulcherrimina. Este pigmento marrón-rojizo se forma a partir de la secreción de ácido pulcherrimínico y su unión con los iones hierro disponibles en el medio (Sipiczki, 2006). Diferentes estudios han mostrado la actividad antimicrobiana de *M. pulcherrima* contra hongos patógenos y otras especies de levaduras (Kántor, Hutková, Petrová, Hleba, & Kačániová, 2016; Oro, Ciani, & Comitini, 2014; Parafati, Vitale, Restuccia, & Cirvilleri, 2015; Türkel, Korukluoğlu, & Yavuz, 2014).

Los estudios realizados desvelan el gran potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para mejorar la calidad del vino, lo que ha llevado a la comercialización de algunas cepas en forma de levaduras secas activas (LSA). Los principales productos disponibles en el mercado basados en levaduras no-*Saccharomyces* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Inóculos comerciales de levaduras no-*Saccharomyces* existentes en el mercado.

Nombre comercial	Especie	Características
Biodiva™	<i>T. delbrueckii</i>	Aumenta el carácter varietal y ésteres
Flavia™	<i>M. pulcherrima</i>	Aumenta el carácter varietal
Concerto™	<i>L. thermotolerans</i>	Aumenta la acidez y la complejidad organoléptica
Prelude™	<i>T. delbrueckii</i>	Incrementa ésteres y manoproteínas
Zymaflore® Alpha	<i>T. delbrueckii</i>	Aumenta la complejidad aromática y aporta volumen en boca
Viniferm NS TD	<i>T. delbrueckii</i>	Aumenta la complejidad aromática y aporta redondez y volumen
Primaflora® VB BIO	<i>M. pulcherrima</i>	Contribuye a la complejidad organoléptica y tiene efecto bioprotector
ProMalic	<i>Sch. pombe</i>	Lleva a cabo la desacidificación biológica
Frootzen®	<i>P. kluyveri</i>	Potencia aromas frutales (tioles volátiles)

6. Selección de levaduras para vinificación

El empleo de inóculos de levaduras seleccionadas es una herramienta útil para conseguir la mejora de la calidad del vino, ya que pueden influir positivamente en la composición y el perfil sensorial de los vinos elaborados. Muchas de las características que presentan las levaduras varían dependiendo de la cepa estudiada, lo que implica diferencias en su comportamiento enológico (Rossouw & Bauer, 2016). Por esta razón, es esencial llevar a cabo un proceso de selección clonal para su aplicación en vinificación.

El primer paso para la obtención de un inóculo es su aislamiento. Las cepas a incluir en el proceso de selección son aisladas preferentemente del mosto o del vino, asegurándose de esta forma su adaptación a los medios donde posteriormente van a ser empleadas (Rainieri & Pretorius, 2000). Un factor importante a tener en cuenta cuando se aíslan nuevas cepas a partir de mosto y especialmente de vino es si en la bodega se han utilizado previamente cultivos iniciadores comerciales, ya que en este caso existe un alto riesgo de aislar una levadura ya seleccionada, cuya utilización podría estar limitada por derechos de propiedad intelectual (González, Muñoz & Carrascosa, 2005).

Una vez se ha aislado un número significativo de cepas, el siguiente paso es su caracterización. Normalmente, el proceso de selección comienza con un número elevado de cepas, por lo que es recomendable incluir en las primeras fases de selección criterios fáciles de evaluar y que permitan identificar y descartar de modo rápido las cepas menos interesantes, con el fin de reducir el número de cepas que deben ser analizadas en las siguientes fases del proceso.

Las características a estudiar en las cepas pueden clasificarse en diferentes grupos: deseables y no deseables (Degré, 1993), divididas estas en tecnológicas y cualitativas (Dittrich & Großmann, 2005). Los criterios incluidos en cada grupo aparecen detallados en la Tabla 2. Las características tecnológicas son importantes en la eficiencia del proceso fermentativo, no obstante, en la selección de levaduras no-*Saccharomyces*, el poder fermentativo o la tolerancia al etanol normalmente no son considerados criterios principales, ya que de forma general el empleo de estos inóculos debe hacerse en combinación con *S. cerevisiae* para asegurar la fermentación completa del mosto. Las características cualitativas que se tienen en cuenta a la hora de seleccionar una cepa de levadura hacen referencia a su influencia en la composición química y las características sensoriales del vino.

Tabla 2: Criterios de selección de levaduras para su uso comercial (Adaptado de: Krieger-Weber, 2009).

Deseables	No deseables
Propiedades cualitativas	Propiedades cualitativas
Síntesis de compuestos aromáticos positivos	Producción de SO ₂
Síntesis de β-glucosidasa	Producción de H ₂ S
Síntesis de glicerol	Producción de compuestos azufrados
Síntesis de manoproteínas	Producción de ácido acético y acetato de etilo
Formación de ácido láctico	Producción de polifenol oxidasa
Formación de acetato de isoamilo	Producción de aminas biógenas
Degradación de ácido málico	Síntesis de precursores del carbamato de etilo
	Síntesis de compuestos que se unen al SO ₂ (acetaldehído, piruvato...)
Propiedades tecnológicas	Propiedades tecnológicas
Fermentación completa de los azúcares	Formación de espuma
Alta tolerancia al etanol	Formación de biofilms
Resistencia al SO ₂	Requerimiento excesivo de nitrógeno
Mínima fase de latencia en la rehidratación	
Fermentación a bajas temperaturas	
Factor killer	
Autólisis rápida	
Propiedades floculantes	
Propiedades de sedimentación	

Como se puede observar en la Tabla 2, los criterios de selección que han sido propuestos por diferentes autores para la obtención de levaduras de uso enológico son muy variados y no todos son igual de relevantes para las características concretas de cada vino.

Aunque actualmente se estén planteando alternativas, el SO₂ es un aditivo cuyo uso es generalizado en la elaboración del vino, por lo que la resistencia de las cepas de levadura a este compuesto es una característica relevante a la hora de realizar el proceso de selección. Este es un rasgo altamente variable en función de las especies y las cepas de levadura (Divol, Du Toit, & Duckitt, 2012). Las levaduras poseen diferentes mecanismos para hacer frente al SO₂. La detoxificación del SO₂ mediante la proteína de membrana Ssu1 ha sido descrita en *S. cerevisiae* como uno de los mecanismos de resistencia más eficientes (Park & Bakalinsky, 2000). En un estudio reciente realizado por Tavares y colaboradores (2021), se han identificado en *Saccharomyces ludwigii* cuatro proteínas similares a Ssu1, además de genes ortólogos del 65% de los genes de tolerancia al SO₂ de *S. cerevisiae*. Otras vías son la producción de acetaldehído, que puede unirse al SO₂ libre, o el incremento en el funcionamiento de los sistemas de reducción del sulfito o del metabolismo del azufre (Aranda, Jiménez-Martí, Orozco, Matallana, & Del Olmo, 2006; Casalone et al., 1992; Zara & Nardi, 2021).

Una de las causas más frecuentes de las paradas de fermentación es la deficiencia de nitrógeno en el medio. Una proporción significativa del nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) puede ser consumido por las levaduras no-*Saccharomyces* antes del predominio de *S. cerevisiae* durante la FA, pudiendo dar lugar a fermentaciones lentas o paradas de fermentación (Medina, Boido, Dellacassa, & Carrau, 2012; Rollero, Bloem, Ortiz-Julien, Camarasa, & Divol, 2018). Por esta razón, el conocimiento de los requerimientos de nitrógeno de las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* que van a emplearse como inóculos en vinificación puede ser de gran ayuda en el control de la fermentación. En el estudio llevado a cabo por Prior y colaboradores (2019) se observaron diferencias en los requerimientos de nitrógeno en diferentes cepas comerciales de levaduras no-*Saccharomyces*.

La temperatura es otro de los factores que puede ser problemático en el desarrollo de las fermentaciones, por lo que la resistencia de las levaduras al estrés térmico es importante en los inóculos seleccionados para la vinificación. Las temperaturas que se alcanzan durante el proceso influyen en la resistencia y la permanencia de las levaduras a lo largo de la fermentación, así como en su metabolismo, de forma que afectan a la formación de metabolitos como el glicerol, el ácido acético o el ácido succínico, entre otros (Torija, Rozès, Poblet, Guillamón, & Mas, 2003). Torija y colaboradores (2003) mostraron que la resistencia a temperaturas elevadas en las levaduras es una característica cepa-dependiente. La actividad metabólica de las levaduras, y por lo tanto su aportación a las características del vino, también puede verse afectada por las bajas temperaturas. Ciani y Comitini (2006) detectaron menores concentraciones de glicerol en fermentaciones mixtas llevadas a cabo con *C. stellata* a 16°C que en las realizadas a una temperatura de 20°C. Algunos tratamientos, como la maceración en frío que se lleva a cabo en la elaboración de vinos tintos con el fin de mejorar parámetros como el color o el aroma (Casassa, Bolcato, & Sari, 2015;

De Santis & Frangipane, 2010), requieren el mantenimiento de temperaturas bajas. En el estudio realizado por Zott y colaboradores (2008) se observaron diferencias en las especies presentes al final de la etapa de maceración en frío dependiendo de las temperaturas aplicadas. Los resultados de este trabajo sugirieron que el desarrollo de *C. zemplinina* se veía favorecido por las bajas temperaturas, mientras que *H. uvarum* se detectaba en los tratamientos con temperaturas más elevadas.

La producción de cantidades elevadas de ácido acético por parte de la levadura puede dar lugar a defectos en el vino elaborado, por lo que también es un criterio importante a tener en cuenta a la hora de seleccionar las cepas. El ácido acético es el constituyente mayoritario de la acidez volátil en los vinos y puede aportar aromas desagradables a vinagre cuando supera los 0,3-0,4 g/l (Suárez & Íñigo, 2004). Los niveles de ácido acético formado dependen en gran medida de la cepa de levadura (Erasmus, Cliff & van Vuuren, 2004), por lo que la selección de cepas o clones es una herramienta útil para evitar la aparición de desviaciones organolépticas en el vino.

El factor killer es otro de los criterios que se pueden tener en cuenta a la hora de seleccionar una cepa de levadura. Se pueden diferenciar tres fenotipos diferentes en las levaduras en relación a esta característica. Las cepas killer (K^+R^+) secretan al medio toxinas de naturaleza proteica que son letales para las cepas de levadura sensibles. El segundo fenotipo es el neutro (K^-R^+), constituido por las cepas que no producen la toxina, pero son resistentes a ella. Las de fenotipo sensible (K^-R^-) no son capaces de sintetizar la proteína y no son resistentes a ella, por lo que resulta letal para estas cepas (Ribéreau-Gayon et al., 2007). Esta característica aporta una ventaja para las cepas con fenotipo killer, ya que mejoran sus probabilidades de implantación en el medio al eliminar la competencia de las cepas sensibles.

En la actualidad, la contribución de los inóculos a las propiedades sensoriales y la calidad del vino son considerados igual de importantes que sus propiedades tecnológicas. La calidad de los vinos tintos está íntimamente ligada a la presencia de compuestos fenólicos, siendo el color uno de los atributos más importantes en este tipo de vino (Caridi et al., 2017). Por esta razón, en la selección de cepas para la elaboración de vinos tintos de calidad es usual que se prioricen las características de las cepas con influencia en el color como la presencia de actividades carbohidrolasas, que permiten una mayor extracción de las sustancias colorantes durante la maceración, actividad hidroxicinamato descarboxilasa (HCDC) o la ausencia de la actividad β -glucosidasa, que puede dar lugar a la degradación de las antocianinas (Belda et al., 2016a; Morata et al., 2019; Zhang, Zhang, Sirisena, Gan, & Fang, 2021).

En el caso de que la cepa seleccionada se quiera comercializar, hay que tener en cuenta características adicionales que se requieren en el proceso de producción industrial, como su estabilidad genética, un buen crecimiento en melazas y una buena supervivencia y actividad

metabólica tras las fases de secado y rehidratación (González et al., 2005). Normalmente, los cultivos iniciadores se obtienen tras varios años de trabajos de selección y es fundamental que mantengan a lo largo del tiempo las características por las que fueron seleccionadas, por lo que la estabilidad genética es un rasgo importante en las cepas. Por otra parte, en la producción industrial de levaduras las melazas de caña de azúcar o de remolacha son la fuente de carbono más frecuentemente utilizada, por lo que la capacidad de la cepa seleccionada para desarrollarse en este sustrato también resulta esencial. Tras el proceso de secado, dependiendo de la cepa de levadura y de las condiciones de producción, el número de células capaces de sobrevivir puede presentar grandes diferencias. La rehidratación es otro punto crítico que deben superar las levaduras comerciales. La trehalosa posee una capacidad protectora de la integridad de las membranas que puede jugar un papel importante en la supervivencia de las levaduras durante los procedimientos de secado y posterior rehidratación (Câmara, Maréchal, Tourdot-Maréchal, & Husson, 2019; Degré, 1993).

Además de lo mencionado, durante el proceso de producción industrial de LSA, los cultivos de levaduras se someten a diferentes fases de producción en las que se tiene en cuenta la inducción de los genes de respuesta a estrés y la síntesis de sustancias de reserva como trehalosa y glucógeno. Estos procesos normalmente se encuentran reprimidos en condiciones de crecimiento rápido y se inducen al entrar en la fase estacionaria. Por esta razón, la última fase de producción de biomasa se lleva a cabo en condiciones de limitación de nitrógeno, pero manteniendo un nivel suficiente de fuente de carbono para permitir la síntesis de glucógeno y trehalosa (François & Parrou, 2001). La concentración de fósforo también se mantiene controlada ya que es determinante para la tasa de división y para la estabilidad frente al secado. En la fase estacionaria las células adquieren una serie de adaptaciones que facilitan su supervivencia en condiciones adversas, incluyendo el engrosamiento de la pared, la acumulación de polisacáridos de reserva, la expresión de genes de resistencia a diversos factores de estrés y la activación de mecanismos de reciclado de los componentes celulares (Werner-Washburne, Braun, Johnston & Singer, 1993).

Como se puede extraer de lo descrito en este apartado, en el proceso de selección de levaduras para su empleo como inóculos en la elaboración del vino se pueden tener en cuenta numerosos criterios, que deberán incluirse o priorizarse en función del tipo de vino que se desee obtener o de las características particulares que quieran conseguirse en el producto final.

Capítulo II

Antecedentes

Antecedentes del trabajo presentado en esta memoria de Tesis

Los aislados incluidos en el proceso de selección en el que se centra esta Tesis proceden de los bancos de levaduras no-*Saccharomyces* de la Universidad de la Rioja y del Servicio de Investigación Vitivinícola (SIV) del Gobierno de La Rioja, en los que se conservan más de 500 aislados pertenecientes a más de 30 especies. Debido al elevado número de levaduras almacenadas en estos bancos, para abordar este trabajo en primer lugar se llevó a cabo una preselección atendiendo a dos criterios: especies de levaduras no-*Saccharomyces* que hubieran mostrado en estudios previos un buen comportamiento como inóculos y especies no-*Saccharomyces* poco estudiadas, pero que habían sido identificadas en repetidas ocasiones en distintas bodegas de la D.O.Ca. Rioja en anteriores trabajos de nuestro grupo de investigación (Ocón et al., 2013; Ocón, Gutiérrez, Garijo, López, & Santamaría, 2010; Ocón, Gutiérrez, Garijo, Tenorio et al., 2010).

La identidad de los aislados se confirmó mediante secuenciación del dominio D1/D2 del ARNr 26S. El siguiente paso fue la tipificación a nivel clonal de los aislados mediante RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)-PCR (Polymerase Chain Reaction), que evidenció una amplia diversidad clonal dentro de las especies estudiadas (González-Arenzana et al., 2016). Una vez identificadas, la relación de cepas incluidas en el estudio clasificadas por género y especie fue la que se muestra en la Tabla 3.

En estas etapas iniciales de aislamiento se comenzaron a evaluar algunas características relevantes en las levaduras para su empleo como inóculos en vinificación, como la tolerancia al SO₂. El uso extendido de este aditivo durante las elaboraciones para controlar la proliferación de microorganismos indeseables y los procesos de oxidación hace que la tolerancia de las levaduras al SO₂ sea esencial para asegurar su desarrollo en el mosto. Esta característica se estudió añadiendo diferentes concentraciones de SO₂ a los cultivos de las distintas cepas en medio líquido y comparando su crecimiento con el de los cultivos control a los que no se había añadido SO₂. El crecimiento de los aislados se determinó por espectrofotometría a las 24 y a las 48 horas. Los resultados mostraron una amplia variabilidad entre los clones de una especie respecto a su tolerancia al SO₂, lo que indica que se trata de un carácter cepa-dependiente que ha de tenerse en cuenta en los procesos de selección de levaduras para vinificación.

Tabla 3: Número, periodo, bodegas y lugar de aislamiento de las levaduras no-*Saccharomyces* incluidas en el programa de selección.

Género/Especie	Número	Periodo	Bodegas	Lugar
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	21	1998-2004	7	Depósito (FA), Instalaciones
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	16	1997-2004	8	Depósito (FA), Instalaciones
<i>Lachancea thermotolerans</i>	16	1998-1999	4	Depósito (FA),
<i>Pichia kluyveri</i>	2	1999-2009	2	Viñedo, FA
<i>Candida</i> spp.*	13	2001-2002 y 2007	2	Depósito (FA), Instalaciones, Aire
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	7	1998-2001	4	Depósito (FA)
<i>Issatchenkia orientalis</i>	1	2003	3	Depósito (FA)
<i>Williopsis pratensis</i>	11	2008-2009	1	Aire
<i>Cryptococcus</i> spp.*	7	2008-2009	3	Aire
<i>Debaryomyces hansenii</i>	3	2007-2009	4	Aire, Instalaciones
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	6	2008-2009	3	Aire

*Especies diferentes

También se estudiaron las posibles interacciones de las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* con otras levaduras presentes en las vinificaciones. En primer lugar, se evaluó la producción de toxinas killer por parte de los aislados de levaduras no-*Saccharomyces*. La actividad killer se determinó en placas Petri comprobando la presencia o ausencia de halos de inhibición. Para ello, las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* se sembraron sobre un césped formado por cepas de *S. cerevisiae* de colección con fenotipo killer o sensible (González-Arenzana et al., 2016). Además, se evaluó en placa la capacidad de las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* para inhibir una cepa neutra comercial de *S. cerevisiae* procediendo de la misma manera que en el caso del estudio del factor killer, pero con el césped de la cepa comercial de *S. cerevisiae*. Los resultados mostraron que el fenotipo mayoritario entre las cepas estudiadas fue el neutro y ninguna de ellas presentó inhibición de la levadura comercial evaluada, por lo que el riesgo de existencia de interacciones negativas fue reducido (González-Arenzana et al., 2016).

Por otro lado, como característica interesante para el biocontrol de *B. bruxellensis*, se evaluó su inhibición por parte de las levaduras no-*Saccharomyces* en placa, de la misma forma

que se había realizado con la cepa comercial de *S. cerevisiae*. Sin embargo, ninguna de las cepas estudiadas presentó inhibición de *B. bruxellensis*.

Las siguientes etapas del proceso de selección de levaduras no-*Saccharomyces* que siguieron a este aislamiento y caracterización preliminar se detallan en este trabajo.

Capítulo III

Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis fue desarrollar un proceso de selección de levaduras no-*Saccharomyces* de la D.O.Ca. Rioja destinadas a ser empleadas como inóculos en la elaboración de vinos tintos de calidad. Con el fin de alcanzar este objetivo general, se llevaron a cabo los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar las actividades enzimáticas de diferentes aislados de levaduras no-*Saccharomyces* relacionadas con el aroma, con el color y con la clarificación del vino.
2. Evaluar el comportamiento enológico y la producción de compuestos aromáticos de diferentes aislados de levaduras no-*Saccharomyces* en fermentaciones puras y en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae*.
3. Determinar la implantación en el medio de los aislados de levaduras no-*Saccharomyces*, así como su permanencia durante la fermentación alcohólica en inoculaciones secuenciales con *S. cerevisiae*.
4. Estudiar el efecto que los diferentes aislados de levaduras no-*Saccharomyces* ejercían en el contenido de antocianos y estilbenos en el vino elaborado mediante fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae*.
5. Evaluar el comportamiento enológico de los inóculos de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionados en fermentaciones secuenciales con diferentes variedades de uva tinta (Tempranillo, Garnacha y Graciano).

Capítulo IV

Publicaciones

Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts

Rocío Escribano, Lucía González-Arenzana, Patrocinio Garijo, Carmen Berlanas, Isabel López-Alfaro, Rosa López, Ana Rosa Gutiérrez, Pilar Santamaría

Resumen

En esta etapa del proceso de selección se estudiaron las actividades enzimáticas presentes en 97 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* pertenecientes a diez géneros y especies diferentes (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *D. hansenii*, *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *P. kluyveri*, *Sporidiobolus* (*Sp.*) *salmonicolor*, *T. delbrueckii*, *Williopsis* (*W.*) *pratensis* y *Z. bailii*). Se evaluaron 13 enzimas diferentes relacionadas con el aroma, el color y la clarificación de los vinos. Las enzimas con influencia en el aroma estudiadas fueron esterasas, esterasas-lipasas, lipasas, aminopeptidasas (leucina arilamidasa, valina arilamidasa y cistina arilamidasa), y β -glucosidasa. Además, se evaluó la presencia de actividades sulfito reductasa (SR) e hidroxycinamato descarboxilasa (HCDC), que contribuyen a la presencia de defectos en el aroma del vino. Por otro lado, los vinilfenoles formados por la actividad HCDC pueden unirse a los antocianos formando pigmentos con gran estabilidad. Asimismo, otras enzimas relacionadas con el aroma son también responsables de mejoras en el color y en la clarificación de los vinos, como es el caso de las aminopeptidasas, ya que hidrolizan las proteínas y reducen la inestabilidad proteica. Por su parte, la actividad carbohidrolasa (pectinasa, celulasa, xilanasas y glucanasas) durante la maceración aumenta la extracción de compuestos que mejoran las características organolépticas y facilitan la clarificación y filtración del vino.

Los resultados de los análisis enzimáticos mostraron la presencia de esterasa y esterasa-lipasa en todas las especies estudiadas. Las esterasas catalizan la síntesis de ésteres que contribuyen al aroma secundario de los vinos, mientras que la actividad lipasa favorece la liberación de ácidos grasos provenientes de la uva o de los microorganismos presentes en el vino. En el caso de la actividad esterasa, fue detectada en todas las cepas incluidas dentro del género *Cryptococcus* spp. y de las especies *W. pratensis*, *Sp. salmonicolor*, *P. kluyveri* y *M. pulcherrima*, mientras que en el caso de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* se detectó en un 56% y un 94% de las cepas estudiadas respectivamente. Por otro lado, la actividad lipasa apenas fue detectada, con solo el 33% de las cepas de *Sp. salmonicolor* y el 12% de las cepas de *L. thermotolerans*.

La actividad proteolítica da lugar a un incremento de la concentración de aminoácidos en el vino, mejorando su contenido en nutrientes y favoreciendo la producción de compuestos aromáticos. Las actividades leucina arilamidasa, valina arilamidasa y cistina arilamidasa fueron

detectadas en la mayoría de las cepas de *W. pratensis* (100% de las cepas con leucina arilamidasa, 100% con valina arilamidasa y 90% con cistina arilamidasa). En las cepas de *L. thermotolerans* también se encontraron las tres actividades, aunque con porcentajes más bajos de positivos (100%, 94% y 6% respectivamente). En las cepas del resto de especies solo se detectaron una o dos actividades y en el caso de *D. hansenii*, no se encontró ninguna actividad proteolítica.

La acción de la enzima β -glucosidasa favorece la liberación de terpenos, compuestos aromáticos que normalmente se encuentran ligados a moléculas de glúcidos. La acción de la enzima rompe el enlace terpeno-glúcido y da lugar a la liberación de los terpenos, enriqueciendo el aroma del vino. La presencia de esta enzima fue significativa solo en las cepas de *Cryptococcus* spp. y *M. pulcherrima* (60% y 63% respectivamente). La actividad β -glucosidasa se detectó también en otras especies, pero con porcentajes más bajos (25% en *Candida* spp., 14% en *Z. bailli* y 6% en *L. thermotolerans*).

Los terpenos enlazados a moléculas de glúcidos se encuentran normalmente localizados en el hollejo de la uva, por lo que la actividad de las enzimas carbohidrolasas también contribuye a la liberación de estos precursores al mosto. Asimismo, debido a la degradación de los polisacáridos estructurales, la presencia de estas enzimas puede mejorar la extracción de sustancias relacionadas con el color, así como la extracción del mosto, la clarificación y la filtrabilidad del vino. La única especie en la que estaban presentes las cuatro enzimas carbohidrolasas (pectinasa, celulasa, xilanasa y glucanasa) fue *L. thermotolerans*, siendo además la única en la que se detectó la actividad xilanasa. Por otro lado, ninguna cepa de *W. pratensis* presentó actividad carbohidrolasa. En *Cryptococcus* spp. y *D. hansenii*, ambas levaduras no convencionales en los procesos fermentativos, un elevado porcentaje de las cepas presentó tres de las actividades. La actividad más extendida entre las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas fue la pectinasa, presente en nueve de las diez especies con porcentajes elevados en la mayoría de los casos.

En relación con los defectos aromáticos derivados del metabolismo de las levaduras, la liberación de compuestos volátiles azufrados ligada a la actividad SR puede contribuir a la aparición del carácter reducido en el vino. Los análisis realizados muestran una elevada presencia de la actividad SR en *T. delbrueckii* (100%) y *M. pulcherrima* (94%). En *Cryptococcus* spp. y *D. hansenii* la presencia fue menor (20% y 33% respectivamente), mientras que en el resto de especies esta actividad no fue detectada. Otra de las actividades enzimáticas que puede dar lugar a defectos aromáticos es la HCDC. Los vinilfenoles y etilfenoles formados por la descarboxilación de los ácidos ferúlicos y p-cumáricos aportan aromas defectuosos al vino. En este trabajo, solo el 50% de las cepas de *M. pulcherrima* presentaban esta actividad, mientras que en el resto de géneros y especies no fue detectada. Aunque resulte negativa para el aroma, la

presencia de la enzima HCDC puede contribuir a la mejora del color por la formación de aductos vinilfenol-antociano de gran estabilidad.

Atendiendo a los resultados obtenidos en el análisis de las actividades enzimáticas, las cepas estudiadas se clasificaron en perfiles enzimáticos con el fin de facilitar la selección de las más indicadas dentro de cada especie de acuerdo con las características del vino que se deseen modular. De esta forma, las cepas de cada especie se agruparon en perfiles teniendo en cuenta la presencia de actividades enzimáticas relacionadas con el aroma (esterasa, esterasa-lipasa, lipasa, leucina-arilamidasa, valina-arilamidasa, cistina-arilamidasa, β -glucosidasa, HCDC y SR) y con el color y la clarificación (pectinasa, celulasa, xilanasas, gluconasa, leucina-arilamidasa, valina-arilamidasa, cistina-arilamidasa y HCDC). En el bloque del aroma las principales diferencias en los perfiles dentro de cada especie se debieron a la presencia de esterasa, esterasa-lipasa y β -glucosidasa. Es por ello que los perfiles que se eligieron para la siguiente etapa de selección presentaban al menos estas tres actividades en el caso de *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *Z. bailii* y dos de ellas en el caso de las especies *D. hansenii*, *P. kluyveri*, *Sp. salmonicolor*, *T. delbrueckii*, *W. pratensis* y en otro de los perfiles seleccionados de *Z. bailii*. En cuanto a las actividades enzimáticas relacionadas con el color, cabe destacar la existencia de una cepa de *L. thermotolerans* con todas las actividades evaluadas (cuatro carbohidrolasas y tres aminopeptidasas), lo que la convirtió en una candidata ideal para la mejora del color y la limpidez del vino. En el resto de especies y géneros estudiados, se eligieron aquellos perfiles en los que estaban presentes un mayor número de actividades para continuar con el proceso de selección.

Este estudio ha mostrado la capacidad de levaduras no-*Saccharomyces* para producir enzimas extracelulares de interés enológico, observándose una elevada variabilidad intraespecífica, lo que pone de manifiesto la importancia de la selección de cepas. Una vez caracterizadas, es necesario continuar la investigación con el fin de analizar tanto la producción y la actividad de las enzimas como el desarrollo de las cepas seleccionadas en condiciones de vinificación.

Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones

Rocío Escribano, Lucía González-Arenzana, Javier Portu, Patrocinio Garijo, Isabel López-Alfaro, Rosa López, Pilar Santamaría, Ana Rosa Gutiérrez

Resumen

En este trabajo, 24 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* pertenecientes a ocho especies diferentes (*C. zeylanoides*, *Cr. uzbekistanensis*, *D. hansenii*, *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *W. pratensis* y *Z. bailii*) fueron estudiadas con el fin de conocer su comportamiento enológico y su capacidad para liberar compuestos aromáticos, comparándolas con *S. cerevisiae* como siguiente paso del proceso de selección.

Las vinificaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer estériles sellados con válvulas Müller, partiendo de mosto de la variedad Viura pasteurizado. Las diferentes levaduras se inocularon en el mosto a una concentración de 10^6 céls/ml. Para controlar su implantación, se tomaron muestras en condiciones asépticas transcurridos 7 días y al final de la fermentación (14 días). En los vinos obtenidos se realizó el análisis de diferentes parámetros enológicos, así como de su composición aromática.

Los resultados de los controles realizados mostraron una implantación total (100%) en la mayoría de las cepas estudiadas, con la excepción de las muestras inoculadas con *W. pratensis*, dos de las inoculadas con *C. zeylanoides* y la inoculada con *Cr. uzbekistanensis*. Debido a la incapacidad de estas cepas para desarrollarse en el mosto, fueron descartadas del estudio.

Con todos los datos procedentes de los análisis realizados (parámetros enológicos y compuestos aromáticos) en las muestras inoculadas con las diferentes especies de levaduras se construyó un dendrograma en el que aparecieron tres grupos diferenciados: A, B y C. La especie de referencia, *S. cerevisiae*, se ubicó en el centro del dendrograma, constituyendo el grupo B. Los resultados mostraron una clara diferenciación de esta especie en cuanto al consumo de azúcares, transformando casi el 40% durante los tres primeros días de fermentación y siendo la única capaz de obtener vinos secos. Además, *S. cerevisiae* fue la especie con mayor glucofilia. Las levaduras no-*Saccharomyces* quedaron repartidas entre los grupos A y C, dando lugar a vinos dulces en todos los casos. La especie *D. hansenii*, que presentó la menor capacidad fermentativa, se ubicó en el grupo A del dendrograma. Las otras dos especies incluidas en este grupo fueron *C. zeylanoides* y *M. pulcherrima*, las menos eficientes en cuanto a la relación azúcar consumido/etanol producido. *C. zeylanoides* fue la mayor productora de glicerol respecto al etanol

generado, pero alcanzó los niveles más elevados de acidez volátil entre las especies estudiadas. Además, presentó niveles muy elevados de acetoína, por encima del límite de 150 mg/l a partir del cual puede provocar aromas desagradables. Por otro lado, *M. pulcherrima* mostró también una producción elevada de glicerol, en este caso sin un aumento de la acidez volátil, siendo la especie con los valores más bajos obtenidos en este parámetro. Asimismo, en cuanto a compuestos aromáticos, esta especie produjo la mayor concentración de alcoholes superiores y destacó por los niveles producidos de 2-fenil etanol y 2-fenil etil acetato, compuestos responsables de aportar aromas florales y frutales al vino. También mostró valores elevados de diacetilo y acetoína, esta última por encima del límite deseable, así como de acetato de etilo, que podría causar desviaciones aromáticas. Las especies que se ubicaron en el grupo C del dendrograma fueron *Z. bailii*, *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans*. A pesar de ser una especie con bajo poder fermentativo, *Z. bailii* presentó un consumo muy alto de nitrógeno, comparable al de las levaduras con los mayores poderes fermentativos (*S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*). Además, fue la levadura con la segunda mayor producción de acidez volátil, solo por detrás de *C. zeylanoides*. Dio lugar a niveles elevados de glicerol, ácido málico y succínico y fue la única especie con fructofilia. Las otras especies del grupo C, *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* fueron las que mayor producción de etanol presentaron después de *S. cerevisiae*. Con respecto a los parámetros analizados, estas especies mostraron valores similares, lo que explica que aparecieran situadas muy cerca en el dendrograma. Las únicas diferencias significativas se encontraron en el glicerol, con mayores niveles en *L. thermotolerans*; en el ácido pirúvico, más elevado en *T. delbrueckii* y en los parámetros de acidez. La capacidad de *L. thermotolerans* para producir ácido láctico, ausente en el resto de especies, dio lugar a diferencias en los valores del pH y la acidez total de los vinos elaborados con esta levadura respecto a los elaborados con el resto de especies.

El siguiente paso fue analizar las diferencias encontradas entre los clones incluidos en el estudio. Las especies en las que existían diferentes clones fueron *M. pulcherrima* (cinco), *T. delbrueckii* (cuatro) y *L. thermotolerans* (cuatro). Las diferencias encontradas entre clones de la misma especie fueron menores que las observadas entre diferentes especies. En *M. pulcherrima*, las diferencias se detectaron en parámetros como el glicerol, la acidez total, la acidez volátil y el ácido succínico, además de en compuestos relacionados con el aroma como el 2-fenil etanol, 2-fenil etil acetato, acetato de etilo, acetoína y diacetilo. Estas diferencias explicaron la ubicación de los clones de *M. pulcherrima* en dos ramas del dendrograma, una en la que se agruparon los clones *Mp 23*, *Mp 25* y *Mp 29* y otra en la que se situaron los clones *Mp 28* y *Mp 36*. El primer grupo tenía valores similares en la mayoría de los parámetros analíticos, mientras que los clones *Mp 28* y *Mp 36* eran más parecidos en cuanto a su perfil aromático. En *T. delbrueckii* las diferencias fueron menores, y solo afectaron a parámetros como la acidez volátil, el ácido málico y compuestos aromáticos como el 1-butanol y el ácido isovalérico. Es por ello que la mayoría de

los clones de esta especie aparecieron agrupados juntos en el dendrograma. En cuanto a los clones de *L. thermotolerans*, aparecieron ubicados en dos ramas diferentes del dendrograma, diferenciadas principalmente por los parámetros de acidez. Se observó una gran variación en la producción de ácido láctico entre los clones que fue desde los 0,90 mg/l en *Lt 57* hasta los 4,20 mg/l en *Lt 54*. Otro de los compuestos que mostraron grandes diferencias entre clones fue la acetoína.

Los resultados obtenidos en el estudio mostraron el comportamiento fermentativo de las cepas seleccionadas y su capacidad para desarrollarse en el mosto. Ninguna de las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas fue capaz de completar la fermentación, lo que indicó la necesidad de emplearlas en inoculación secuencial con *S. cerevisiae*. Por otro lado, el análisis fisicoquímico y aromático de los vinos mostró diferencias notables entre las especies estudiadas, mientras que dentro de los clones de cada especie las diferencias fueron menores. Sin embargo, sí se encontró variación entre clones en parámetros importantes para la calidad del vino como la producción de ácido láctico, la acidez volátil, el acetato de etilo o la acetoína, lo que subraya la importancia de los programas de selección clonal dentro de las especies.

Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* yeasts

Rocío Escribano-Viana, Lucía González-Arenzana, Javier Portu, Patrocinio Garijo, Isabel López-Alfaro, Rosa López, Pilar Santamaría, Ana Rosa Gutiérrez

Resumen

En este trabajo se evaluó la formación de compuestos aromáticos y el comportamiento fermentativo de nueve levaduras no-*Saccharomyces* pertenecientes a seis especies (*T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *Z. bailii*, *W. pratensis*, y *C. zeylanoides*) y de dos inóculos mixtos de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* en proporción 70/30 en inoculaciones secuenciales con *S. cerevisiae*. Los resultados se compararon con los obtenidos en los vinos fermentados únicamente con una cepa comercial de *S. cerevisiae*.

Las fermentaciones se llevaron a cabo partiendo de 2 l de mosto de la variedad Tempranillo con 500 g de hollejos obtenidos por tratamiento mecánico de la uva. Las diferentes levaduras se inocularon a una concentración de 10^6 céls/ml y transcurridas 72 horas se inoculó *S. cerevisiae* en la misma concentración. Las muestras para el control de implantación de las levaduras se tomaron diariamente, sembrándose en placas Petri con medio CGA (Chloramphenicol Glucose Agar). Las colonias crecidas fueron identificadas mediante secuenciación. La composición aromática se analizó en dos momentos: tres días después de la inoculación de las levaduras no-*Saccharomyces* y al final de la fermentación. En los vinos obtenidos se analizaron diferentes parámetros como el pH, la acidez total, la acidez volátil, el ácido málico, el glicerol, el etanal, el grado alcohólico y los azúcares residuales.

Los controles de implantación mostraron diferencias en la evolución de las levaduras inoculadas. En el caso de *Z. bailii* y *W. pratensis*, la población disminuyó rápidamente a los tres días, con una implantación por debajo del 25%. *Z. bailii*, *W. pratensis*, *C. zeylanoides* y una de las cepas de *M. pulcherrima* (M28) habían desaparecido 24 horas después de la inoculación de *S. cerevisiae*, mientras que la otra cepa de *M. pulcherrima* (M29) lo hizo el quinto día. Las dos cepas de *L. thermotolerans* permanecieron en el medio hasta el quinto día y un día más tarde solo estaban presentes los dos clones de *T. delbrueckii* y los dos inóculos mixtos. En éstos últimos, la proporción de las especies (70/30) se mantuvo durante los primeros días de la fermentación hasta la inoculación de *S. cerevisiae*, tras lo cual la población fue disminuyendo progresivamente hasta su desaparición a los siete días. Como puede observarse, *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* fueron las levaduras que permanecieron durante más tiempo en el medio, participando en mayor medida en la fermentación y probablemente en las características del vino.

Con el fin de estudiar las diferencias en los perfiles aromáticos de las diferentes levaduras, se construyeron dos dendrogramas, uno para cada muestreo, incluyendo los compuestos aromáticos en los que se habían encontrado diferencias significativas. En el dendrograma correspondiente al primer muestreo (tres días después de la inoculación), *S. cerevisiae* apareció claramente separada de las levaduras no-*Saccharomyces*, que se agruparon en dos clusters, A y B. En el cluster A se encontraban agrupadas las especies *Z. bailii*, *W. pratensis*, *C. zeylanoides* y los inóculos mixtos *T. delbrueckii/L. thermotolerans*. El cluster B estaba constituido por las especies *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii*. De forma general, los clones de las diferentes especies aparecieron juntos en el dendrograma en este primer muestreo, lo que indica que no existían muchas diferencias aromáticas dentro de las especies de levaduras no-*Saccharomyces*, a excepción de *L. thermotolerans*, en la que los clones aparecieron separados en el dendrograma debido a diferencias significativas en algunos compuestos como el isobutanol, el metionol o el diacetilo. *S. cerevisiae* se diferenció de las levaduras no-*Saccharomyces* por las concentraciones más elevadas de alcoholes superiores, acetatos, ésteres y ácidos.

En el caso del muestreo realizado al final de la fermentación, la mayoría de las levaduras no-*Saccharomyces* se ubicaron en el cluster A, junto con *S. cerevisiae*, a excepción de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans*, que formaron el cluster B. Estas especies alcanzaron mayores niveles de alcoholes superiores, etil propionato, acetoína y diacetilo que las del cluster A. Sin embargo, cuando formaban parte de los inóculos mixtos, no mostraron diferencias respecto al resto de las especies, agrupándose en el dendrograma en el mismo cluster. Por otro lado, a pesar de encontrarse en el cluster A, *M. pulcherrima* estaba ubicada en otra rama, lo que indicó diferencias en la composición aromática frente a las otras especies del cluster A, debidas principalmente a la mayor concentración de compuestos como el isobutanol, el metionol y la suma de alcoholes superiores. El número de compuestos aromáticos en los que se detectaron diferencias significativas fue menor en este muestreo que en el inicial. Además, en este caso se encontraron diferencias en la composición aromática entre las especies de no-*Saccharomyces*, mientras que en el primer muestreo las principales diferencias se detectaron entre *S. cerevisiae* y las especies de levaduras no-*Saccharomyces*.

En cuanto al resto de parámetros analíticos, se observaron diferencias entre los vinos con inoculación secuencial y los elaborados únicamente con *S. cerevisiae* en compuestos como el glicerol y etanal, que presentaron concentraciones más elevadas en el caso de los vinos inoculados con levaduras no-*Saccharomyces*. El glicerol es un compuesto que contribuye a la untuosidad, el dulzor y la complejidad del vino, mientras que el etanal puede tener un efecto negativo en el aroma, además de formar uniones con el SO₂, limitando su efecto. Por otro lado, este compuesto puede contribuir a la estabilidad del color del vino mediante la formación de aductos con las antocianinas, así como a través de su participación en las reacciones tanino-antociano. Todas las

fermentaciones secuenciales con levaduras no-*Saccharomyces* presentaron un aumento en la producción de etanal, con la excepción de *M. pulcherrima*, que tuvo niveles similares a los de *S. cerevisiae*. En las fermentaciones con levaduras no-*Saccharomyces* también se produjo un mayor consumo de ácido málico que el observado en *S. cerevisiae*. Por otro lado, los niveles de acidez volátil detectados en los vinos de las inoculaciones secuenciales, excepto en el caso de *L. thermotolerans*, tendieron a ser menores que en los fermentados con *S. cerevisiae*, aunque sin diferencias significativas. No obstante, este resultado se opone a la percepción que tradicionalmente se ha tenido de las levaduras no-*Saccharomyces* como grandes productoras de ácido acético.

El estudio de la evolución del aroma llevado a cabo en este trabajo mostró diferencias entre las levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* a los tres días de fermentación, mientras que los resultados obtenidos al final de la misma mostraron perfiles similares entre los vinos de la inoculación secuencial con no-*Saccharomyces* y los inoculados únicamente con *S. cerevisiae*. Solo los vinos inoculados con *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans*, levaduras que permanecieron durante más tiempo en el medio, se diferenciaron de los demás por su perfil aromático. Este resultado demuestra la utilidad de la inoculación secuencial no-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* para modular las características del vino, así como la importancia del tiempo de permanencia del inóculo en el medio, de manera que pueda participar de forma apreciable en la fermentación y en consecuencia en las propiedades del vino.

Effect of the sequential inoculation of non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* on the anthocyanins and stilbenes composition of Tempranillo wines

Rocío Escribano-Viana, Javier Portu, Patrocinio Garijo, Rosa López, Pilar Santamaría, Isabel López-Alfaro, Ana Rosa Gutiérrez, Lucía González-Arenzana

Resumen

Los compuestos fenólicos son responsables de características del vino como el color, la astringencia y las propiedades antioxidantes. La cantidad de compuestos fenólicos que se transfieren de la uva al vino durante la maceración puede variar debido tanto a las condiciones del proceso como a la microbiota presente en el vino. Con el fin de evaluar la capacidad de las levaduras para modular el color y las propiedades antioxidantes del vino, en este trabajo se estudió la composición de antocianos y estilbenos en vinos elaborados mediante inoculación secuencial con nueve cepas de levaduras no-*Saccharomyces* y dos inóculos mixtos de levaduras no-*Saccharomyces*, así como en vinos elaborados con *S. cerevisiae*. Las levaduras no-*Saccharomyces* empleadas pertenecían a seis especies diferentes: *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*, *Z. bailii*, *W. pratensis*, y *C. zeylanoides*. Los inóculos mixtos estaban formados por *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* (LT) en una proporción 30/70 respectivamente.

Las elaboraciones se llevaron a cabo por duplicado en recipientes con 2 l de mosto de la variedad Tempranillo y 500 g de hollejos. Las diferentes levaduras se inocularon a una concentración de 10^6 céls/ml y, en el caso de las fermentaciones secuenciales, transcurridas 72 horas se inoculó *S. cerevisiae* en la misma concentración. Se realizaron controles de implantación de las levaduras inoculadas diariamente tomando las muestras de forma aséptica y sembrándolas en placas Petri con medio CGA. Las colonias crecidas fueron identificadas mediante secuenciación del ADN. Los vinos elaborados se caracterizaron mediante el análisis de parámetros como el grado alcohólico, el pH, la acidez total, la intensidad colorante (IC), la tonalidad, la acidez volátil, el ácido málico, el ácido láctico, el glicerol, el etanal, los azúcares residuales y el índice de polifenoles totales (IPT). El análisis de las antocianinas y los estilbenos se llevó a cabo por HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector), llevando a cabo un proceso previo de purificación mediante extracción en fase sólida en el caso de los estilbenos.

El seguimiento de la implantación de las levaduras en el muestreo realizado a las 24 horas de la inoculación mostró diferentes porcentajes de implantación entre las levaduras. Así, *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* tuvieron una implantación total (100%), *S. cerevisiae* supuso el 90% de la población identificada, *C. zeylanoides* el 85%, *M. pulcherrima* el 70%, *W. pratensis* el

60% y *Z. bailii* el 35%. Los inóculos mixtos mantuvieron en este primer muestreo la proporción inicial, con un 30% de *L. thermotolerans* y un 70% de *T. delbrueckii*. En el muestreo realizado a los tres días, *S. cerevisiae* se había implantado al 100%; *C. zeylanoides* suponía el 90% de la población identificada; *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* alrededor del 80%; *Z. bailii* el 30%; *W. pratensis* el 10% y los inóculos mixtos siguieron manteniendo la proporción inicial. En el muestreo llevado a cabo a los cinco días, *S. cerevisiae* constituía el 100% de la población de levaduras, *T. delbrueckii* el 40% y *L. thermotolerans* el 30%. En los inóculos mixtos la proporción fue de 30/60 y 30/50, mientras que las restantes especies ya no se detectaron en este muestreo.

Comparando los resultados del análisis de los vinos elaborados con las levaduras no-*Saccharomyces* en inoculación secuencial y los inoculados únicamente con *S. cerevisiae*, las diferencias más significativas se detectaron en parámetros como el IPT, el glicerol, los ácidos láctico y acético y el grado alcohólico. El contenido en glicerol fue significativamente mayor en los vinos fermentados con *W. pratensis*, el inóculo mixto LT y especialmente con *T. delbrueckii*. Las diferencias en el contenido en ácido láctico se detectaron en los vinos del inóculo mixto y en los elaborados con *L. thermotolerans*, que presentaron la concentración más elevada. Esta mayor concentración de ácido láctico dio lugar a variaciones significativas en el pH y la acidez total de los vinos elaborados con *L. thermotolerans*. En cuanto a la concentración de ácido acético, en las vinificaciones con no-*Saccharomyces*, excepto en el caso de *L. thermotolerans*, se observaron valores menores que en *S. cerevisiae*. El grado alcohólico fue menor en las elaboraciones con *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* y el IPT presentó valores mayores en *C. zeylanoides*, *Z. bailii*, *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima*, en la que se detectaron los valores más altos.

El análisis del contenido en antocianos mostró en los vinos fermentados con *S. cerevisiae* una concentración de 221 mg/l, de los cuales un 76% eran no acilados y el 24% acilados, no encontrándose diferencias entre ésta y las concentraciones de antocianos detectadas en los vinos elaborados con *W. pratensis*, *L. thermotolerans* y los inóculos mixtos LT. Los vinos que habían sido elaborados por inoculación secuencial con *W. pratensis*, *L. thermotolerans* y el inóculo mixto LT no presentaron concentraciones de antocianos significativamente mayores que los detectados en *S. cerevisiae*. En el caso de los vinos inoculados con *M. pulcherrima*, el contenido en antocianos fue de 303 mg/l, un 37% mayor que el de los elaborados sólo con *S. cerevisiae*, siendo la proporción de antocianos acilados y no acilados de un 78% y un 22% respectivamente. En la vinificación con *T. delbrueckii* se alcanzó una concentración de antocianos de 295 mg/l, un 33% mayor que la de *S. cerevisiae*, con una proporción de antocianos acilados y no acilados similar a la de los vinos fermentados con *S. cerevisiae*. En las fermentaciones con *Z. bailii* y *C. zeylanoides* el contenido en antocianos se incrementó un 36% y un 34% respectivamente en relación con *S.*

cerevisiae, presentando una proporción de antocianos acilados y no acilados similar a la detectada en *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*.

En cuanto a diferencias en la composición en antocianos y estilbenos entre clones de la misma especie, solo se observó una mayor concentración de petunidina-3-glucósido en el clon 54 de *L. thermotolerans* frente al clon 57. En el resto de compuestos no se encontraron diferencias ni en esta especie ni entre los clones de *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii*.

El análisis de la composición de estilbenos totales mostró concentraciones significativamente más elevadas en los vinos inoculados con *T. delbrueckii*, *C. zeylanoides*, *Z. bailii* y en comparación con los fermentados con *S. cerevisiae*, con valores un 71%, 117% y 122% más elevados respectivamente. Las vinificaciones con *S. cerevisiae* presentaron las concentraciones más bajas de estilbenos totales, así como de los grupos más importantes de estilbenos: *cis*-piceido, *trans*-piceido y *trans*-resveratrol. El contenido en *cis*-piceido fue un 45%, 66%, y 80% mayor en los vinos inoculados con *T. delbrueckii*, *C. zeylanoides* y *Z. bailii* respectivamente. En cuanto a la concentración de *trans*-piceido, en el tratamiento con *C. zeylanoides* fue el doble que la detectada con *S. cerevisiae* y en la vinificación con *Z. bailii* alcanzó un valor tres veces mayor. Los niveles de *trans*-resveratrol mostraron valores tres veces mayores que los de *S. cerevisiae* en el tratamiento con *T. delbrueckii* y en *Z. bailii* el contenido fue 4,5 veces mayor.

Los resultados del estudio muestran la influencia de las levaduras seleccionadas en la calidad del vino, especialmente en su composición en antocianos y estilbenos, parámetros relacionados con el color y las propiedades antioxidantes. Teniendo en cuenta los resultados, el empleo de levaduras no-*Saccharomyces* como *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *Z. bailii* o *C. zeylanoides* como inóculos en la fermentación puede ser de interés para mejorar el color y las propiedades antioxidantes del vino.



Effect of the Sequential Inoculation of Non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* on the Anthocyanins and Stilbenes Composition of Tempranillo Wines

Rocío Escribano-Viana, Javier Portu, Patrocinio Garijo, Rosa López, Pilar Santamaría, Isabel López-Alfaro, Ana Rosa Gutiérrez and Lucía González-Arenzana*

Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino, CSIC, Gobierno de La Rioja, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Joaquín Bautista-Gallego,
Instituto de la Grasa (IG), Spain

Reviewed by:

Francesco Grieco,
Istituto di Scienze delle Produzioni
Alimentari (CNR), Italy
Aitor Balmaseda,
Rovira i Virgili University, Spain

*Correspondence:

Lucía González-Arenzana
lucia.gonzalez@icvv.es

Specialty section:

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

Received: 14 December 2018

Accepted: 26 March 2019

Published: 09 April 2019

Citation:

Escribano-Viana R, Portu J,
Garijo P, López R, Santamaría P,
López-Alfaro I, Gutiérrez AR and
González-Arenzana L (2019) Effect
of the Sequential Inoculation of Non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* on
the Anthocyanins and Stilbenes
Composition of Tempranillo Wines.
Front. Microbiol. 10:773.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00773

The phenolic compounds of red wines are responsible for their color, astringency, and antioxidant properties. The fermentative yeasts might be used to modulate wines in terms of their color, aroma and probably healthy properties. In this study, six non-*Saccharomyces* species were tested because they might enhance the properties of red Tempranillo wines from Rioja. The results confirmed that the anthocyanins and stilbenes composition of wine can be modulated with the use of a specific fermentation starter. *Metschnikowia pulcherrima*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida zeylanoides*, and *Torulasporea delbrueckii* achieved the greatest improvements of the monomeric anthocyanin composition, and the latter three yeast species achieved the best results of stilbene composition when compared to *S. cerevisiae* and the other non-*Saccharomyces* yeasts. Overall, results suggested that the use of *M. pulcherrima*, *Z. bailii*, *C. zeylanoides* and *T. delbrueckii* as fermentation starters could be of great interest to achieve wines with better color and likely healthy properties.

Keywords: wine color, anthocyanins, stilbenes, *Zygosaccharomyces bailii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulasporea delbrueckii*, *Candida zeylanoides*

INTRODUCTION

The phenolic compounds of red wines are responsible for their color, bitterness, astringency, antioxidant properties and aging behavior (Gonzalo-Diago et al., 2017). Wine color is one of the most relevant property that influences first consumer valuation (Kennedy, 2010). In addition, red wines with high phenolic content are more attractive due to their role in reducing the risk of cardiovascular disease and cancer (Dell'Agli et al., 2004).

Winemaking techniques influence the phenolic content of red wines, thereby determining wine quality. The quantity of phenolic compounds that are transferred from grape to wine during maceration varies according to the conditions of the process, and according to the microbial population present in the wine. Caridi et al. (2017) validated the main role that wine yeasts play in enhancing the quality of red wine from low-pigmented grapes. Thus, in recent years, yeast selection has included the development of techniques for detecting strains that might improve wines in terms of their color, structure, aroma and probable health properties (Suárez-Lepe and Morata, 2012).

Yeasts have an influence on wine's final chromatic characteristics through different routes. Some cases in point are the pectinase enzymes that they release during maceration (Belda et al., 2016). The role that yeast cell walls play in anthocyanin and tannins adsorption is due to the chemical interaction between yeast and polyphenols and to the metabolites that yeasts produce during alcoholic fermentation (AF) (Morata et al., 2003). For instance, some non-*Saccharomyces* (*S.*) such as *Lachancea* (*L.*) *thermotolerans* and *Torulaspota* (*T.*) *delbrueckii* yeasts enhanced the phenolic compositions of red Rioja wines (Garofalo et al., 2016). In previous research, it was also observed that the sequential inoculation of these same species, triggered different aromatic profiles than fermentation trials only with *S. cerevisiae* (Escribano-Viana et al., 2018).

Red wine color depends on anthocyanin extraction from grape skin and its stabilization in wine in a colored form. Pectinase enzymes have shown a considerable influence on releasing compounds entrapped in grape skin, facilitating the liberation of phenolic compounds. These enzymes come from grapes, commercial preparations and also from microorganisms (Belda et al., 2016). On the other hand, retention of pigments in yeast cell walls represents a direct loss of color (Morata et al., 2016). The negative charges of yeast cell walls provide the strains its adsorption ability toward the positively charged polyphenols of wines. Caridi et al. (2015) found significant differences between strains in terms of their aptitude to change wine color.

In addition, some metabolites, such as pyruvic acid and acetaldehyde, produced by yeasts during the glycolytic stage of AF, may condense with grape anthocyanins to produce highly stable pyranoanthocyanin adducts, such as vitisin A and B respectively (Morata et al., 2007). This reaction can lead to the stabilization of anthocyanins during wine aging. On account of this, the yeast ability to synthesize carbonyl compounds during fermentation directly impacts the formation of stable pigments, as they act as precursors of pyranoanthocyanins (Morata et al., 2016). Stabilization of anthocyanins can occur through reaction between anthocyanins and tannins to form pigmented tannins and through copigmentation of anthocyanins (Kennedy, 2010). Carew et al. (2013) showed that the yeast strain significantly affects both the concentration and composition of wine tannins as well as the degree of tannin polymerization. Moreover, vinylphenolic pyranoanthocyanin adducts are condensation products between vinylphenols and anthocyanins that show great color stability (Morata et al., 2007). Vinylphenols are originated during fermentation by the action of the hydroxycinnamate decarboxylase enzyme (HCDC) of yeasts. Yeasts with HCDC activity can also be used to decarboxylate hydroxycinnamic acids and form vinylphenols that condense with grape anthocyanins to produce vinylphenolic pyranoanthocyanin adducts.

Resveratrol is a stilbene compound cataloged as a polyphenol which has shown its health benefits *in vitro* and *in vivo* studies (Poulsen et al., 2014). Stilbenes are phytoalexins that are associated with plant resistance to fungal diseases as well as response to abiotic stresses. In grape berries, stilbene derivatives are mainly accumulated in the skin according to the localization of stilbene synthase, although they have also

been identified in seeds. The main stilbenes are both *trans* and *cis* forms of resveratrol and of its glucoside piceid. In wine, stilbenes concentration is greatly determined by the initial grape stilbene amount, but also by the winemaking process and fermentative microorganisms. In this respect, Sun et al. (2003) found that wines made with skin fermentation had greater amount of resveratrol than those made by carbonic maceration technique. Moreover, yeasts endowed with β -glucosidase activity enhance free resveratrol concentration in wine (Gaensly et al., 2015) and can reduce the risk of some diseases and modify the antioxidant capacity of wine (Brandolini et al., 2007).

Nowadays, the selection of new inocula should be carried out for new characteristics such as the potential to improve wine color and polyphenol content while enhancing quality and healthiness (Caridi and Sidari, 2009). Aimed to avoid wine homogenization, non-*Saccharomyces* culture starters with different biotechnological characteristics are being selected by oenologists and researchers although they should be combined with conventional fermentative *Saccharomyces* (*S.*) *cerevisiae* to avoid sluggish and spoiled fermentations (Rossouw and Bauer, 2016). The use of starters of selected non-*Saccharomyces* combined with *S. cerevisiae* has been shown as a way to produce high quality wines (Canónico et al., 2016). So that in the current research, six previously selected autochthonous non-*Saccharomyces* yeast species (González-Arenzana et al., 2016; Escribano et al., 2017) have been sequentially and individually inoculated and also one mixed-inoculum has been tested. The non-*Saccharomyces* yeasts were inoculated at the beginning of fermentation and 3 days later the inoculation of *S. cerevisiae* was conducted.

MATERIALS AND METHODS

Fermentation Trials

Ten individual fermentation trials were done in duplicate ($n = 2$) in small fermenters (Sampaio et al., 2007). Grapes from red Tempranillo variety were harvested in their optimum maturity moment. Then, in the experimental winery of the ICVV, those grapes were crushed and destemmed and liquid must was separated from solid grape skins (without pressing). After this, 2 l of must and 500 g of grape skins were measured and introduced into each flask. This initial grape must had 24.5 Brix or 14.5% probable alcoholic strength, 2.26 g/L malic acid, 4.9 total acidity expressed as g/L of tartaric acid, 3.73 pH and 181 mg/L of assimilable yeast nitrogen (including amino acids, except proline, and ammonia). Temperature was set at 25°C.

Eleven different assays were performed as it was described by Escribano-Viana et al. (2018). with ten oenological strains belonging to the following seven different yeast species: *Metschnikowia* (*M.*) *pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*, *Zygosaccharomyces* (*Z.*) *bailii*, *Williopsis* (*W.*) *pratensis*, *Candida* (*C.*) *zeylanoides*, and *S. cerevisiae* (VRB, Lallemand Bio S.L.). Two strains of every yeast species, one of *S. cerevisiae* and a combination of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* combined in percentages 30 and 70% were

tested. Every strain (except SVRB) were selected to enhance and diversify the quality of wines in the Rioja “Qualified” Designation of Origin (D.O. Ca.) Rioja, Spain and they were storage in the ICVV (Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino) collection.

The pre-culture of non-*Saccharomyces* yeasts was carried out in YPD liquid medium at 25°C for 48 h before flask inoculation with 10⁶ cells/mL. Nine pure cultures and one mixed culture of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (3 × 10⁵ and 7 × 10⁵ cells/mL, respectively, 30/70) were tested. In other assay, *S. cerevisiae* VRB commercial yeast was initially inoculated following the manufacturer’s instructions. Three days after the first inoculation, the commercial *S. cerevisiae* was inoculated in a proportion of 1 × 10⁶ cells/mL. During AF, the Brix degree decreases because of the conversion of sugars into ethanol. This parameter was daily analyzed with a digital refractometer. The reduction in the Brix degree was used for representing the fermentation kinetic. 14 days after inoculation wines were pressed, sulphited at 30 mg/L and left to settle for a week. Then, the wines were bottled (0.75 L) and chemically analyzed.

Sampling

Samples of 50 mL of the 11 assays were taken under aseptic conditions at three different moments: after filling flasks with must and skins and adding the inoculated yeast (day 1), before inoculating commercial *S. cerevisiae* (day 3) and 5 days after the beginning of the study (day 5).

Serial dilutions of samples were spreaded onto plates of a chloramphenicol glucose agar medium that were incubated at 25°C for 48 h. Colony forming units (CFU) were then counted. Precisely from every plate containing between 10 and 100 yeast CFU, 10 colonies were randomly selected (20 colonies for the combination L&T). The quick DNA extraction from the fresh yeast culture was conducted as López et al. (2008) suggested. Region D1/D2 of the 26S rDNA gene was amplified by PCR using primers and conditions described by Kurtzman et al. (2010). Then, the PCR products were purified and sequenced by MacroGen Inc. facilities (Amsterdam, Netherlands). The BLAST tool of the Gen Bank platform was employed (Altschul et al., 1990) to determine the species identification it was considered adequate when gene sequences showed identities of at least 98% with some of the sequences included in the Gen Bank database. To determine identities as correct, phylogenetic maximum likelihood tree was built with results of Gen Bank to corroborate the evolutionary correspondence.

Oenological Parameters of Wines

Wines were characterized by the alcohol strength by volume (ABV), pH, total acidity, color intensity (CI) and hue following Council Regulation (EC) N° 479/2008 (McLaren and Rigg, 1976; Commission Regulation, 2009). The acetic, L (–) malic acid and D(–) and L(+) lactic acids were measured by an enzymatic method with an automated clinical chemistry analyser (Miura One, TDI, Spain) and tartaric acid by the Rebelein method (Lipka and Tanner, 1974). Total phenolics were determined as total polyphenol index (TPI) by spectrophotometric absorbance at 280 nm after dilution of samples.

Analysis of Monomeric Anthocyanins and Stilbenes in Wine by HPLC-DAD

Anthocyanins were analyzed using an Agilent 1260 Infinity chromatograph, equipped with a diode array detector (DAD). The chromatographic procedure was as described by Portu et al. (2016) using a Licrospher®100 RP-18 reversed-phase column (250 × 4.0 mm; 5 μm packing; Agilent) with pre-column Licrospher®100 RP-18 (4 × 4 mm; 5 μm packing; Agilent). Column temperature was set at 40°C, the flow rate was established at 0.630 mL/min and the injection volume was 10 μL. Eluents used were (A) acetonitrile/water/formic acid (3:88.5:8.5, v/v/v), and (B) acetonitrile/water/formic acid (50:41.5:8.5, v/v/v). The linear solvent gradient was as follows: 0 min, 6% B; 15 min, 30% B; 30 min, 50% B; 35 min, 60% B; 38 min, 60% B; 46 min, 6% B.

Regarding stilbene analysis, a previous purification step was conducted by solid phase extraction (SPE) with PCX SPE cartridges (500 mg, 6 mL; Bond Elut Plexa, Agilent, Palo Alto, CA, United States) placed in a Gilson GX-271 Spec (Gilson Inc, Middleton, WI, United States) (Portu et al., 2015). The fraction obtained from the SPE step was analyzed by HPLC-DAD using an Agilent 1260 Infinity. The methodology was adapted from Portu et al. (2017). Wine samples were injected into a Licrospher®100 RP-18 reversed-phase column (Agilent) with pre-column Licrospher®100 RP-18 (Agilent), both thermostated at 40°C. Flow rate was at 0.500 mL/min and injection volume was 20 μL. Water/acetonitrile/formic acid (100:10:0.1, v/v/v) was the solvent A and acetonitrile was the solvent B. The linear solvent gradient was as follows: 0 min, 0% B; 20.8 min, 16% B; 32.8 min, 16% B; 49.4 min, 42% B; 60 min, 0% B.

Anthocyanins and stilbenes were identified according to the retention times of the available pure compounds and the UV-Vis data obtained from authentic standards and/or published in previous studies of β-glucosidase activity. Anthocyanins were quantified at 520 nm as malvidin-3-O-glucoside (Extrasynthèse, Genay, France); *cis*-piceid and *cis*-resveratrol were quantified at 305 nm as their corresponding *trans* isomers. Concentrations were expressed as milligrams per liter of wine (mg/L). The results correspond to the average of the analyses of two samples (*n* = 2).

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was carried out for all the parameters analyzed for the different assays with the IBM®SPSS®Statistic version 23. Significant differences were established by using the Tukey *post hoc* test (*p* < 0.01).

RESULTS

Implantation of Inoculated Yeasts and Strains

Data of implantation and kinetics control are included in a previous published research that was aimed at the study of the aroma evolution through AF (Escribano-Viana et al., 2018).

The first sampling showed that each inoculated species was implanted with different percentages. For instance, *T. delbrueckii*

and *L. thermotolerans* reached total implantation (100%); *S. cerevisiae* was 90% of the yeast population; *C. zeylanoides* reached 85%; *M. pulcherrima* 70%, *W. pratensis* 60%, and *Z. bailii* 35%. At this first sampling stage, the mixed inoculum seeded in a 30/70 ratio maintained this ratio.

At the second sampling moment, *S. cerevisiae* was 100 % of the yeast population, *C. zeylanoides* was 90%, *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, and *L. thermotolerans* was around 80%, *Z. bailii* reached 30%, *W. pratensis* 10% and the mixed inoculum maintained the initial ratio of 30/70.

Finally, at the third sampling moment, *S. cerevisiae* was 100% of the yeast population, *T. delbrueckii* 40% and *L. thermotolerans* 30%. The mixed inoculum LT was in a ratio of 30/55 and the remaining 4 yeast species were not found in the samples. The implantation of the two genotypes of each species were significantly equal.

Oenological Parameters of Wines

The wine initially vinified with *M. pulcherrima* had the lowest glycerine and reducing sugars content but the highest TPI value (Table 1). The sequential vinification with *T. delbrueckii* provided wines with the highest pH and glycerine concentration. In the case of *L. thermotolerans*, the wine had the lowest pH but in contrast, the reducing sugars, the total acidity, the lactic and acetic acids and the acetaldehyde content were the highest of the study. The mixed L&T culture provided an intermediate content of lactic acid and glycerine compared to the individual culture inoculation. The resulting wines made with the *Z. bailii* and *W. pratensis* sequential inoculation had

the highest ethanol content. Eventually, the wine inoculated initially and sequentially with *S. cerevisiae* showed the highest ethanol and malic acid content and the lowest reducing sugar, acetaldehyde, and TPI values.

Anthocyan and Stilbene Content After Alcoholic Fermentation

The total anthocyan content, for both the non-acylated and acylated anthocyanins are displayed in Figure 1. The vinification performed with *S. cerevisiae* yeast achieved 221 mg/L of total anthocyanins, of which 76% were non-acylated and 24% acylated. The vinifications after the sequential inoculation of the non-Saccharomyces yeasts *W. pratensis*, *L. thermotolerans* and the mixed L&T inocula did not achieve significant anthocyanin content compared to *S. cerevisiae*. The vinification performed initially by *M. pulcherrima* reached an anthocyanin content of 303 mg/L which was 37% significantly higher than that observed for *S. cerevisiae*. This total concentration was made up/composed of 78% non-acylated and 22% acylated anthocyanins. When sequential fermentation with *T. delbrueckii*, the total anthocyanins were 295 mg/L, which was 33% more than that observed with *S. cerevisiae*; of these, 76% were non-acylated and 24% acylated. In the case of fermentations with *Z. bailii*, the anthocyanin content was increased by 36% more than with *S. cerevisiae* and in vinifications in which *C. zeylanoides* was involved this increase was 34% higher. In both cases, the ratio of non-acylated and acylated was the same as that observed for *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii*.

TABLE 1 | Average oenological parameters assessed for wines sequentially tested with non-Saccharomyces species (*M.p*, *Metschnikowia pulcherrima*; *T.d*, *Torulopsis delbrueckii*; *L.th*, *Lachancea thermotolerans*; *L&T*, *L.th/T.d* 30/70; *Z.b*, *Zygosaccharomyces bailii*; *W.p*, *Williopsis pratensis*; *C.z*, *Candida zeylanoides*) and *S.c*, *Saccharomyces cerevisiae* with their standard deviation and results of statistical analysis.

Oenological parameters	<i>M.p</i>	<i>T.d</i>	<i>L.th</i>	<i>L&T</i>	<i>Z.b</i>	<i>W.p</i>	<i>C.z</i>	<i>S.c</i>
Ethanol content (v/v)	14.1 ± 0.0a	14.1 ± 0.1a	14.1 ± 0.1a	14.2 ± 0.0ab	14.3 ± 0.0b	14.3 ± 0.0b	14.3 ± 0.0b	14.3 ± 0.0b
Reducing sugars (mg/L)	1.78 ± 0.05a	2.08 ± 0.21a	3.68 ± 0.67b	2.58 ± 0.67ab	2.00 ± 0.00a	2.05 ± 0.21a	1.80 ± 0.14a	1.80 ± 0.00a
pH	3.69 ± 0.01bcd	3.75 ± 0.01e	3.46 ± 0.04a	3.63 ± 0.01b	3.70 ± 0.01de	3.67 ± 0.03bc	3.69 ± 0.00bcd	3.72 ± 0.01de
Total acidity (g/L tartaric acid)	5.26 ± 0.37ab	5.36 ± 0.09ab	6.90 ± 0.26c	5.71 ± 0.22b	5.32 ± 0.27ab	4.98 ± 0.08a	5.06 ± 0.05a	5.23 ± 0.21ab
Acetic acid (mg/L)	0.11 ± 0.02ab	0.09 ± 0.01a	0.19 ± 0.04b	0.13 ± 0.02ab	0.12 ± 0.04ab	0.14 ± 0.01ab	0.11 ± 0.07ab	0.16 ± 0.01ab
Malic acid (g/L)	1.87 ± 0.13bc	2.15 ± 0.04ab	1.88 ± 0.19ab	2.06 ± 0.15bc	1.62 ± 0.02a	1.46 ± 0.06a	1.44 ± 0.01a	2.46 ± 0.07c
Lactic acid (g/L)	0.17 ± 0.15a	0.20 ± 0.05a	3.38 ± 0.78c	1.11 ± 0.06b	0.16 ± 0.08a	0.04 ± 0.11a	0.17 ± 0.04a	0.16 ± 0.00a
Acetaldehyde (g/L)	12.2 ± 2.2b	23.8 ± 1.5a	29.5 ± 8.1b	24.8 ± 4.6ab	23.0 ± 1.4ab	14.0 ± 2.8ab	14.5 ± 2.1ab	11.0 ± 1.41a
Glycerine (g/L)	6.45 ± 3.63a	8.75 ± 0.24d	7.73 ± 0.13bc	8.2 ± 0.19cd	7.80 ± 0.14bc	8.00 ± 0.14c	7.85 ± 0.36bc	7.55 ± 0.07b
Hue	0.63 ± 0.15	0.61 ± 0.01	0.56 ± 0.05	0.56 ± 0.14	0.64 ± 0.01	0.74 ± 0.04	0.67 ± 0.01	0.71 ± 0.00
TPI	43.5 ± 1.3b	40 ± 0b	34.3 ± 1.9a	33.9 ± 1.8a	41.2 ± 0b	33.7 ± 0.6a	41.9 ± 3.1b	33.1 ± 1.18a
Cl	7.98 ± 0.62	7.70 ± 0.34	7.53 ± 1.25	6.43 ± 0.81	7.40 ± 0.00	5.30 ± 0.42	7.25 ± 0.50	5.30 ± 0.28

Different letters mean significant differences between the samples ($p < 0.01$). No letters mean no significant differences.

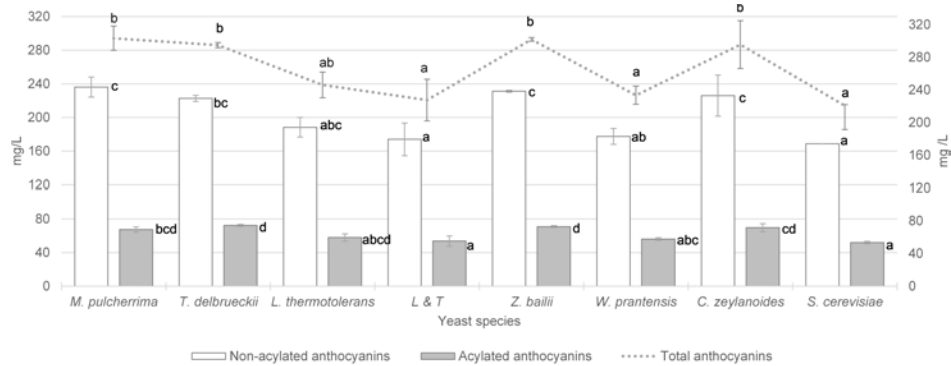


FIGURE 1 | Total anthocyanins content (mg/L) and content of non-acetylated and acetylated anthocyanins in wine vinified with different yeasts species. Error bars represent the standard deviation ($n = 2$). Different letters mean significant differences between the samples ($p \leq 0.01$). No letters mean no significant differences.

Table 2 shows average data ($n = 2$) of anthocyanins and stilbenes content of wine from sequential inoculation of two genotypes of *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, and *L. thermotolerans* yeasts species. Statistical analysis showed in the petunidin-3-glucoside after *L. thermotolerans* genotype 57 was significantly lower than that assessed for genotype 54.

No other significant differences were found among clones of the same species.

Table 3 shows the detailed anthocyanin average content analyzed in each of the fermentation processes. The content of cyanidin-3 acetylglucoside and of malvidin-3-caffeoylglucoside were not significantly different between

TABLE 2 | Average anthocyanins and stilbenes content ($n = 2$) in wines sequentially fermented with two clones of the yeast species *M.p.*: *Metschnikowia pulcherrima*, *T.d.*: *Torulaspota delbrueckii*, and *L.th.*: *Lachancea thermotolerans*.

Compounds	<i>M.p.</i> 28	<i>M.p.</i> 29	<i>T.d.</i> 18	<i>T.d.</i> 19	<i>L.th.</i> 54	<i>L.th.</i> 57
Anthocyanins (mg/L)						
Non-acetylated:						
Dp-3-glc	18.1 ± 2.9	18.5 ± 3.2	14.7 ± 0.8	17.1 ± 0.2	16.9 ± 3.1	15.2 ± 0.27
Cn-3-glc	1.22 ± 0.11	1.25 ± 0.08	1.12 ± 0.00	1.34 ± 0.08	1.44 ± 0.09	1.27 ± 0.03
Pt-3-glc	32.8 ± 2.6	33.8 ± 3.4	29.2 ± 0.4	29.6 ± 0.5	24.4 ± 3.6	22.8 ± 0.5
Pn-3-glc	7.82 ± 1.03	7.49 ± 0.84	8.71 ± 1.37	10.5 ± 0.5	11.9 ± 0.7b	8.66 ± 0.00a
Mv-3-glc	176 ± 8	175 ± 7	166 ± 0	167 ± 2	139 ± 9	135 ± 3
Acetylated:						
Dp-3-acglc	4.92 ± 0.08	5.05 ± 0.82	4.29 ± 0.19	4.29 ± 0.04	3.65 ± 0.06	3.57 ± 0.14
Cn-3-acglc	0.78 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.76 ± 0.02	0.71 ± 0.01	0.69 ± 0.04
Pt-3-acglc	2.12 ± 0.06	2.16 ± 0.14	1.97 ± 0.04	1.85 ± 0.12	1.61 ± 0.12	1.63 ± 0.13
Pn-3-acglc	0.82 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.80 ± 0.02	0.84 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.81 ± 0.03
Mv-3-acglc	7.10 ± 0.19	7.13 ± 0.21	6.66 ± 0.11	6.8 ± 0.0	5.67 ± 0.34	5.68 ± 0.31
Coumaroylated:						
Dp-3-cmglc	5.44 ± 0.24	5.38 ± 0.69	6.37 ± 0.06	6.01 ± 0.29	4.69 ± 0.52	4.19 ± 0.20
Cn-3-cmglc	1.24 ± 0.00	1.24 ± 0.06	1.37 ± 0.02	1.33 ± 0.03	1.19 ± 0.06	1.06 ± 0.03
Pt-3-cmglc	4.88 ± 0.19	4.70 ± 0.50	5.77 ± 0.70	4.93 ± 0.09	4.08 ± 0.48	3.57 ± 0.05
Pn-3-cmglc	4.46 ± 0.14	4.33 ± 0.22	5.27 ± 0.22	5.02 ± 0.05	4.67 ± 0.30	3.65 ± 0.00
Mv-3-cis-cmglc	1.33 ± 0.19	1.18 ± 0.03	1.40 ± 0.01	1.47 ± 0.01	1.63 ± 0.05	1.42 ± 0.23
Mv-3-trans-cmglc	33.6 ± 1.5	32.0 ± 2.1	37.2 ± 0.4	36.2 ± 0.2	30.9 ± 2.1	27.1 ± 0.6
Caffeoylated:						
Mv-3-cfglc	1.55 ± 0.08	1.54 ± 0.21	1.49 ± 0.12	1.67 ± 0.04	1.58 ± 0.23	1.30 ± 0.11
Stilbenes (mg/L)						
Trans-piceid	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.06	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.33 ± 0.10	0.28 ± 0.03
Cis-piceid	0.75 ± 0.03	0.80 ± 0.00	0.83 ± 0.01	0.83 ± 0.00	0.71 ± 0.07	0.62 ± 0.03
Trans-resveratrol	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.02

Dp, delphinidin; Cn, cyanidin; Pt, petunidin; Pn, peonidin; Mv, malvidin; glc, glucoside; acglc, acetylglucoside; cmglc, trans-p-coumaroylglucoside; cfglc, caffeoylglucoside. All parameters are listed with their standard deviation ($n = 2$). No letters mean no significant differences.

TABLE 3 | Average anthocyanins (mg/L) compounds in wines vinified with two strains of *Metschnikowia pulcherrima* (M.p), *Torulasporea delbrueckii* (T.d), *Lachancea thermotolerans* (L.t), *L. hfr.d* (L.&T), *Zygosaccharomyces ballii* (Z.b), *Candida zeylanoides* (C.z), and *Saccharomyces cerevisiae* (S.c), with their standard deviations and results of their statistical assessment.

Anthocyanins (mg/L)	M.p	T.d	L.th	L.&T	Z.b	W.p	C.z	S.c
Non-acylated								
Df-3-glc	18.3 ± 2.5b	15.9 ± 1.5ab	16.0 ± 2.0ab	11.7 ± 2.1ab	17.7 ± 10b	11.5 ± 1.7ab	17.4 ± 3.0b	8.80 ± 0.05a
Cn-3-glc	1.24 ± 0.08b	1.23 ± 0.14b	1.35 ± 0.11b	1.09 ± 0.08ab	1.25 ± 0.01b	0.99 ± 0.04ab	1.32 ± 0.10b	0.82 ± 0.13a
Pt-3-glc	33.3 ± 2.5b	29.4 ± 0.4ab	23.6 ± 2.3a	21.8 ± 3.2a	34.5 ± 0.6b	23.3 ± 1.7a	33.0 ± 4.6b	21.2 ± 0.1a
Pn-3-glc	7.65 ± 0.79ab	9.60 ± 1.33b	10.29 ± 1.99b	6.42 ± 1.13ab	5.99 ± 0.29ab	4.87 ± 0.54a	6.47 ± 0.79ab	3.38 ± 0.02a
Mv-3-glc	176 ± 6c	167 ± 1bc	137 ± 6ab	132 ± 13a	171 ± 1c	137 ± 5ab	168 ± 16c	135 ± 0a
Acetylated								
Df-3-acgic	4.98 ± 0.48abc	4.29 ± 0.11abc	3.61 ± 0.10a	3.74 ± 0.64ab	5.41 ± 0.09c	4.47 ± 0.50abc	5.13 ± 0.43bc	3.86 ± 0.08ab
Cn-3-acgic	0.78 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.70 ± 0.02	0.70 ± 0.04	0.80 ± 0.01	0.77 ± 0.02	0.80 ± 0.05	0.73 ± 0.06
Pt-3-acgic	2.14 ± 0.09bcd	1.91 ± 0.10abc	1.62 ± 0.10a	1.62 ± 0.16a	2.29 ± 0.01cd	1.79 ± 0.01ab	2.34 ± 0.23d	1.71 ± 0.03ab
Pn-3-acgic	0.84 ± 0.02abc	0.82 ± 0.03abc	0.81 ± 0.02ab	0.79 ± 0.03a	0.93 ± 0.03c	0.80 ± 0.01a	0.92 ± 0.02bc	0.76 ± 0.06a
Mv-3-acgic	7.12 ± 0.17b	6.74 ± 0.12ab	5.68 ± 0.26a	5.77 ± 0.53a	7.20 ± 0.12b	5.93 ± 0.19a	7.08 ± 0.49b	6.40 ± 0.06ab
Coumaroylated								
Df-3-cmgic	5.41 ± 0.42bcd	6.19 ± 0.27cd	4.44 ± 0.43ab	4.04 ± 0.57ab	6.96 ± 0.25d	4.77 ± 0.32abc	6.64 ± 0.64d	3.67 ± 0.31a
Cn-3-cmgic	1.24 ± 0.03bcd	1.35 ± 0.03cd	1.13 ± 0.08b	1.05 ± 0.10ab	1.39 ± 0.01d	1.16 ± 0.01bc	1.40 ± 0.01d	0.88 ± 0.03a
Pt-3-cmgic	4.79 ± 0.33ab	5.35 ± 0.64b	3.83 ± 0.40ab	3.53 ± 0.44a	5.38 ± 0.04b	3.99 ± 0.12ab	5.32 ± 0.42b	3.43 ± 0.29a
Pn-3-cmgic	4.40 ± 0.17bcd	5.15 ± 0.20c	4.16 ± 0.62abc	3.44 ± 0.44ab	4.54 ± 0.17bc	3.44 ± 0.01ab	4.48 ± 0.44bc	2.84 ± 0.12a
Mv-3-cus-cmgic	1.25 ± 0.14ab	1.44 ± 0.04ab	1.52 ± 0.18b	1.25 ± 0.13ab	1.28 ± 0.04ab	1.16 ± 0.00ab	1.25 ± 0.01ab	1.08 ± 0.06a
Mv-3-trans-cmgic	32.8 ± 1.8bcd	36.7 ± 0.6c	29.0 ± 2.5ab	26.4 ± 3.2ab	33.5 ± 0.8bc	26.3 ± 0.6ab	32.8 ± 2.2bc	25.0 ± 0.9a
Caffeoylated								
Mv-3-cfGlc	1.54 ± 0.13	1.58 ± 0.13	1.44 ± 0.22	1.40 ± 0.12	1.22 ± 0.01	1.48 ± 0.07	1.44 ± 0.20	1.55 ± 0.01

Dp, delphinidin; Cn, cyanidin; Pt, petunidin; Pn, peonidin; Mv, malvidin; glc, glucoside; acgic, acetylglucoside; cmgic, trans-p-coumaroylglucoside; cfGlc, caffeoylglucoside. All parameters are listed with their standard deviation (n = 2). Different letters mean significant differences between the samples (p ≤ 0.01). No letters mean no significant differences.

wines vinified with the different yeast species but several other significant differences were observed and described. *S. cerevisiae* fermentation was characterized by the lowest values of all the non-acylated anthocyanins and all the coumaroylated anthocyanins. The resulting wine of the sequential inoculation of *W. pratensis* had the lowest values of petunidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, peonidin-3-acetylglucoside and malvidin-3-acetylglucoside. In the case of the mixed culture *L&T*, it was observed that the wine had the lowest values of petunidin-3-glucoside, petunidin-3-acetylglucoside, petunidin-3-coumaroylglucoside, peonidin-3-acetylglucoside and malvidin-3-acetylglucoside. When *L. thermotolerans* was early inoculated alone, the final wines achieved the lowest contents of delphinidin-3-acetylglucoside, petunidin-3-acetylglucoside and malvidin-3-acetylglucoside but also the highest of cyanidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside and malvidin-3-*trans*-coumaroylglucoside. The wine vinified with *M. pulcherrima* showed the highest levels of most of the non-acylated anthocyanins and the highest of malvidin-3-acetylglucoside. The wine made with *T. delbrueckii* had the highest cyanidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, peonidin-3-coumaroylglucoside, malvidin-3-*cis*-coumaroylglucoside and malvidin-3-*trans*-coumaroylglucoside. *Z. bailii* and *C. zeylanoides* provided the wines with the highest content of most of the non-acylated anthocyanins, most of the acetylated ones and of delphinidin-3-coumaroylglucoside, cyanidin-3-coumaroylglucoside and petunidin-3-coumaroylglucoside.

The vitisin A and vitisin B contents are displayed in **Figure 2**. The highest content of vitisin A (around 4 mg/L) was found in wines vinified with *Z. bailii* and *C. zeylanoides* and the lowest (3 mg/L) in wine vinified with *L. thermotolerans*. With regard to vitisin B, *L. thermotolerans* was the vinification with the highest content (2 mg/L) while *M. pulcherrima*, *W. pratensis*, and *S. cerevisiae* had significantly lower concentrations of 50%.

Concentrations of stilbenes in wines are shown in **Figure 3**. The vinifications performed only with *S. cerevisiae* provided the lowest values of total stilbenes, *cis*-piceid, *trans*-piceid and *trans*-resveratrol. The total stilbene content was significantly higher in vinifications performed initially by *T. delbrueckii*, *C. zeylanoides*, and *Z. bailii* that were respectively 71, 122, and 117% higher than *S. cerevisiae* vinification. The *cis*-piceid content of wines were 45, 66, and 80% higher in wines fermented initially with *T. delbrueckii*, *Z. bailii*, and *C. zeylanoides*, respectively. Regarding the *trans*-piceid content, it was double that the content in fermentation initiated with *Z. bailii* than in *S. cerevisiae* vinification and three times higher in fermentation initiated by *C. zeylanoides*. The *trans*-resveratrol concentration in wines inoculated with *T. delbrueckii* was three times higher than in winemaking using *S. cerevisiae* and 4.5 times higher when *Z. bailii* was inoculated.

DISCUSSION

The percentage of implantation of the non-*Saccharomyces* yeasts differed with the species yet their presence was progressively

reduced since they were weeded in the initial must as it was described by Escribano-Viana et al. (2018). Just before *S. cerevisiae* inoculation, some species (*Z. bailii* and *W. pratensis*) were quickly lowered 3 days later. Every yeast species was able to establish in grape must under semi-industrial conditions. The yeasts that remained the longest time in tanks were *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans*, widely participating in winemaking and probably in the wine's features.

Oenological Parameters of Wines

Comparing the data obtained in the non-*Saccharomyces/Saccharomyces* fermentations with those carried out with *S. cerevisiae* alone, the most significant changes were in the TPI value, glycerine, lactic and acetic acids, and ABV.

The glycerine content increased in wines fermented with *W. pratensis*, *L. thermotolerans/T. delbrueckii* mix, and mainly with *T. delbrueckii*. Glycerine is the second yeast metabolite in relevance that contributes to smoothness, sweetness and wine complexity. Different authors have previously informed that some non-*Saccharomyces* yeasts could synthesize high glycerine contents in winemaking, mainly in the studies involving *T. delbrueckii* (Belda et al., 2015b). On the other hand, an increase in the lactic acid content was observed in those fermentations where *L. thermotolerans* was present. The capacity of *L. thermotolerans* to produce lactic acid (Gobbi et al., 2013) caused great variations in pH and total acidity values between the wines vinified with this species. This characteristic of *L. thermotolerans* could be a tool to adjust the acidity level in wines (Benito et al., 2015). Regarding the volatile acetic acid concentrations, every non-*Saccharomyces* yeasts, except *L. thermotolerans*, tended to produce lower rates than *S. cerevisiae*, despite non-*Saccharomyces* yeasts has been described as producer of important acetic acid quantities. In addition, a reduction of the alcohol strength was noted in fermentations with the presence of *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, and *L. thermotolerans*. The employment of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of ethanol levels of wine has previously been indicated by other authors (Gonzalez et al., 2013; Contreras et al., 2015; Canonico et al., 2016).

Finally, the TPI value was increased with *C. zeylanoides*, *Z. bailii*, *T. delbrueckii* and particularly with *M. pulcherrima*. Belda et al. (2016) had previously indicated the potential of *Metschnikowia pulcherrima*, used on a semi-industrial scale combined with *S. cerevisiae*, to improve color properties in red wine due to its pectinolytic activities.

Anthocyanin and Stilbenes Content After Alcoholic Fermentation

The results from the current work have confirmed that the wine's phenolic composition, in particular anthocyanins and stilbenes, can be considerably modulated with the selection of a specific fermentation starter.

With respect to the monomeric anthocyanin composition, the results have shown that *M. pulcherrima*, *Z. bailii*, *C. zeylanoides*, and *T. delbrueckii* achieved the greatest increase of total anthocyanins when compared to *S. cerevisiae* and the other

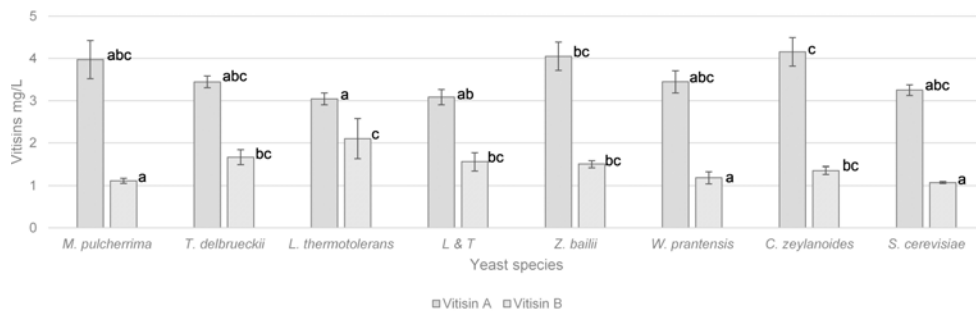


FIGURE 2 | Vitisin A and B content (mg/L) and in wines vinified with different yeasts species. Error bars represent the standard deviation ($n = 2$). Different letters mean significant differences between the samples ($p \leq 0.01$). No letters mean no significant differences.

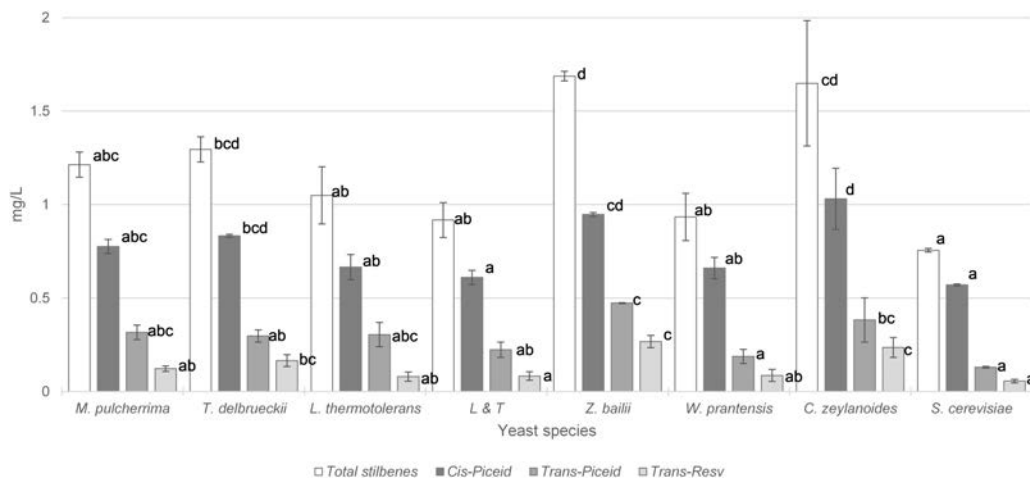


FIGURE 3 | Total stilbene content (mg/L) with the most important groups of stilbenes in wine vinified with different yeasts species. Error bars represent the standard deviation ($n = 2$). Different letters mean significant differences between the samples ($p \leq 0.01$). No letters mean no significant differences.

non-*Saccharomyces* yeasts. The importance of selecting the yeast starter in terms of wine color has been reported in previous works (Suárez-Lepe and Morata, 2012; Belda et al., 2015a, 2016). In this respect, *M. pulcherrima* has been proposed as a positive yeast for enhancing wine color. These authors also confirmed that *M. pulcherrima* displays polygalacturonase activity, which could explain the greater release of phenolic compounds during the AF. Sorrentino et al. (2012) also found that the combined inoculation of *M. fructicola* and a commercial *S. cerevisiae* yeast led to important improvements of wine anthocyanin content when compared with the commercial yeast alone.

Torulasporea delbrueckii has also been reported to increase anthocyanin content during AF. Recently, Chen et al. (2018) observed an increase in total anthocyanins for sequential fermentation of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* compared with fermentation conducted by *S. cerevisiae* alone. On another note, *T. delbrueckii* has been also shown to modulate other phenolic compounds in wine. In this respect, Ngqumba et al. (2017) observed that the influence of *T. delbrueckii* on the phenolic composition of wine (i.e., flavonols and phenolic acids) of cv.

Chenin blanc depended on the specific strain. This observation could be of great interest for selecting appropriate non-*Saccharomyces* strains for red wine production. Moreover, Carew et al. (2013) showed a high degree of tannin polymerization in wines made with *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*.

With respect to other yeast species, *S. pombe*, both alone or in combination with *L. thermotolerans* (Benito et al., 2015) improved the color of red wines by increasing several anthocyanins and vitisins with respect to *S. cerevisiae* alone. Moreover, these authors found that combined fermentation between *S. pombe* and *L. thermotolerans* or *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* showed higher concentrations in several anthocyanins than when *S. pombe* or *S. cerevisiae* fermented alone. The authors suggested that the latter result could be explained by a lower anthocyanin absorption by *L. thermotolerans* strain.

Benito et al. (2015) also observed that sequential fermentation with *P. guilliermondii* and *S. cerevisiae* both with high hydroxycinnamate decarboxylase (HCDC) activity promoted the formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins, which are long-term stable pigments, without unwanted organoleptic variations.

Moreover, this strategy allowed them to reduce the presence of *p*-coumaric acid (the precursor of 4-ethylphenol).

Regarding the influence of yeasts in stilbene composition, *C. zeylanoides*, *Z. bailii* and *T. delbrueckii* achieved the best results in terms of stilbene composition, especially when compared with *S. cerevisiae*. There is little information about the impact of wine microorganisms on wine stilbene composition. Since stilbenes are mainly located in grape skins, yeasts with enhanced enzymatic activities could presumably increase stilbene extraction from grape to wine. In this respect, treatment with pectinase before pressing was shown to increase stilbene content in Muscadine grape juice (Leblanc et al., 2008). In contrast, Lima et al. (2015) did not observe significant differences between doses of pectinase with regard to grape juice resveratrol content. Moreover, Gaensly et al. (2015) showed that differences in β -glucosidase activity could result in differences in wine resveratrol content. These authors observed that yeasts with β -glucosidase activity favored the hydrolysis of *trans*-piceid into *trans*-resveratrol without modifying the wine sensorial properties.

Overall, our results suggested that yeast selection has a great impact on quality, in particular on the anthocyanin and stilbene composition of wine. In this sense, the use of *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *Z. bailii*, and *C. zeylanoides* as fermentation starters could be of great interest in order to achieve wines with better color and health properties. These four yeast species provided an increase in TPI without increasing some negative organoleptic properties as acetic acid content. With the exception

of *T. delbrueckii*, the other three species disappeared from the environment when *S. cerevisiae* was added, and therefore, the end of AF is under the control of the latter species, thereby avoiding the possible negative effects on other wine parameters. In the case of *T. delbrueckii*, it also produced a very significant increase in the concentration of glycerine, a compound that also improved the organoleptic perception of red wines.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This study has been undertaken with a grant from the Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), Spain (Project RTA2013-0053-C03-03).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Victor Llop for his collaboration in laboratory analysis and Ian Thomas for revising the English of the text.

REFERENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Belda, I., Conchillo, L. B., Ruiz, J., Navascués, E., Alonso, A., and Marquina, D. (2015a). “Rational selection of yeasts based on their pectinolytic activities and its incidence on technological and sensorial aspects of wine quality,” in *Proceedings of the 6th European Congress of Microbiology-FEMS*, (Maastricht).
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., and Benito, S. (2015b). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulasporea delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1911–1922. doi: 10.1007/s00253-014-6197-2
- Belda, I., Conchillo, L. B., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., and Santos, A. (2016). Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 223, 1–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.003
- Benito, A., Calderón, F., Palomero, F., and Benito, S. (2015). Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules* 20, 9510–9523. doi: 10.3390/molecules20069510
- Brandolini, V., Fiore, C., Maietti, A., Tedeschi, P., and Romano, P. (2007). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on wine total antioxidant capacity evaluated by photochemiluminescence. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 581–586. doi: 10.1007/s11274-006-9268-4
- Canonico, L., Comitini, F., Oro, L., and Ciani, M. (2016). Sequential fermentation with selected immobilized non-*Saccharomyces* yeast for reduction of ethanol content in wine. *Front. Microbiol.* 7:278. doi: 10.3389/fmicb.2016.00278
- Carew, A. L., Smith, P., Close, D. C., Curtin, C., and Damberg, R. G. (2013). Yeast effects on Pinot noir wine phenolics, color, and tannin composition. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9892–9898. doi: 10.1021/jf4018806
- Caridi, A., De Bruno, A., De Salvo, E., Piscopo, A., Poiana, M., and Sidari, R. (2017). Selected yeasts to enhance phenolic content and quality in red wine from low pigmented grapes. *Eur. Food Res. Technol.* 243, 367–378. doi: 10.1007/s00217-016-2750-9
- Caridi, A., and Sidari, R. (2009). “Safety and healthiness enhancement of red wines by selected microbial starters,” in *Red Wine and Health*, ed. P. O’Byrne (New York, NY: Nova Science Publishers Inc.), 205–233.
- Caridi, A., Sidari, R., Kraková, L., Kuchta, T., and Pangallo, D. (2015). Assessment of color adsorption by yeast using grape skin agar and impact on red wine color. *J. Int. des Sci. de la Vigne et du Vin* 49, 195–203. doi: 10.20870/oenone.2015.49.3.81
- Chen, K., Escott, C., Loira, I., Del Fresno, J. M., Morata, A., Tesfaye, W., et al. (2018). Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiol.* 69, 51–63. doi: 10.1016/j.fm.2017.07.018
- Commission Regulation. (2009). *Commission Regulation (EC) No 606/2009 of 10 July 2009 Laying Down Certain Detailed Rules for Implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as Regards the Categories of Grapevine Products, Oenological Practices and the Applicable Restrictions. Official Journal of the European Union*, no. 606/20(No 479/2008). Brussels: Commission Regulation, 1–59.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C., and Varela, C. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 7–15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027
- Dell’Aglì, M., Busciala, A., and Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc. Res.* 63, 593–602. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.019
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., et al. (2017). Screening of enzymatic activities within different oenological non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Food Sci. Technol.* 54, 1555–1564. doi: 10.1007/s13197-017-2587-7
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., et al. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic

- fermentation sequentially inoculated with non- *Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Res. Int.* 112, 17–24. doi: 10.1016/J.FOODRES.2018.06.018
- Gaensly, F., Agustini, B. C., da Silva, G. A., Picheth, G., and Bonfim, T. M. B. (2015). Autochthonous yeasts with β -glucosidase activity increase resveratrol concentration during the alcoholic fermentation of *Vitis labrusca* grape must. *J. Funct. Foods* 19, 288–295. doi: 10.1016/J.JFF.2015.09.041
- Garofalo, C., Russo, P., Beneduce, L., Massa, S., Spano, G., and Capozzi, V. (2016). Non-*Saccharomyces* biodiversity in vine and the “microbial terroir”: a survey on Nero di Troia wine from the Apulian region, Italy. *Ann. Microbiol.* 66, 143–150. doi: 10.1007/s13213-015-1090-5
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., et al. (2013). Lachancea thermotolerans and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.004
- Gonzalez, R., Quirós, M., and Morales, P. (2013). Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends Food Sci. Technol.* 29, 55–61. doi: 10.1016/J.TIFS.2012.06.015
- González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., et al. (2016). Genetic and phenotypic intraspecific variability of non- *Saccharomyces* yeasts populations from La Rioja winegrowing region (Spain). *J. Appl. Microbiol.* 122, 378–388. doi: 10.1111/jam.13341
- Gonzalo-Diago, A., Tao, Y. S., Dizy, M., and Fernández-Zurbano, P. (2017). “Understanding the relationship between wine phenolic compounds and sensory properties: bitterness and astringency,” in *Phenolic Compounds: Types, Effects and Research*, eds T. Garde-Cerdán, A. Gonzalo-Diago, and E. P. Pérez-Álvarez (Hauppauge, NY: Nova Science Publishers), 29–56.
- Kennedy, J. A. (2010). “3 - Wine colour,” in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, ed. A. G. B. T.-M. W. Q. Reynolds (Sawston: Woodhead Publishing), 73–104. doi: 10.1533/9781845699284.1.73
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., and Boekhout, T. (2010). *The Yeasts: a Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier.
- Leblanc, M. R., Johnson, C. E., and Wilson, P. W. (2008). Influence of pressing method on juice stilbene content in muscadine and bunch grapes. *J. Food Sci.* 73, H58–H62. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00733.x
- Lima, M. S., Dutra, M. C. P., Toaldo, I. M., Correa, L. C., Pereira, G. L., de Oliveira, D., et al. (2015). Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. *Food Chem.* 188, 384–392. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.014
- Lipka, Z., and Tanner, H. (1974). Une nouvelle méthode de dosage rapide de l'acide tartrique dans les moûts, les vins et autres boissons (selon Rebelein). *Revue Suisse de Viticulture Arboric. Hortic.* 6, 5–10.
- López, I., Torres, C., and Ruiz-Larrea, F. (2008). Genetic typification by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* wine strains. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 547–555. doi: 10.1007/s00217-007-0755-0
- McLaren, K., and Rigg, B. (1976). SDC recommended colour-difference formula: change to CIELAB. *J. Soc. Dyers Colour* 92, 337–338. doi: 10.1111/j.1478-4408.1976.tb03300.x
- Morata, A., Calderón, F., González, M. C., Gómez-Cordovés, M. C., and Suárez, J. A. (2007). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food Chem.* 100, 1144–1152. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.11.024
- Morata, A., Gomez-Cordoves, M. C., Colomo, B., and Suarez, J. A. (2003). Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with Vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7402–7409. doi: 10.1021/jf0304167
- Morata, A., Loira, I., Heras, J. M., Callejo, M. J., Tesfaye, W., González, C., et al. (2016). Yeast influence on the formation of stable pigments in red winemaking. *Food Chem.* 197(Pt A), 686–691. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.026
- Ngqumba, Z., Ntushelo, N., Jolly, N., Ximba, B., and Minnaar, P. (2017). Effect of *Torulaspora delbrueckii* yeast treatment on flavonols and phenolic acids of Chenin blanc wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 38, 192–200.
- Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P., and Garde-Cerdán, T. (2016). Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. *Food Chem.* 201, 213–221. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.086
- Portu, J., López, R., Ewald, P., Santamaría, P., Winterhalter, P., and Garde-Cerdán, T. (2017). Evaluation of Grenache, Graciano and Tempranillo grape stilbene content after field applications of elicitors and nitrogen compounds. *J. Sci. Food Agric.* 98, 1856–1862. doi: 10.1002/jsfa.8662
- Portu, J., López-Alfaro, I., Gómez-Alonso, S., López, R., and Garde-Cerdán, T. (2015). Changes on grape phenolic composition induced by grapevine foliar applications of phenylalanine and urea. *Food Chem.* 180, 171–180. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.042
- Poulsen, M. M., Ornstrup, M. J., Harsløf, T., Jessen, N., Langdahl, B. L., Richelsen, B., et al. (2014). Short-term resveratrol supplementation stimulates serum levels of bone-specific alkaline phosphatase in obese non-diabetic men. *J. Funct. Foods* 6, 305–310. doi: 10.1016/J.JFF.2013.10.019
- Rossouw, D., and Bauer, F. F. (2016). Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food Microbiol.* 55, 32–46. doi: 10.1016/J.FM.2015.11.017
- Sampaio, T. L., Kennedy, J. A., and Vasconcelos, M. C. (2007). Use of microscale fermentations in grape and wine research. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 534–539. doi: 10.1021/jf801384v
- Sorrentino, A., Boscaino, F., Cozzolino, R., Volpe, M. G., Ionata, E., and La Cara, F. (2012). Autochthonous fermentation starters for the production of Anglicano wines. *Chem. Eng. Trans.* 27, 211–216.
- Suárez-Lepe, J. A., and Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends Food Sci. Technol.* 23, 39–50. doi: 10.1016/J.TIFS.2011.08.005
- Sun, B. S., Ferrão, C., and Spranger, M. I. (2003). Effect of wine style and winemaking technology on resveratrol levels in wines. *Cienc. Tecnol. Vitivinic.* 18, 71–91.

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 © 2019 Escribano-Viana, Portu, Garijo, López, Santamaría, López-Alfaro, Gutiérrez and González-Arenzana. 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) and the copyright owner(s) 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.

Do non-*Saccharomyces* yeasts work equally with three different red grape varieties?

Rocío Escribano-Viana, Patrocinio Garijo, Isabel López-Alfaro, Rosa López, Pilar Santamaría, Ana Rosa Gutiérrez, Lucía González-Arenzana

Resumen

En este trabajo se estudió el efecto a escala semiindustrial de la inoculación de las levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en las etapas anteriores del proceso, *M. pulcherrima* y el inóculo mixto *L. thermotolerans*/*T. delbrueckii* (70/30), comparándolo con el producido por la inoculación de *S. cerevisiae* en mostos de diferentes variedades de uva. Se emplearon tres variedades tintas de la D.O.Ca. Rioja: Tempranillo, Garnacha y Graciano. Durante la FA se realizó el control de la implantación de las levaduras inoculadas y en los vinos elaborados se analizaron los parámetros enológicos generales, parámetros relacionados con el color y compuestos aromáticos. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis discriminantes canónicos (ADC). Por otro lado, las diferencias entre los resultados de los análisis realizados tras la FML se observaron mediante clusters jerárquicos elaborados para cada variedad.

En los mostos de partida se analizaron los parámetros enológicos y se identificó la población de levaduras. Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado en depósitos de 30 l que se inocularon siguiendo tres estrategias diferentes. Las muestras control se inocularon tras el encubado con una cepa comercial de *S. cerevisiae* siguiendo las indicaciones del fabricante. Tres de los depósitos se inocularon con *M. pulcherrima* en una concentración de 10^6 céls/ml y los tres correspondientes al inóculo mixto se sembraron con *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* en una proporción 30/70, con concentraciones de 3×10^5 y 7×10^5 céls/ml respectivamente. A las 72 horas se inoculó la levadura comercial *S. cerevisiae* en los depósitos en los que se habían añadido previamente las levaduras no-*Saccharomyces*. Los controles de implantación de las levaduras inoculadas se realizaron en tres momentos: día 3 (antes de la siembra de *S. cerevisiae*), día 4 y día 7. Una vez finalizada la FA, se realizó un análisis fisicoquímico de los vinos, se determinaron parámetros relacionados con el color como IC, tonalidad, antocianos totales o IPT y se analizaron los compuestos aromáticos.

El ADC realizado a partir de los resultados de los análisis de los mostos de partida indicó dos posibles funciones canónicas (F) que explicaban el 100% de la variabilidad entre las muestras de las tres variedades. Las muestras de Tempranillo se separaron de las otras dos variedades por el eje F1, mientras que Garnacha y Graciano se separaron por el eje F2, quedando el mosto de Garnacha en la parte negativa del eje y el de Graciano en la parte positiva. Los mostos de

Tempranillo se caracterizaron por tener menor grado alcohólico probable y mayor pH y contenido en ácido málico, los de Graciano por su bajo grado probable y elevada acidez total, mientras que los mostos de Garnacha tuvieron un elevado grado probable y un bajo contenido en ácido málico.

Los controles de implantación de las levaduras inoculadas mostraron mejores resultados en las muestras de Tempranillo que en las de Garnacha y Graciano. El tercer día tras la siembra, en las muestras de Tempranillo inoculadas con *M. pulcherrima*, un 70% de la población correspondió a esta especie, mientras que en Garnacha y Graciano la implantación fue menor, con porcentajes del 53% y del 17% respectivamente. En las tres variedades, la presencia de *M. pulcherrima* se redujo tras la inoculación de *S. cerevisiae* y el cuarto día representaba un 30% de la población en Tempranillo, un 13% en Garnacha y un 7% en Graciano. En el último muestreo, en las tres variedades únicamente se identificaron levaduras de la especie *S. cerevisiae*.

En las siembras realizadas con el inóculo mixto, las levaduras colonizaron las fermentaciones de Tempranillo, suponiendo *T. delbrueckii* el 87% y *L. thermotolerans* el 13% de las colonias aisladas al tercer día de su adición. En Graciano el nivel de implantación fue de un 43% en *T. delbrueckii* y de un 6% para *L. thermotolerans*, mientras que en Garnacha el porcentaje encontrado fue el más bajo de las tres variedades, con un 23% de *T. delbrueckii* y un 17% de *L. thermotolerans*, no volviéndose a aislar ninguna de ellas en muestreos posteriores en las vinificaciones de dicha variedad. Una vez inoculada *S. cerevisiae*, el muestreo realizado al día siguiente mostró en Tempranillo una presencia del 47% de *T. delbrueckii* y un 13% de *L. thermotolerans*, mientras que en Graciano solo se encontró un 10% de *T. delbrueckii*. En el muestreo realizado a los siete días, solo se detectó *S. cerevisiae* en ambas variedades.

En las muestras correspondientes al control en la variedad Tempranillo llamó la atención la elevada presencia de *M. pulcherrima*, que alcanzó en el primer muestreo una proporción del 70% de la población de levaduras, lo que podría deberse a una transferencia procedente de los depósitos inoculados con esta levadura, ya que se encontraban en el mismo espacio de la bodega. En las demás variedades solo se detectó *S. cerevisiae* en los depósitos correspondientes al control.

Una vez completada la FA, se realizaron los análisis físicoquímicos de los vinos y se estudiaron estadísticamente los resultados realizando un ADC. Las diferentes estrategias de inoculación no dieron lugar a cambios importantes en los parámetros enológicos, por lo que las muestras de los diferentes tratamientos aparecieron juntas en la representación gráfica del ADC en Graciano y Garnacha. Únicamente los vinos de Tempranillo elaborados con el inóculo mixto aparecieron en el gráfico separados de los controles y de los inoculados con *M. pulcherrima* correspondientes a dicha variedad. Estos vinos se caracterizaron por un bajo pH y una elevada acidez total.

En el análisis estadístico de los parámetros del color tampoco se observó variabilidad entre tratamientos ni en Graciano ni en Garnacha. En el caso de la variedad Tempranillo, las muestras control y las inoculadas con *M. pulcherrima* presentaron un elevado índice de polifenoles totales, mientras que los vinos correspondientes al tratamiento con el inóculo mixto LT alcanzaron valores menores de este parámetro, lo que hizo que aparecieran separados de los otros dos tratamientos en la representación gráfica del ADC.



El análisis de los resultados de los compuestos aromáticos indicó una separación entre las muestras debida principalmente a las diferencias en el contenido de 1-propanol. Los vinos control de Graciano presentaron niveles más bajos de 1-propanol que los inoculados con *M. pulcherrima* y la mezcla *L. thermotolerans*/*T. delbrueckii*. Las muestras de Garnacha y Tempranillo también se diferenciaron por los contenidos en este compuesto y en ambos casos se observaron valores más altos en los vinos del inóculo mixto LT, seguidos de los inoculados con *M. pulcherrima* y por último los vinos del control. El 1-propanol aporta notas alcohólicas y a fruta madura, sin embargo, su límite de detección es de 306 mg/l, por encima de los valores obtenidos en los vinos inoculados con las levaduras no-*Saccharomyces*, por lo que es probable que la mayor concentración de este compuesto no diera lugar a una diferenciación sensorial de estos vinos. En las muestras de Tempranillo se observaron también diferencias en el contenido en acetato de hexilo, que se relaciona con aromas florales, a manzana, cereza y pera, con valores más elevados en el caso de las muestras control.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los parámetros enológicos y de color tras la FML mostró en Tempranillo y Garnacha una clara diferenciación de los vinos del inóculo mixto respecto de los vinos control. En el caso de Graciano, los vinos inoculados con *M. pulcherrima* fueron los que se diferenciaron del control.

Como muestran los resultados obtenidos en este trabajo, la mayor parte de las diferencias derivadas de las estrategias de inoculación se detectaron en las muestras de Tempranillo. Los cambios producidos en las características del vino podrían deberse a la mayor implantación y permanencia de los inóculos durante la fermentación en esta variedad. Las cepas de no-*Saccharomyces* empleadas en los inóculos habían sido originalmente aisladas en Tempranillo, lo que podría explicar su preadaptación a las condiciones del mosto de esta variedad.

Article

Do Non-*Saccharomyces* Yeasts Work Equally with Three Different Red Grape Varieties?

Rocío Escribano-Viana , Patrocinio Garijo, Isabel López-Alfaro, Rosa López, Pilar Santamaría, Ana Rosa Gutiérrez and Lucía González-Arenzana * 

ICVV, Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja, CSIC. Finca La Grajera, Ctra LO-20- salida, 13, 26071 Logroño, Spain; rocio.escribano@icvv.es (R.E.-V.); pgarijo@larioja.org (P.G.); isabel.lopez@unirioja.es (I.L.-A.); rosa.lopez@icvv.es (R.L.); psantamaria@larioja.org (P.S.); ana-rosa.gutierrez@unirioja.es (A.R.G.)

* Correspondence: lucia.gonzalez@icvv.es; Tel.: +34-941894980

Received: 4 November 2019; Accepted: 27 December 2019; Published: 31 December 2019



Abstract: The present study aimed to investigate the oenological changes induced by non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties from the Rioja Qualified Designation of Origin. Pilot plants fermentation of three different varieties, were conducted following early inoculations with *Metschnikowia pulcherrima* and with mixed inoculum of *Lachancea thermotolerans*-*Torulaspora delbrueckii* from La Rioja and compared to a wine inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. The microbiological and physicochemical characteristics of vinifications were analysed. Results showed that most of the variations due to inoculation strategies were observed in Tempranillo just after the alcoholic fermentation, probably because of the better adaptation of the inocula to the must's oenological properties. Finally, after the malolactic fermentation the inoculation with the mix of *Lachancea thermotolerans* and *Torulaspora delbrueckii* caused more changes in Tempranillo and Grenache wines while the early inoculation with *Metschnikowia pulcherrima* had more effects on Grenache wines. Therefore, the study was aimed to identify the fermentation effects of each inoculation strategy by using different non-*Saccharomyces* yeasts and different grape varieties.

Keywords: *Metschnikowia pulcherrima*; *Lachancea thermotolerans*; *Torulaspora delbrueckii*; Grenache; Graciano

1. Introduction

Grapes hold a diverse microbial population consisting of bacteria and yeasts that meet the microorganisms located in the winery facilities after the harvest. During the initial stages of the spontaneous alcoholic fermentation (AF), this pool of microbes achieves a balance until *Saccharomyces* (*S.*) *cerevisiae* becomes the main yeast in the fermentative process.

Early AF is characterized by a diverse yeast population, with low frequency of detection of *S. cerevisiae*, but with a high presence of non-*Saccharomyces* yeasts. The presence of unknown microbiota makes it a risky and unpredictable practice. Therefore, the inoculation of commercial *S. cerevisiae* strains has been widespread in the modern wine industry all over the World. Indeed, the non-*Saccharomyces* yeasts have not been well-regarded by oenologists and these have tended to make efforts to avoid their involvement in AF [1]. These traditional and conservative oenological practices have led to a homogenization and globalization of winemaking, a sameness in the taste and flavours of finished wines [2].

A general strategy to increase the diversification of wines has made oenology return to its origins of natural and diverse microbial populations. For this purpose, the employment of non-*Saccharomyces* yeast species has shown promising results. This new trend has triggered the studies and published

results of non-*Saccharomyces* yeasts which has led to some of them being used as commercial culture starters [1].

The use of mixed starter cultures of selected non-*Saccharomyces* combined with *S. cerevisiae* to avoid any stuck fermentations is thought to be a solution for ensuring AF completion, while various organoleptic characteristics involved in the quality of the final products are improved [2,3]. Furthermore, mixed cultures composed of more than one non-*Saccharomyces* species in combination with *S. cerevisiae* have been employed with the aim of simulating this complex yeast community present in spontaneous AF [4,5]. In general terms, the early inoculation of *Metschnikowia* (*M.*) *pulcherrima* has been aimed to improve flavour of wines [6]. In the case of *Lachancea* (*L.*) *thermotolerans*, the objective is the increase of lactic acid that would have also an impact in the aromatic profile of wines [7]. Moreover, *Torulasporea* (*T.*) *delbrueckii* has been initially employed for reducing the alcohol after the AF and for improving the aroma profile of wines [8].

The current study aims to describe the oenological effects of the sequential early inoculation of a pure culture of *M. pulcherrima* and a mixed culture of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* in the vinification of Tempranillo, Grenache and Graciano grape varieties. With this purpose, the impact dependent on the specific grape variety in semi-industrial conditions was analysed. To this end, the kinetics of AF, implantation rate, variation of the oenological, colour and aromatic parameters after AF and clustering after malolactic fermentation (FML) were individually performed for each grape variety.

2. Material and Methods

2.1. Grapes and Initial Must Samples of the Three Varieties

Grapes of the three red grape varieties from the D.O.Ca. Rioja, Tempranillo, Grenache and Graciano were employed to perform this study. These grape varieties were chosen for being important in the region where this study was developed but also, they are very present in international winemaking areas. When the grapes had reached an average probable alcohol by volume (APBV) of approximately 13%, around 225 k of each one were individually harvested, crushed and destemmed (Figure S1).

Samples of the three must were physicochemical characterized. APBV, pH and total acidity were analysed according to official ECC methods [9]. Malic acid was determined also by the official method [9]. by an enzymatic method carried out with an automated clinical chemistry analyser (Miura One, TDI, Madrid, Spain). The yeast assailable nitrogen (YAN) was measured following the protocol described by Aerny [10].

The three musts were also microbiologically characterised by plating the appropriate dilution on Chloramphenicol Glucose Agar (CGA 05% yeast extract, 20% glucose, 005% chloramphenicol, 17% agar,) plates, incubated at 28 °C for 48 h. Ten yeast colonies were isolated from each plate containing between 30 and 300 colony forming units per millilitre (CFU/mL). DNA was then extracted from fresh culture following the protocol determined by López et al. [11]. Then, a partial region of the 26S rDNA gene was amplified with PCR using the primers and conditions established by Cocolin et al. [12]. PCR amplicons were purified and sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The sequences were compared to the GenBank nucleotide database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [13]. The identification was considered appropriate if gene sequences showed identities of at least 98%.

2.2. Yeast Species

This study was performed with four oenological yeast species, *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* (VRB commercial yeast from Lallemand Bio S.L., Toronto, Canada). *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* were pure cultures while *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (L&T) were combined in percentages of 30% and 70%, respectively, following the natural combination of the two species observed in other studies of non-*Saccharomyces* population in Rioja red wines [14,15]. All these yeasts were selected in the Rioja Qualified Designation of Origin (D.O. Ca. Rioja) from Spain, and

they are in the last stage of the selection program. Furthermore, they are stored in the Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) collection. These yeast were identified by MacroGen Inc. with the amplified region D1 of the 26S rRNA gene using the primers NL1GC and LS2 [16].

2.3. Inoculation Procedure and Alcoholic Fermentation

The must of each variety were put into nine 30 L tanks that were kept at 25 °C to carry out the AF (Figure S1). When the tanks were filled, potassium metabisulphite was added to the samples to achieve a total SO₂ concentration of 50 mg/L.

After this, the 27 tanks were inoculated with the different yeasts following three different inoculation strategies. For each variety, three out of the nine tanks (n = 3) made up the control sample (C) and were inoculated with the commercial *S. cerevisiae* starter culture VRB™ following the producer's instructions, another three made up the sample early inoculated with *M. pulcherrima* (n = 3) (M) and the last three (n = 3) the sample early inoculated with a 30/70 mixture of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (L&T). The non-*Saccharomyces* yeasts had been pre-cultured in YPD liquid medium at 25 °C for 48 h with orbital shaking until the stationary phase. The concentration of cells/mL was counted with the Neubauer chamber. *M. pulcherrima* pure culture was inoculated in a concentration of 10⁶ cells/mL counted while the mixed culture contained 3 × 10⁵ cells/mL of *L. thermotolerans* and 7 × 10⁵ cells/mL of *T. delbrueckii*. Three days later, all the 27 tanks were inoculated with the *S. cerevisiae* starter culture VRB™ at a concentration of 1 × 10⁶ cells/mL.

The kinetics of AF was monitored by daily determination of the Brix degree and density decrease. Samples for implantation control were taken under aseptic conditions at three different moments. The first one was three days after harvest and initial inoculation with *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts (day 3). The second one was at the fourth day (day 4) when the 27 tanks had been inoculated with *S. cerevisiae* VRB™. Eventually, the third control of implantation was performed one week after the first inoculation (day 7) (Figure S1). At these three moments, serial dilutions were carried out and the samples were microbiologically characterized as described above (Section 2.1). With the sequencing results, the percentage of each species composing each replicate was determined.

When the 27 wines had reached about 990 g/L density, they were pressed and fermented to dryness. The AF was complete when reducing sugars were lower than 2 g/L. Then, the wines were characterized by measuring the alcohol by volume (ABV), pH, total acidity, volatile acidity, colour intensity and hue according to official ECC methods [9]. Moreover, the malic and lactic acids, glycerol and acetaldehyde contents were determined by an enzymatic method carried out by an automated clinical chemistry analyser (Miura One) and tartaric acid by the Rebelein method [17]. Furthermore, total anthocyanins were measured by decolouring using SO₂ [18] and total phenolics were determined as the total polyphenol index by spectrophotometric absorbance at 280 nm after dilution of samples. Ionized anthocyanins were determined according to Glories [19] and the polymerization index was calculated according to Ruiz [20].

2.4. Analytical Techniques

The analysis of fermentative volatile or aromatic compounds after the AF was performed using the method described by Ortega et al. [21] with some modifications. The extraction was carried out by 4 mL of sample, 9 mL of (NH₄)₂SO₄ saturated solution, 40 µL of internal standard solution (2-butanol, 4-methyl-2-pentanol, 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone, 2-octanol, and heptanoic acid, 40 mg of each of them in 100 mL of ethanol) and 300 µL of dichloromethane in tubes. The tubes were shaken for 1 h at 32 × g and then centrifuged at 3220 × g for 10 min. Once the phases were separated, the dichloromethane phase was recovered. Two µL was injected onto a Hewlett-Packard (Palo Alto, California, CA, USA) 6890 series II gas chromatograph. Separation was carried out with a DB-Wax capillary column (60 m × 0.32 mm I.D. × 0.5 µm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA).

2.5. Malolactic Fermentation
 2.5. Malolactic Fermentation

After AF, the wines were drawn off the lees and transferred to 15 L containers that were inoculated with the commercial LAB *Uvaferru alpha*[®] (Lallemand Bio S.L., Toronto, Canada) to carry out the MLF, at a temperature of 20 °C. The evolution of the fermentation was controlled by periodic determination of the malic acid content (g/L). After this, the wines were sulphited again and bottled. One month after MLF had ended, the wines were again analysed in terms of oenological and colour parameters, including the parameters described above for the AF (Section 2.2).

2.6. Statistical Treatment
 2.6. Statistical Treatment

The statistical analysis of physicochemical data consisted of two multivariate analysis performed with discriminant analysis and classification by a hierarchical cluster. The analysis of the discriminate capacity of the oenological parameters was assessed for each replicate (n = 3) of must and wines after AF. The hierarchical cluster was built with the averages of every oenological and colour parameter assessed by triplicates (n = 3) for the oenological parameters of samples after FML. Both analyses were carried out by using the statistical package IBM SPSS Statistic 20.0 (Chicago, IL, USA). Raw data of replicates employed for statistical analysis could be consulted in the Spreadsheet S1.

3. Results
 3. Results

3.1. Musts Physicochemical Characterization

Results of the statistical canonical discriminant analysis (CDA) of oenological parameters of must samples of Tempranillo, Grenache and Graciano are shown in Figure 1. The 100% of the variability between the three musts was explained by two possible canonical functions (F). F1 explained over 96.1% of variability and F2 3.9%, with both being significant.

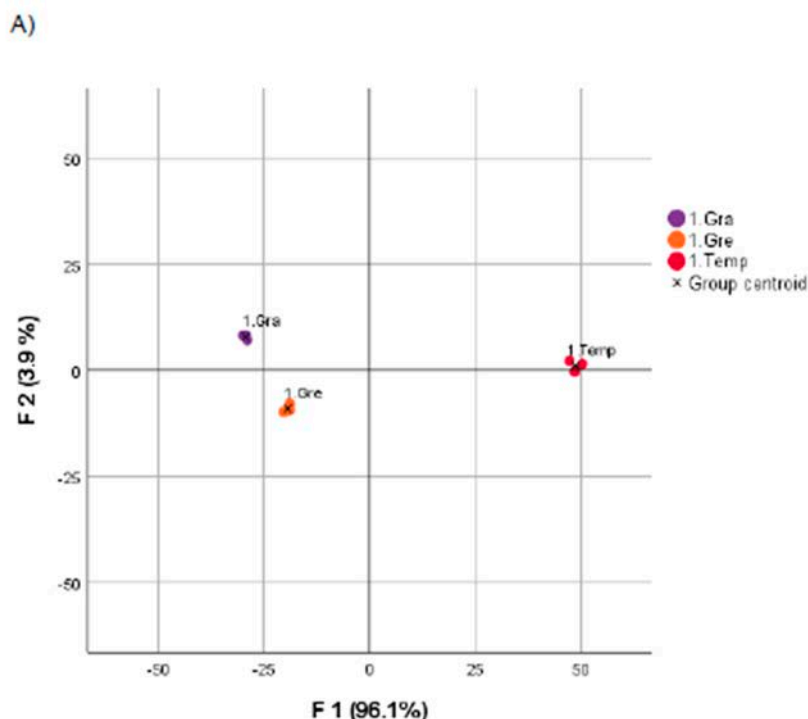


Figure 1. Cont.

Figure 1. Cont.

B)

Standardized canonical coefficients		
Oenological parameters	F 1	F 2
NFA	2.792	0.784
APBV (%)	-4.247	-0.804
pH	2.058	-0.130
Total acidity (acetic acid g/l)	-1.045	0.802
Malic acid (g/l)	0.444	1.198

Figure 1. (A) Canonical discriminant analysis of control initial must (1.) of Tempranillo (Temp), Grenache (Gre) and Graciano (Gra). (B) Standardized canonical coefficients of the two main discriminant functions (F1 and F2) obtained for oenological parameters.

All five analysed parameters contributed to the separation along F1, but APBV loading was the most dominant. F2 was also employed by the statistical software to construct the graph being mainly loaded by the malic acid content. The Tempranillo must sample was separated along F1 from the other two varieties. Grenache must was placed in the negative part of the F2 axis, and Graciano must on the positive F2 axis. Tempranillo had low APBV and the high pH and malic acid content while Grenache must was placed in the negative part of the F2 axis, and Graciano must on the positive F2 axis. Tempranillo had low APBV and the high pH and malic acid content while Graciano must also was characterised also by low APBV and high total acidity (data shown in Spreadsheet S1). The Grenache must had high APBV and low malic acid content (data shown in Spreadsheet S1).

3.2. Control of Yeast Populations and AF Kinetics in Each Grape Variety

3.2.1. Tempranillo

Results of the yeast population found in Tempranillo are shown in Figure 2A. The initial indigenous yeast population of Tempranillo must (day 0) was composed of 50% *Hanseniaspora (H.) uvarum*, 31% *S. cerevisiae* and the 19% remaining *T. delbrueckii* and *Cryptococcus (Cr.) laurentii*. The control sample of Tempranillo (C) before the second *S. cerevisiae* inoculation (day 3) was 50% *S. cerevisiae* and 70% *M. pulcherrima*. One day later (day 4), it was 77% *S. cerevisiae* and 23% *M. pulcherrima* and after a week (day 7) it was 100% *S. cerevisiae*. For samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M), at day 3, the yeast community was 60% *M. pulcherrima* and 30% *S. cerevisiae*, 7% *H. uvarum* and 3% *L. thermotolerans*. One day later (day 4), it was 77% *S. cerevisiae* and 23% *M. pulcherrima* and after a week (day 7) it was 100% *S. cerevisiae*. For samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) at day 3, the yeast community was 60% *M. pulcherrima* and 30% *S. cerevisiae*, 7% *H. uvarum* and 3% *L. thermotolerans*. One day later (day 4), the yeast community was composed of 70% *S. cerevisiae* and 30% *M. pulcherrima*. Eventually, after a week (day 7), all the identified yeasts were *S. cerevisiae*. In the case of Tempranillo grapes initially inoculated with *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (L&T), three days after their inoculation (day 3, the yeast community was 87% *T. delbrueckii* and 13% *L. thermotolerans*. One day after *S. cerevisiae* was inoculated (day 4), it reached 40% of the yeast community and 47% *T. delbrueckii* and 13% *L. thermotolerans* was found. Finally, a week after the first inoculation (day 7), all identified yeasts were *S. cerevisiae*.

Considering the AF completed when the Brix degree had values between five and seven, the control AF of Tempranillo was completed in six days and the other two (M and L&T) lasted a day longer (Figure 3A).

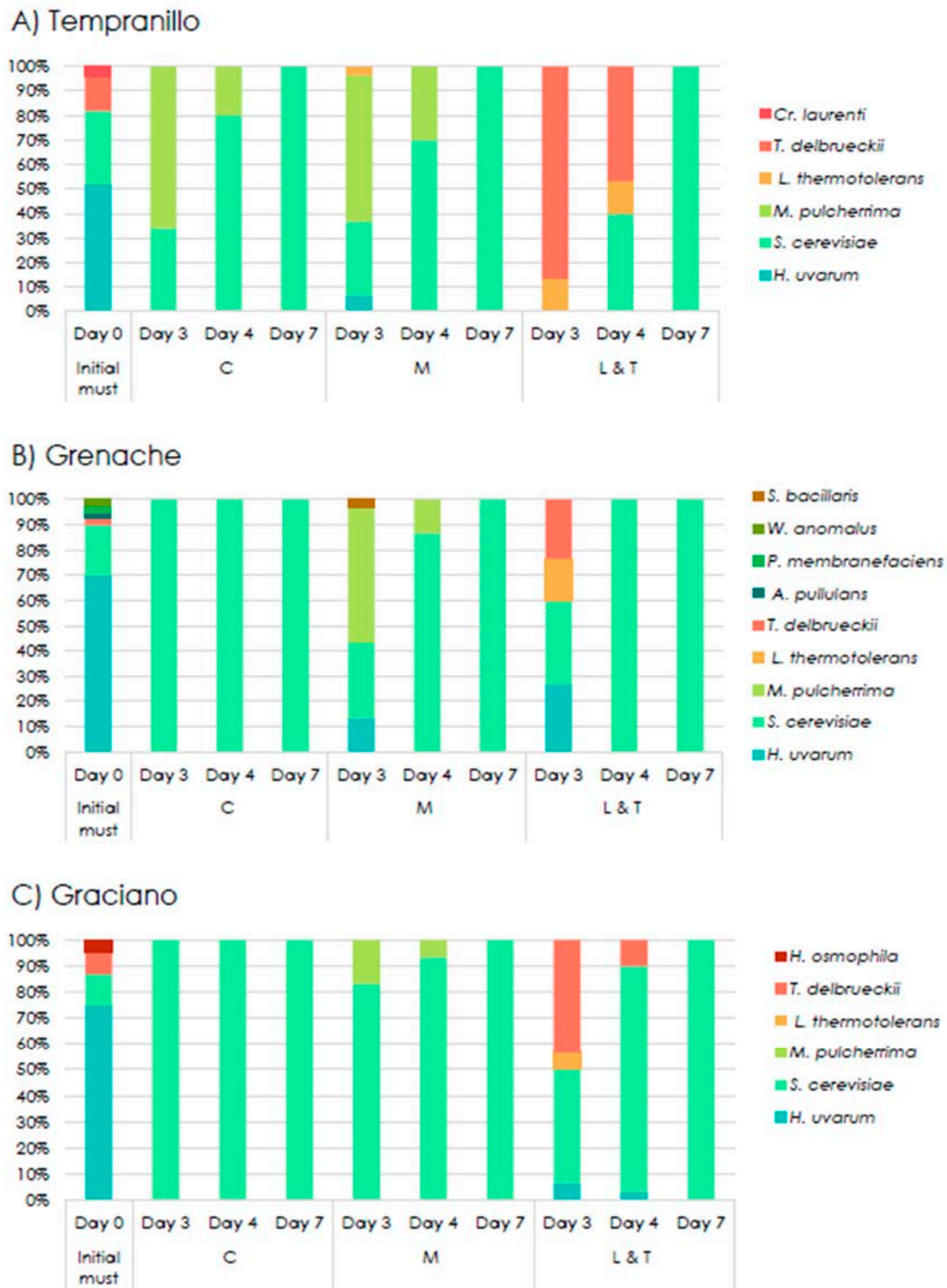


Figure 2. Percentage of yeast species in (A) Tempranillo, (B) Grenache and (C) Graciano, initial must (day 0), and control (C) samples and samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) and with a mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (L&T) during days 3, 4 and 7.

Considering the AF completed when the Brix degree had values between five and seven, the control AF of Tempranillo was completed in six days and the other two (M and L&T) lasted a day longer (Figure 3A).

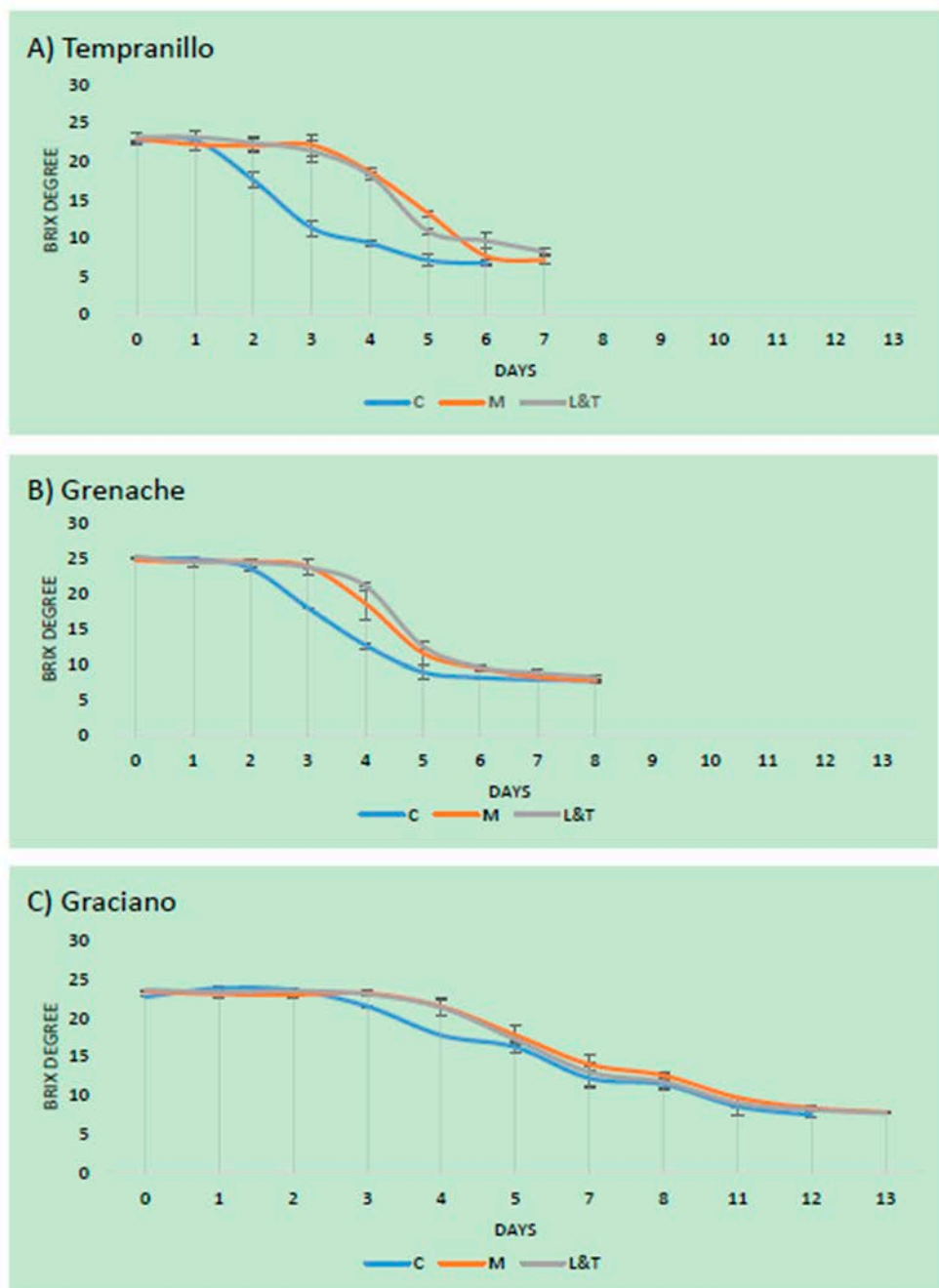


Figure 3. Brix degree measurement during alcoholic fermentation of control (C) samples and samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) and with a mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (L&T); (A) Tempranillo, (B) Grenache and (C) Graciano.

3.2.2. Grenache

The yeast population identified in Grenache are shown in Figure 2B. The initial Grenache must was composed of 70% *H. uvarum*, 20% *S. cerevisiae* and 10% of *M. pulcherrima*, *Pichia (P.) membranaefaciens*, *Aureobasidium (A.) pullulans* and *Williopsis (W.) anomalous* (day 0). In control (C) samples analysed three, four and seven days after the first inoculation of *S. cerevisiae*, all yeast isolates belonged to this species. Samples of Grenache inoculated with *M. pulcherrima* (M) were composed of 53% *M. pulcherrima*, 30% *S. cerevisiae* and 21% of *H. uvarum* and *Starmeryella (St.) bacillaris* at day 3. One day later (day 4), 87% *M. pulcherrima*, 9% *S. cerevisiae* and 21% of *H. uvarum* and *Starmeryella (St.) bacillaris* at day 3. One day later (day 4), 87% was *S. cerevisiae* and 13% *M. pulcherrima* and a week after the first inoculation (day 7), the entire yeast community was identified as *S. cerevisiae*. Grenache inoculated with *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (day 7), the entire yeast community was identified as *S. cerevisiae*. Grenache inoculated with *L.*

(L&T) were composed of 27% *H. uvarum*, 33% *S. cerevisiae*, 23% *T. delbrueckii* and 17% *L. thermotolerans* at day 3. The other two checks of implantation (days 4 and 7) showed that 100% of the yeast community was *S. cerevisiae*. In the case of the Grenache variety (Figure 3B), the control sample either ended AF in six days and the others in seven days. The kinetics of the AF control sample were quicker than the AF of the samples early inoculated with the non-*Saccharomyces* yeasts.

3.2.3. Graciano

The species identified in Graciano samples are shown in Figure 2B. The initial Graciano must (day 0) had 75% *H. uvarum*, 12% *S. cerevisiae*, and 13% of *T. delbrueckii* and *H. osmophila*. Control samples were composed of 100% *S. cerevisiae* at each sampling checked. The samples inoculated with *M. pulcherrima* (M) at the third day had 17% *M. pulcherrima* and 83% *S. cerevisiae*. One day later (day 4), *S. cerevisiae* was 93% and one week later (day 7) all the samples were composed of *S. cerevisiae*. The samples inoculated with *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (L&T) three days later (day 3) were made up of 7% *H. uvarum*, 43% *S. cerevisiae*, 43% *T. delbrueckii* and 6% *L. thermotolerans*. One day later (day 4), samples had 87% *S. cerevisiae* and one week later (day 7), they were composed solely of *S. cerevisiae*.

The Graciano AF kinetics (Figure 3C) of control samples and samples early inoculated with non-*Saccharomyces* yeasts were similar regardless of the inoculated yeasts used and took thirteen days to complete.

3.3. Characterisation of Wines

The statistical CDA of the oenological parameters of the samples of Tempranillo, Grenache and Graciano wines after AF, are shown in Figure 4. The variability between the samples ($n = 3$) was explained by four possible canonical functions (F) with statistical significance. F1 explained over 78.9% of variability and F2 15.2%, both explaining the 94.1% of the variance. Four out of the five assessed parameters contributed to the separation along F1, but the pH was the most influencer. F2 was mainly loaded by the total acidity, F3 and F4 (not included in the graph) were loaded by the volatile acidity. The three samples of Graciano wines stayed close in the negative part of axis F1 and Grenache and Tempranillo wines were separated by the axis 2. The three Grenache wines were clustered together. The sample of Tempranillo early inoculated with *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (LT) was separated from the other two types of Tempranillo wines (control –C- and inoculated with *M. pulcherrima* –M-).

Results of statistical CDA of the colour parameters of the samples of Tempranillo, Grenache and Graciano after AF, are shown in Figure 5. The variability between the samples ($n = 3$) was explained by four possible canonical functions (F) with statistical significance. F1 explained over 89.2% of variability and F2 8.3%, both explaining the 98.5% of the variance. The six colour parameters analysed contributed to the separation along F1 and F2, but the most important one was the total polyphenol index. F3 and F4 (not included in the graph) were loaded by the hue and the colour intensity, respectively. The three samples of Graciano wines stayed together in the positive part of axis F1 and Grenache and Tempranillo wines were in negative part of axis F1 and separated by the axis 2. The three Grenache wines were clustered together in the positive part of axis F2. The samples of Tempranillo were placed in the negative part of both axis and the samples early inoculated with *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (LT) were separated from the other two types of Tempranillo wines (control –C- and inoculated with *M. pulcherrima* –M-).

Figure 4. Cont.

B)

Standardized canonical coefficients

Oenological parameters	F 1	F 2	F 3	F 4
pH	0.690	0.755	-0.224	0.343
Total acidity (acetic acid g/l)	-0.481	0.978	-0.402	0.115
Volatile acidity (acetic acid g/l)	-0.116	-0.217	0.636	0.835
Lactic acid (g/l)	0.167	0.141	1.044	-0.254

Figure 4. (A) Canonical discriminant graph of oenological parameters in control samples (C), samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) and samples early inoculated with a mix of *L. thermotolerans* & *T. delbrueckii* (LT), after alcoholic fermentation (2.) of Tempranillo (Temp), Grenache (Gre) and Graciano (Gra) (B) Standardized canonical coefficients of the four main discriminant variables in functions (F1 and F2) for oenological parameters.

Results of statistical CDA of the colour parameters of the samples of Tempranillo, Grenache and Graciano after AF, are shown in Figure 5. The variability between the samples (n = 3) was explained by four possible canonical functions (F) with statistical significance. F1 explained over 89.2% of variability and F2 8.3% both explaining the 98.5% of the variance. The six colour parameters analysed contributed to the separation along F1 and F2, but the most important one was the total polyphenol index. F3 and F4 (not included in the graph) were loaded by the hue and the colour intensity, respectively. The three samples of Graciano wines stayed together in the positive part of axis F1 and Grenache and Tempranillo wines were separated by the axis 2. The three Grenache wines were clustered together. The sample of Tempranillo early inoculated with *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (LT) was separated from the other two types of Tempranillo wines (control -C- and early inoculated with *M. pulcherrima* -M-).

Results of statistical CDA of the colour parameters of the samples of Tempranillo, Grenache and Graciano after AF, are shown in Figure 5. The variability between the samples (n = 3) was explained by four possible canonical functions (F) with statistical significance. F1 explained over 89.2% of variability and F2 8.3% both explaining the 98.5% of the variance. The six colour parameters analysed contributed to the separation along F1 and F2, but the most important one was the total polyphenol index. F3 and F4 (not included in the graph) were loaded by the hue and the colour intensity, respectively. The three samples of Graciano wines stayed together in the positive part of axis F1 and Grenache and Tempranillo wines were separated by the axis 2. The three Grenache wines were clustered together. The sample of Tempranillo early inoculated with *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (LT) was separated from the other two types of Tempranillo wines (control -C- and early inoculated with *M. pulcherrima* -M-).

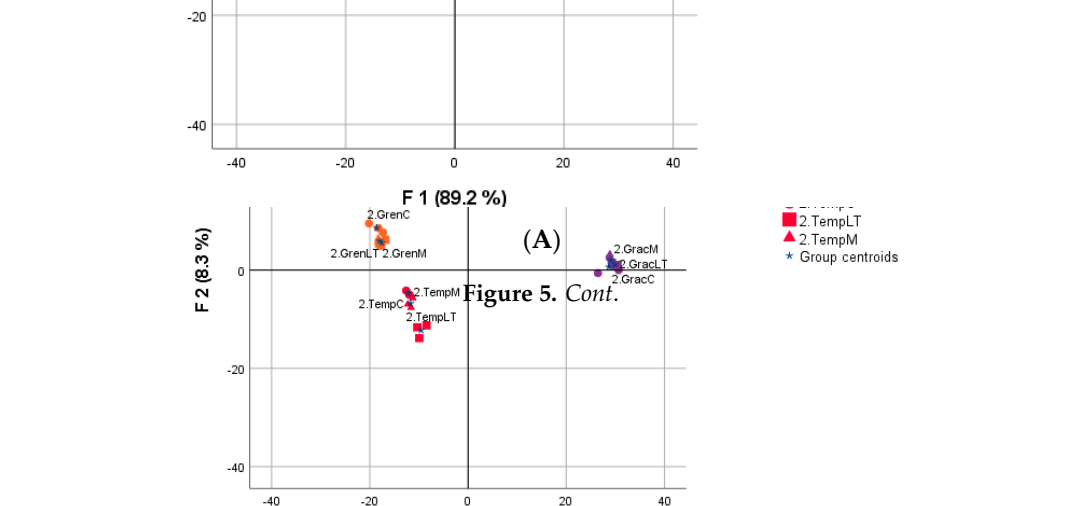


Figure 5. Cont.

Figure 5. Cont.

Standardized Canonical Coefficients.				
Colour Parameters	F 1	F 2	F3	F4
Colour intensity	1.380	-0.203	-0.164	-1.787
Hue	-0.136	0.303	1.255	0.080
Anthocyanins (mg/l)	0.658	-1.461	0.716	1.017
Total poliphenol index	-1.616	1.773	0.002	0.267
Ionization index	0.509	0.668	0.551	0.722
Polymerization index	-0.052	-0.246	-0.230	0.499

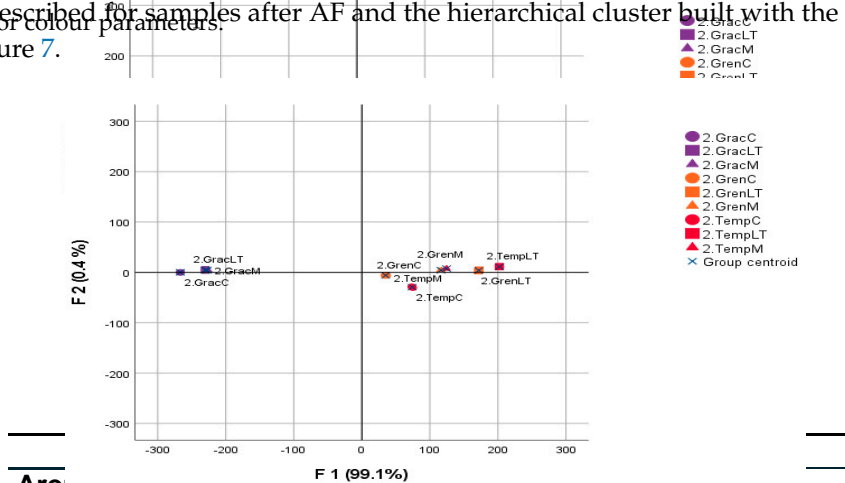
(B)

Figure 5. (A) Canonical discriminant graph of colour parameters in control samples (C), samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) and samples early inoculated with a mix of *L. thermotolerans* & *L. delbrueckii* (LT), after alcoholic fermentation (2) of Tempranillo (Temp), Grenache (Gre) and Graciano (Gra); (B) Standardized canonical coefficients of the four main discriminant variables in functions (F1 and F2) for colour parameters.

Figure 5. Cont.

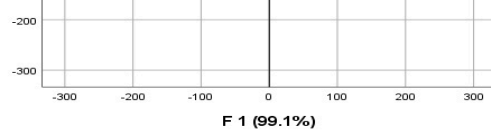
The statistical CDA of the aromatic compounds of samples of Tempranillo, Grenache and Graciano after AF, are shown in Figure 6. The variability between the samples (n = 3) was explained by four possible canonical functions (F) with statistical significance. F1 explained over 99.1% of variability and F2 (0.4%) explaining the 99.5% of the variance. F1 explained over 99.1% of variability and F2 (0.4%) explaining the 99.5% of the variance. F1 explained over 99.1% of variability and F2 (0.4%) explaining the 99.5% of the variance. F1 explained over 99.1% of variability and F2 (0.4%) explaining the 99.5% of the variance. F1 explained over 99.1% of variability and F2 (0.4%) explaining the 99.5% of the variance.

Figure 5. (A) Canonical discriminant graph of colour parameters in control samples (C), samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) and samples early inoculated with a mix of *L. thermotolerans* & *L. delbrueckii* (LT), after alcoholic fermentation (2) of Tempranillo (Temp), Grenache (Gre) and Graciano (Gra); (B) Standardized canonical coefficients of the four main discriminant variables in functions (F1 and F2) for colour parameters.



Aro	F1 (99.1%)	F2 (0.4%)	F3 (0.203%)	F4 (0.080%)
Propanol-1	22.50	1.130	1.052	0.426
1-Butanol	5.032	0.673	0.317	-0.075
Isobutanol	5.265	3.127	-1.571	-0.358

Aromatic Compounds	F1	F2	F3	F4
Propanol-1	22.50	1.130	1.052	0.426
1-Butanol	5.032	0.673	0.317	-0.075
Isobutanol	5.265	3.127	-1.571	-0.358
Amyl alcohols	9.093	-0.583	1.999	-2.660
2-Phenylethanol	-19.06	1.024	-1.460	3.235
1-Hexanol	-18.62	-3.436	0.393	-0.780
Benzyl alcohol	4.95	-1.644	0.809	-0.204
Methionol	20.36	0.404	0.566	-1.000
Cis-3-hexanol	16.02	-1.212	-0.108	-0.218



(A)

Standardized Canonical Coefficients				
Aromatic Compounds	F1	F2	F3	F4
Propanol-1	22.50	1.130	1.052	0.426
1-Butanol	5.032	0.673	0.317	-0.075
Isobutanol	5.265	3.127	-1.571	-0.358
Amyl alcohols	9.093	-0.583	1.999	-2.660
2-Pentanol	4.95	-1.644	0.809	-0.204
1-Methanol	20.36	0.404	0.566	-1.000
Cis-3-hexanol	16.92	-1.313	-0.198	-0.318
Benzyl alcohol	-19.78	-7.869	-2.783	-0.868
Isoamyl acetate	0.879	9.344	-0.553	1.507
Hexyl acetate	21.38	-0.245	2.894	-0.175
Cis-hexanol	6.045	2.237	-0.493	-0.493
Isopropyl acetate	19.44	3.535	-0.014	3.737
Hexyl acetate	-13.88	-1.270	0.264	0.838
2-phenylacetate	-7.602	-2.158	1.274	-0.366
Ethyl butyrate	5.535	2.814	0.109	1.004
Ethyl hexanoate	-14.04	-1.859	0.277	-2.057
Ethyl octanoate	-7.602	-2.158	1.274	-0.366
Ethyl hexanoate	5.535	2.814	0.109	1.004
Ethyl octanoate	-14.04	-1.859	0.277	-2.057

Fermentation 2020, 5, x FD

11 of 16

Figure 6. (A) Canonical discriminant graph of aromatic compounds in control samples (C), samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) and samples early inoculated with a mix of *L. thermotolerans* & *T. delbrueckii* (LT), after alcoholic fermentation (B) of Tempranillo (Temp), Grenache (Gre) and Graciano (Gra) (B) Standardized canonical coefficients of the four main discriminant variables in

Figure 6. (A) Canonical discriminant graph of aromatic compounds in control samples (C), samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) and samples early inoculated with a mix of *L. thermotolerans* & *T. delbrueckii* (LT), after alcoholic fermentation (B) of Tempranillo (Temp), Grenache (Gre) and Graciano (Gra) (B) Standardized canonical coefficients of the four main discriminant variables in functions (F1 and F2) for aromatic compounds. (C) Hierarchical cluster analysis of aromatic compounds in control samples (C), samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) and samples early inoculated with a mix of *L. thermotolerans* & *T. delbrueckii* (LT), after alcoholic fermentation (B) of Tempranillo (Temp), Grenache (Gre) and Graciano (Gra) (B) Standardized canonical coefficients of the four main discriminant variables in functions (F1 and F2) for aromatic compounds after AF and the hierarchical cluster built with the average data is shown in Figure 7.

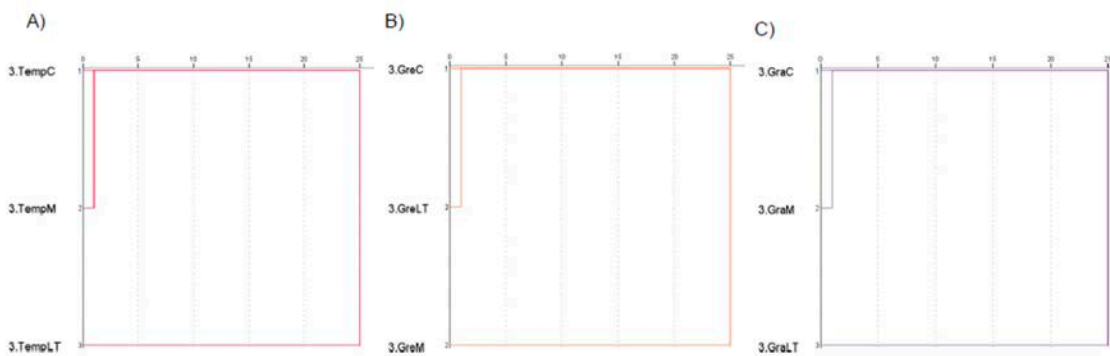


Figure 7. Hierarchical clusters assessed with average oenological and colour parameters of control samples (C), samples early inoculated with *M. pulcherrima* (M) and samples early inoculated with a mix of *L. thermotolerans* & *T. delbrueckii* (LT), after the malolactic fermentation (B) of (A) Tempranillo (Temp); (B) Grenache (Gre) and (C) Graciano (Gra).

Tempranillo and Graciano grapes inoculated early with *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* (LT) were separated from the control samples and from the samples inoculated early with *M. pulcherrima* (M) that were clustered together. In contrast, in Grenache wines after MLF the samples inoculated early with *M. pulcherrima* (M) were separated from the other two samples that stayed clustered together.

4. Discussion

This study was focused on individual pilot plant vinifications of Tempranillo, Grenache and Graciano inoculated with non-*Saccharomyces* yeast inocula for responding if every non-*Saccharomyces* yeast would cause similar physicochemical and aromatic profiles in different grape varieties. The initial must of three grape varieties must were separated according to parameters of APBV and

most of three grape varieties musts were separated according to parameters of APBV and acidity. Moreover, their indigenous yeast communities were also different. These initial differences fitted with a standard winemaking of non-sterile grapes [22].

4.1. Yeasts Establishment and Fermentation Kinetics

Tempranillo grapes had low APBV and high malic acid content, which was initially positive for the establishment of yeasts and bacteria populations and consequently for the evolution of AF and MLF. The presence of *S. cerevisiae* in the grape surface and must is usually low and this was corroborated in this study [23]. The initial must had *S. cerevisiae* as residual yeast and a high population of *H. uvarum*, *H. osmophila* and *T. delbrueckii* that were naturally present. The control sample inoculated only with *S. cerevisiae* had a large population of *M. pulcherrima* after three days, which might be due to an external contamination of the tanks with the *M. pulcherrima* inoculated vinification that coexisted in the experimental winery. Nonetheless, indigenous *T. delbrueckii* and *H. osmophila* were not detected and AF proceeded without problems; it was rapid and lasted only six days. In Tempranillo samples, early inoculated with non-*Saccharomyces* and then with *S. cerevisiae*, the establishment of the different yeast species happened as it was expected, probably due to the preadaptation of the strains to the grape variety because they had been isolated from this same variety.

The microbial composition of the Grenache must was characterised by a large population of *H. uvarum*, with *S. cerevisiae* as a minority strain. A diverse indigenous population characterized the initial must. Furthermore, indigenous *M. pulcherrima* was found in Grenache grapes, although with low percentage. *S. cerevisiae* inoculated in the control sample was able to achieve total implantation in spite of the high APBV of the must, and of the ecological pressure that other initial yeast species could have exerted. Indeed, the AF was not as rapid as it was in Tempranillo. The establishment of inoculated yeast species in Grenache must sample were not so successful that the observed in Tempranillo samples, in effect, the diversity of indigenous and inoculated non-*Saccharomyces* stayed until the day 4 and after this, *S. cerevisiae* became the majority.

The Graciano must had a similar microbial composition to that observed for Tempranillo. *H. uvarum* was the most frequently detected species and *T. delbrueckii* was initially present in the must sample. Similarly, to what was observed in Grenache, the implantation of *S. cerevisiae* in the control sample was total in spite of the high acidity and low pH of the must although the AF kinetics was very slow and lasted thirteen days. Similar to the described in Grenache, the establishment of inoculated non-*Saccharomyces* species was even less successful in percentages of identification.

4.2. Discriminant Analysis of Wines after AF

4.2.1. Statistical Analysis of Oenological Parameters

In order to know how the wine samples were separated depending only on the must inoculation strategy, the statistical analysis was performed without the ABV and the malic acid content that separated the must samples in the discriminant analysis.

The early inoculation of *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* and the mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* did not provide enough changes in the oenological parameters of Graciano and Grenache wine samples, so that they appeared together regardless the inoculation strategy in the representation of the two main canonical discriminate functions. Only Tempranillo samples early inoculated with *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* was separated in the graph, from control wine samples and from wine samples early inoculated with *M. pulcherrima*. These Tempranillo wine samples early inoculated with the mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* were characterized by a low pH and a high total acidity. As far as we know, this is the first time that the mixed inocula of L&T (30/70) has been tested in a pilot plant in three different grape varieties. Results showed that in the Tempranillo must, both yeasts achieved a total implantation maintaining a ratio of 13/87. Post AF, the inoculated wine had interesting increased

acidity parameters due to the capacity of *L. thermotolerans* to produce lactic acid [5], which could achieve balance in a grape variety generally characterised by high pH and low acidity.

4.2.2. Statistical Analysis of Colour Parameters

Analysing statistically the colour parameters of the wine samples of the three grape varieties early inoculated with *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* and a mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* provided similar results to the described for oenological parameters in the later Section 4.2.1. Again, Graciano and Grenache wine samples were separated only for being different grape varieties, but not because of the three different yeast inoculation strategies. Moreover, the Tempranillo control wine samples and the samples early inoculated with *M. pulcherrima* reached high values of total polyphenol index, while samples early inoculated with a mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* yeasts reached lower values what make them stay separated in the graph of the two main canonical functions extracted from the discriminant analysis. In one previous study, of this same mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* was tested for oenological parameters and anthocyanins and stilbenes and similar results were described [14]. In general terms, the reduction of the total polyphenol index is not a good result for wine quality, but observing this effect only on Tempranillo that is a grape variety characterized for normal anthocyanins content, might not be so negative than if it happened in Grenache that has a low anthocyanins content [24].

4.2.3. Statistical Analysis of Aromatic Profile

Results of the aromatic profile of the three varieties inoculated with different strategies showed interesting results. For instance, wine samples were mainly separated in the graph of the two main discriminant functions by the content of propanol-1 compound that provide alcoholic and mature fruit notes. Any other aromatic compound was able to discriminate samples. Graciano wine control samples, with lower propanol-1 concentrations, were separated from samples that had been early inoculated with *M. pulcherrima* and with the mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii*, this would mean that early inoculation of non-*Saccharomyces* yeast in Graciano must samples led to a more alcoholic profile than the samples inoculated only with *Saccharomyces*. Grenache wine samples were also separated by propanol content but in this case, the samples inoculated with *S. cerevisiae* had lower concentrations than the early inoculate with *M. pulcherrima* and these ones than the early inoculated with a mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii*. Just this same result was observed for Tempranillo wine samples. Giudici et al. [25] published that the higher alcohol n-propanol was directly related with the ability of some yeast strains to metabolise methionine and threonine aminoacids and depended on their initial content in wine, what could explain why the same inoculation strategy led to different concentration of propanol in wines depending on the variety. In any case, odour threshold for propanol was established by Peinado et al. [26] in 306 mg/L that was very high comparing concentrations obtained in the current study. This means that the different concentration between wine samples observed in the current research would not probably led to a differentiation in sensory terms.

Furthermore, the three Tempranillo wine samples were slightly differenced by the hexyl acetate content. In this way, the control wine sample was the one with the highest content of hexyl acetate compared to the early inoculated with *M. pulcherrima* and with a mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii*. The hexyl acetate aromatic compound is related to apple, cherry, pear and floral aromas and the odour threshold is 1.5 mg/L [27]. Only Tempranillo samples inoculated with *S. cerevisiae* overcame this threshold so that it would be fruitier than the Tempranillo samples early inoculated non-*Saccharomyces*.

4.3. Discriminant Analysis of Wines after MLF

Aromatic composition of wines after MLF was not considered because this fermentation was seeded with one commercial strain of *O. oeni*, so that differences in aroma could probably be due to the effect of this strain but not to the different inoculation strategies. Multivariate statistical analysis of oenological and colour parameters of samples of the three varieties showed clearly that early

inoculation of Tempranillo and Grenache varieties with a mix of *L. thermotolerans* and *T. delbrueckii* caused separation of control wine samples while the early inoculation of Graciano with *M. pulcherrima* was the wine that was differentiated of control Grenache wine samples.

5. Conclusions

To sum up, most of the oenological differentiations due to inoculation strategies were observed in Tempranillo wines while in Graciano and Grenache changes due to different inoculation strategies were scarce in many cases. Nevertheless, wine elaborated with different wine varieties were perfectly identified considering the grape variety. This would be indicating that one of the most important previous step in obtaining not homogenous wines is the winemaking of different grape varieties. Non-*Saccharomyces* early inoculated had been isolated from Tempranillo musts, so that a preadaptation to these grape variety properties might be expected. Therefore, changes in Tempranillo wines might be linked to the implantation or establishment rates of the inoculated yeasts. This research indicated, for the first time, that early inoculation with non-*Saccharomyces* should be carefully adjusted to the properties and features of a specific grape variety in order to increase the heterogeneity of the final product.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2311-5637/6/1/3/s1>, One Figure S1 and one spreadsheet S1 has been included in this submission. The Figure S1 aims to clarify the sampling with a schematic representation and the spreadsheet S1 contains every data employed in statistical analysis.

Author Contributions: R.E.-V. was in charge of the methodology and the original draft preparation. P.G. was also responsible of the methodology. I.L.-A. was part of the research equipment. R.L. was a researcher of the project and also collaborated in the review and editing of the draft. P.S. researched and was in charge of resources. A.R.G. was responsible for the finding acquisition and for the project administration, and developed the formal analysis, resources and reviewed and edited the draft and eventually L.G.-A. submitted the manuscripts after reviewing and editing the draft. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: This work was supported by the Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.

Conflicts of Interest: The authors declare not conflict of interest.

References

1. Masneuf-Pomarede, I.; Bely, M.; Marullo, P.; Albertin, W. The Genetics of Non-Conventional Wine Yeasts: Current Knowledge and Future Challenges. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Medina-Trujillo, L.; González-Royo, E.; Sieczkowski, N.; Heras, J.; Canals, J.M.; Zamora, F. Effect of Sequential Inoculation (*Torulaspota delbrueckii* /*Saccharomyces cerevisiae*) in the First Fermentation on the Foaming Properties of Sparkling Wine. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 681–688. [[CrossRef](#)]
3. Whitener, M.E.B.; Stanstrup, J.; Carlin, S.; Divol, B.; Toit, M.D.; Vrhovsek, U. Effect of Non- *Saccharomyces* Yeasts on the Volatile Chemical Profile of Shiraz Wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2017**, *23*, 179–192. [[CrossRef](#)]
4. Sadineni, V.; Kondapalli, N.; Obulam, V.S.R. Effect of Co-Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the Aroma and Sensory Properties of Mango Wine. *Ann. Microbiol.* **2012**, *62*. [[CrossRef](#)]
5. Gobbi, M.; Comitini, F.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in Simultaneous and Sequential Co-Fermentation: A Strategy to Enhance Acidity and Improve the Overall Quality of Wine. *Food Microbiol.* **2013**, *33*. [[CrossRef](#)]
6. Jolly, N.P.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Not Your Ordinary Yeast: Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production Uncovered. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 215–237. [[CrossRef](#)]
7. Benito, Á.; Calderón, F.; Palomero, F.; Benito, S. Combine Use of Selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* Yeast Strains as an Alternative to the Traditional Malolactic Fermentation in Red Wine Production. *Molecules* **2015**, *20*, 9510–9523. [[CrossRef](#)]
8. Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts in Controlled Multistarter Fermentations with *Saccharomyces Cerevisiae*. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 873–882. [[CrossRef](#)]

9. Commission Regulation. Commission Regulation (EC) No 606/2009 of 10 July 2009 Laying down Certain Detailed Rules for Implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as Regards the Categories of Grapevine Products, Oenological Practices and the Applicable Restrictions. *Off. J. Eur. Union* **2009**, *193*, 1–59.
10. Aerny, J. Composés Azotés Des Moûts et Des Vins. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **1996**, *28*, 161–165.
11. López, I.; Torres, C.; Ruiz-Larrea, F. Genetic Typification by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of Wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* Wine Strains. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 547–555. [[CrossRef](#)]
12. Cocolin, L.; Dolci, P.; Rantsiou, K.; Urso, R.; Cantoni, C.; Comi, G. Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular method. *Meat Sci.* **2009**, *82*, 125–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
14. Escribano-Viana, R.; Portu, J.; Garijo, P.; López, R.; Santamaría, P.; López-Alfaro, I.; Gutiérrez, A.R.; González-Arenzana, L. Effect of the Sequential Inoculation of Non-Saccharomyces/Saccharomyces on the Anthocyanins and Stilbenes Composition of Tempranillo Wines. *Front. Microbiol.* **10 APR 2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Escribano-Viana, R.; González-Arenzana, L.; Portu, J.; Garijo, P.; López-Alfaro, I.; López, R.; Santamaría, P.; Gutiérrez, A.R. Wine Aroma Evolution throughout Alcoholic Fermentation Sequentially Inoculated with Non-Saccharomyces/Saccharomyces Yeasts. *Food Res. Int.* **2018**, *112*, 17–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cocolin, L. Direct Profiling of the Yeast Dynamics in Wine Fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *189*, 81–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lipka, Z.; Tanner, H. Une Nouvelle Méthode de Dosage Rapide de l'acide Tartrique Dans Les Moûts, Les Vins et Autres Boissons (Selon Rebelein). *Rev. Suisse de Vitic. Arboric. Hortic.* **1974**, *6*, 5–10.
18. Somers, T.C.; Evans, E. Wine Quality: Correlations with Colour Density and Anthocyanin Equilibria in a Group of Young Red Wines. *J. Sci. Food Agric.* **1974**, *25*, 1369–1379. [[CrossRef](#)]
19. Glories, Y. Recherches Sur La Matière Colorantes Des Vins Rouges. Thesis, Université de Bordeaux II, Bordeaux, French, 1978.
20. Ruiz, M. *La Cata y El Conocimiento de Los Vinos*; Madrid Mundi Prensa: Madrid, Spain, 1999.
21. Ortega, C.; López, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. Fast Analysis of Important Wine Volatile Compounds. Development and Validation of a New Method Based on Gas Chromatographic-Flame Ionisation Detection Analysis of Dichloromethane Microextracts. *J. Chromatogr. A* **2001**, *923*, 205–214. [[CrossRef](#)]
22. Portillo, M.C.; Franquès, J.; Araque, I.; Reguant, C.; Bordons, A. Bacterial Diversity of Grenache and Carignan Grape Surface from Different Vineyards at Priorat Wine Region (Catalonia, Spain). *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *219*, 56–63. [[CrossRef](#)]
23. Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. The Microbial Ecology of Wine Grape Berries. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 243–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. García-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. Anthocyanin Pattern of Several Red Grape Cultivars and Wines Made from Them. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 32–37. [[CrossRef](#)]
25. Giudici, P.; Zambonelli, C.; Kunkee, R.E. Increased Production of N-Propanol in Wine by Yeast Strains Having an Impaired Ability to Form Hydrogen Sulfide. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 17–21.
26. Peinado, R.A.; Moreno, J.; Bueno, J.E.; Moreno, J.A.; Mauricio, J.C. Comparative Study of Aromatic Compounds in Two Young White Wines Subjected to Pre-Fermentative Cryomaceration. *Food Chem.* **2004**, *84*, 585–590. [[CrossRef](#)]
27. Etievant, P.X. Wine. In *Volatile Compounds in Food*; Maarse, Ed.; Food Science and Technology: New York, NY, USA, 1991.



Capítulo V

Resultados y Discusión

1. Esquema del proceso de selección

El proceso seguido en la selección de levaduras no-*Saccharomyces* aparece reflejado en el esquema de la Figura 4.

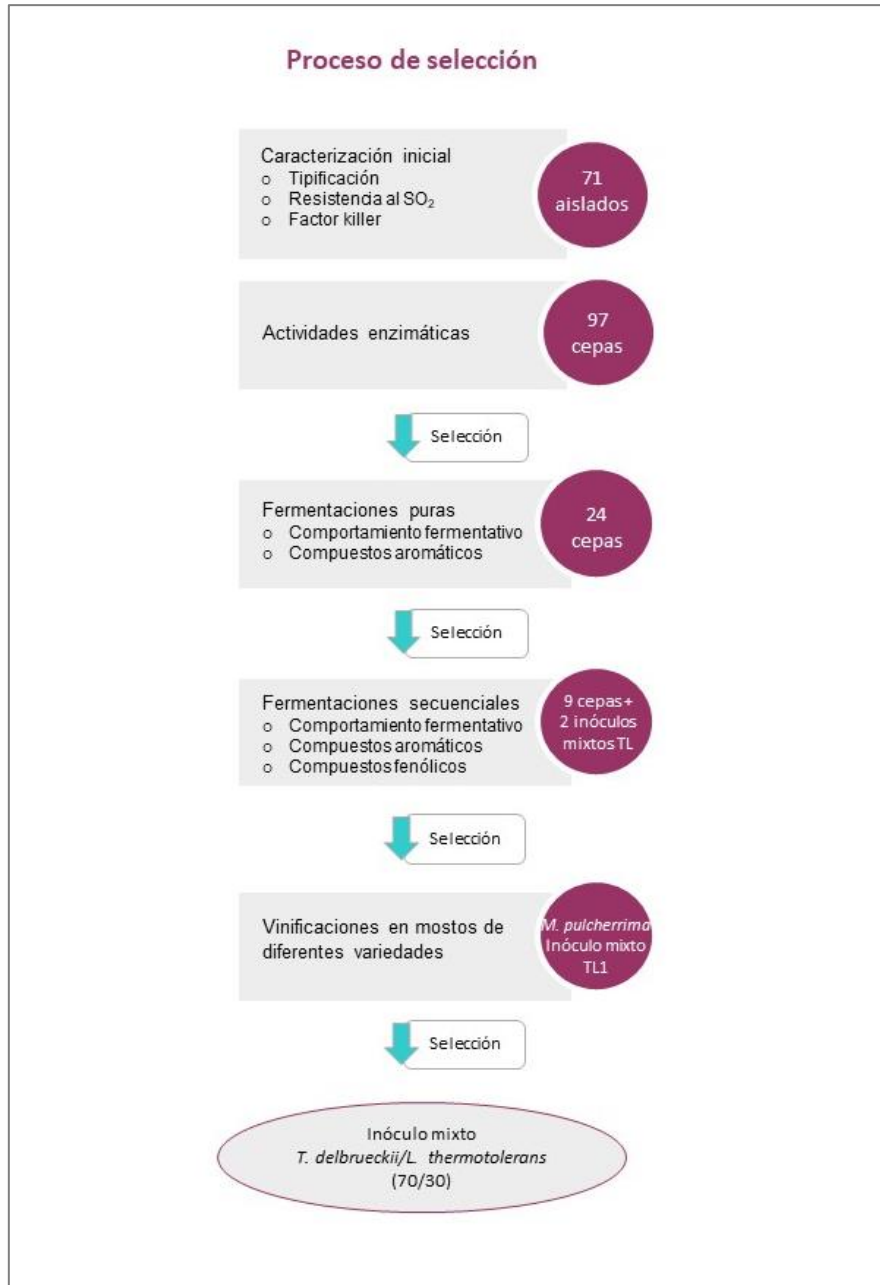


Figura 4. Esquema en el que se muestran las diferentes etapas del proceso de selección.

2. Etapas iniciales de selección

Los 103 aislados que se incluyeron en este estudio pertenecían a los bancos de levaduras no-*Saccharomyces* del SIV y de la Universidad de La Rioja. En estos bancos se conservaban más

de 500 cepas pertenecientes a más de 30 especies diferentes, por lo que el primer paso que se llevó a cabo fue una preselección de aislados. Para ello, se atendió a dos aspectos: especies de levaduras no-*Saccharomyces* que hubieran mostrado en estudios previos buen comportamiento como inóculos y especies no-*Saccharomyces* poco estudiadas pero que habían sido identificadas en repetidas ocasiones en distintas bodegas de la D.O.Ca. Rioja (Ocón et al., 2013; Ocón, Gutiérrez, Garijo, López, et al., 2010; Ocón, Gutiérrez, Garijo, Tenorio, et al., 2010). Una vez elegidos los aislados que iban a comenzar el proceso de selección, se llevó a cabo la secuenciación de la región D1 del ARN ribosómico 26S para confirmar su identificación a nivel de especie.

El proceso de selección comenzó con la tipificación a nivel clonal de los aislados de levaduras no-*Saccharomyces* incluidos en el estudio (González-Arenzana et al., 2016). Como han mostrado algunos autores en trabajos previos, existe una gran variabilidad intraespecífica en las levaduras no-*Saccharomyces*, lo que supone la producción de diferentes enzimas y compuestos durante la vinificación, así como un diferente comportamiento enológico (Capece et al., 2005; Rossouw & Bauer, 2016; Strauss et al., 2001; Zott et al., 2011). Es por ello que la caracterización clonal es un paso esencial en la selección de levaduras para su empleo como inóculos en vinificación. La tipificación evidenció una amplia diversidad intraespecífica, encontrándose 17 clones entre los 21 aislados de *T. delbrueckii*, 13 y 15 clones en los 16 aislados de *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans* y 7 clones en los 7 aislados de *Z. bailii* y los 11 de *W. pratensis* (González-Arenzana et al., 2016). Por lo tanto, de los 71 aislados de las cinco especies de no-*Saccharomyces* tipificados, se determinó la existencia de 59 cepas diferentes que fueron incluidas en el proceso de selección.

Con estos aislados se llevó a cabo un primer ensayo de tolerancia al SO₂. En la actualidad, el uso de este compuesto continúa siendo mayoritario por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Como criterio de selección se tuvo en cuenta el crecimiento en presencia de SO₂ a las 24 horas, ya que en las vinificaciones industriales existe una gran competencia entre los microorganismos presentes en los depósitos, por lo que la capacidad para crecer rápidamente en presencia de SO₂ supone una ventaja para que la levadura consiga establecerse en el medio. En general, las cepas que mostraron una mejor adaptación al SO₂ fueron las pertenecientes a la especie *T. delbrueckii*, mientras que las de *M. pulcherrima* presentaron mayor sensibilidad a este compuesto (González-Arenzana et al., 2016). No obstante, los resultados mostraron una gran variabilidad en la tolerancia de los clones pertenecientes a una misma especie, lo que confirmó la importancia de considerar el factor cepa en estos procesos de selección.

Además de analizar la tolerancia de los aislados a diferentes concentraciones de SO₂, se llevó a cabo un estudio de su fenotipo killer. Las levaduras del género *Saccharomyces* son conocidas por su capacidad para producir toxinas killer que impiden el desarrollo de las cepas

sensibles. En levaduras no-*Saccharomyces* también se han descrito toxinas de este tipo que han mostrado un amplio espectro de actividad (Ciani & Comitini, 2011), lo que aumenta la posibilidad de que las levaduras *Saccharomyces*, encargadas de completar la fermentación, se vean afectadas. Esto podría dar lugar a paradas de fermentación, por lo que el factor killer es una característica que se debe considerar en la selección de inóculos de levaduras no-*Saccharomyces*, siendo descartables las cepas que sean productoras de dichas toxinas. De forma paralela, también es importante evaluar la susceptibilidad de los clones de levaduras no-*Saccharomyces* incluidos en el proceso de selección a las toxinas killer producidas por *S. cerevisiae*, de forma que se garantice su supervivencia en cultivos mixtos o secuenciales, siendo descartables las cepas que resulten sensibles a dichas toxinas. En base a los resultados obtenidos en estos estudios previos, el fenotipo neutro fue el más frecuente entre los aislados de levaduras no-*Saccharomyces* evaluados (González-Arenzana et al., 2016), lo que descartaría interacciones negativas con *S. cerevisiae*. Únicamente dos cepas de *L. thermotolerans* mostraron fenotipo sensible, lo que dificultaría su desarrollo en presencia de levaduras killer. Por otro lado, todos los clones de *W. pratensis* estudiados presentaron actividad killer frente a *S. cerevisiae*. En estudios anteriores como el de Goretta y colaboradores (2009) se detectó una proteína killer de *W. saturnus* activa contra el 100% de las cepas de *S. cerevisiae* probadas. En el presente trabajo se estudió también la posible inhibición de una cepa comercial neutra de *S. cerevisiae* por parte de los aislados incluidos en el proceso de selección. Los resultados mostraron que no existía interacción negativa en ninguna de las cepas, ni siquiera en las de la especie *W. pratensis* que habían presentado actividad killer.

En varios estudios se ha demostrado el potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para su aplicación como agentes de biocontrol (Bergebál et al., 2017; Oro et al., 2014; Simonin et al., 2018, 2020). Por ejemplo, Berbegal y colaboradores (2017) consiguieron una disminución del crecimiento de *Brettanomyces* en fermentaciones mixtas con *H. guilliermondii* en comparación con las fermentaciones inoculadas únicamente con *S. cerevisiae*. En uno de los trabajos iniciales del proceso de selección (González-Arenzana et al., 2016), se evaluó también la inhibición de *Brettanomyces* por parte de diferentes cepas de levaduras no-*Saccharomyces*. Sin embargo, ninguno de los aislados mostró un efecto inhibitorio de la cepa de *Brettanomyces bruxellensis* empleada en el estudio.

Una vez realizada esta caracterización previa de los aislados de las cinco especies de levaduras no-*Saccharomyces*, se sumaron al proceso nuevas especies, de forma que esta etapa del proceso de selección se llevó a cabo con 97 cepas pertenecientes a 10 géneros y especies diferentes (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *D. hansenii*, *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *P. kluyveri*, *Sp. salmonicolor*, *T. delbrueckii*, *W. pratensis* y *Z. bailii*).

3. Proceso de selección de levaduras no-*Saccharomyces* para ser destinadas a inóculo enológico

Una vez descritas las etapas iniciales llevadas a cabo por el grupo GESVIN del Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV) en el apartado anterior, se van a desarrollar de forma pormenorizada los resultados obtenidos en el proceso de selección de levaduras no-*Saccharomyces* en el que está basado este trabajo de Tesis Doctoral.

El proceso de selección se llevó a cabo en diversos ensayos en los que se estudiaron las actividades enzimáticas de las levaduras no-*Saccharomyces*, se analizó el comportamiento fermentativo de las especies y cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, se testaron los efectos de la inoculación secuencial de no-*Saccharomyces* con *S. cerevisiae* en los parámetros fisicoquímicos, aromáticos y en la composición polifenólica de los vinos y por último se estudió la respuesta de la inoculación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* con *S. cerevisiae* en mostos de tres variedades de uva tinta.

3.1. Estudio de las actividades enzimáticas de las levaduras no-*Saccharomyces*

Las enzimas secretadas por las levaduras presentes en la vinificación tienen un papel importante en la modulación de las características sensoriales del vino. Dentro de las enzimas relacionadas con el aroma, se estudiaron actividades como la esterasa, esterasa-lipasa, lipasa, el grupo de las aminopeptidasas (leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa) o la β -glucosidasa. Las enzimas esterasa y lipasa están involucradas en la formación de ésteres, compuestos que aportan aromas afrutados al vino. Los resultados obtenidos en este primer estudio (Escribano et al., 2017) mostraron que el 100% de las cepas del género *Cryptococcus* spp. y de las especies *W. pratensis*, *Sp. salmonicolor*, *P. kluyveri* y *M. pulcherrima* presentaron actividad esterasa, mientras que en el resto de géneros y especies estudiados (*Candida* spp., *D. hansenii*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* y *Z. bailii*) la proporción de cepas con actividad esterasa fue variable. La actividad esterasa-lipasa se detectó en el 100% de las cepas de *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *W. pratensis*, *Sp. salmonicolor*, *P. kluyveri*, *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans*. En las tres especies restantes (*D. hansenii*, *T. delbrueckii* y *Z. bailii*) más del 50% de las cepas mostraron actividad esterasa-lipasa. En el estudio realizado por Comitini y colaboradores (2011) también se observó la presencia de actividad esterasa en un gran número de cepas de diferentes géneros de levaduras no-*Saccharomyces*. Por otro lado, los resultados de nuestro ensayo indicaron que la actividad lipasa fue poco detectada, de hecho, solo el 33% de las cepas de *Sp. salmonicolor* y el 12% de *L. thermotolerans* presentaron esta actividad. Las enzimas lipasas provocan la degradación de los lípidos, liberando ácidos grasos, a partir de los cuales se forman ésteres etílicos, además de actuar como catalizadores de las reacciones de formación de ésteres (Holland et al., 2005). No obstante, la liberación de ácidos grasos de cadena media, como

el ácido octanoico o el ácido decanoico, puede dar lugar a la inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* y de las bacterias lácticas, provocando paradas de fermentación (Lonvaud-Funel, Joyeux, & Desens, 1988; Viegas, Rosa, Correia, & Novais, 1989). En el trabajo realizado por Charoenchai y colaboradores (1997), la producción de lipasa se observó en diferentes cepas pertenecientes a las especies *C. stellata*, *C. pulcherrima*, *C. krusei* y *T. delbrueckii*. Sin embargo, los resultados de nuestro trabajo mostraron que las cepas de *Candida* spp. y *T. delbrueckii* estudiadas no presentaron esta actividad, lo que evitaría el riesgo de paradas fermentativas.

Asimismo, se evaluó la presencia de enzimas proteolíticas aminopeptidasas o arilamidadas (A), que catalizan la hidrólisis de los aminoácidos N-terminales de los péptidos (Barrett, Rawlings, Salvesen, & Woessner, 2013). El incremento en el contenido de aminoácidos mejora la cantidad de nutrientes del mosto, así como la producción de compuestos aromáticos en el vino (Trinh, Woon, Yu, Curran, & Liu, 2010), ya que algunos aminoácidos como la valina, la leucina, la isoleucina y la fenilalanina son precursores de compuestos aromáticos (Santamaría et al., 2015). Los resultados de las cepas incluidas en el estudio, mostraron que ninguna de las actividades proteolíticas analizadas (leucinaA, valinaA, cistinaA) fueron detectadas en *D. hansenii*, mientras que *W. pratensis* presentó las tres actividades en la mayoría de las cepas. En *L. thermotolerans* también se observaron las tres actividades, pero con menor porcentaje entre sus clones. En las cepas del resto de especies estudiadas solo se encontraron una o dos de las actividades proteolíticas analizadas. Diferentes trabajos han estudiado la presencia de actividad proteolítica en levaduras no-*Saccharomyces*, encontrando cepas de *Kloeckera apiculata*, *M. pulcherrima*, *P. anomala*, *P. membranifaciens*, *C. stellata*, o *D. hansenii* con actividad proteasa (Charoenchai et al., 1997; Fernández, Úbeda, & Briones, 2000; Strauss et al., 2001). En su trabajo, Ganga y Martínez (2004) observaron que esta actividad enzimática estaba presente en mayor porcentaje en los aislados de *M. pulcherrima* y *Candida* spp. Las diferencias entre los resultados de nuestro estudio y los publicados por otros autores podrían explicarse, además de por la influencia probable del factor cepa en esta actividad enzimática, por la diferente metodología empleada en estos trabajos. La actividad proteolítica más frecuentemente detectada en este trabajo fue la leucina arilamidasa, presente en nueve de las diez especies con un elevado porcentaje, mientras que la actividad menos detectada fue la cistina arilamidasa, que se encontró solamente en tres de las especies. La única especie que presentó una elevada actividad cistina arilamidasa entre sus cepas fue *W. pratensis*.

Otra de las actividades enzimáticas testadas en las levaduras no-*Saccharomyces* fue la actividad β -glucosidasa, que provoca la hidrólisis del azúcar de los terpenos combinados, liberando los terpenos volátiles e incrementando así los compuestos aromáticos del vino. Los terpenos volátiles son compuestos responsables del aroma varietal de la uva y aparecen normalmente ligados a moléculas de azúcar formando compuestos no volátiles. En el presente

estudio, la actividad β -glucosidasa se detectó en la mitad de las especies, siendo significativa únicamente en *Cryptococcus* spp. y *M. pulcherrima*, mientras que en el resto (*Candida* spp., *Z. bailii* y *L. thermotolerans*) se presentó en porcentajes bajos. Fernández y colaboradores (2000) indicaron que la enzima β -glucosidasa se relacionaba principalmente con la especie *M. pulcherrima*. Varios trabajos han demostrado el potencial de esta especie para la liberación de terpenos debido a su elevada actividad β -glucosidasa (Barbosa et al., 2018; Belda et al., 2016b; Mendes-Ferreira, Clímaco, & Faia, 2001), lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por su parte, Hong y colaboradores (2019) encontraron cepas de *Metschnikowia* spp., *Hanseniaspora* spp., *T. delbrueckii*, *Candida* spp., y *D. hansenii* que presentaban actividad β -glucosidasa. Por otro lado, en trabajos como el de Strauss y colaboradores (2001) no se detectó esta actividad en ninguno de los 245 aislados de *K. apiculata*, *D. hansenii* y *Candida* spp. estudiados. Según la literatura científica, los resultados son controvertidos y heterogéneos probablemente por una actividad β -glucosidasa correlacionada con un factor cepa y no con un factor especie. Así, las diferencias entre aislados de la misma especie en la presencia de la actividad β -glucosidasa vuelven a poner de manifiesto la importancia de llevar a cabo procesos de selección desde el nivel de clones o cepas de levaduras, en vez de solo a nivel de especie.

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio de la actividad de cuatro enzimas carbohidrolasas (pectinasa, celulasa, xilanasa y glucanasa) en las cepas incluidas en este ensayo. Los terpenoles enlazados a glicósidos se localizan principalmente en los hollejos, por lo que la actividad carbohidrolasa, que origina la degradación de las paredes celulares, contribuye a la liberación de los precursores aromáticos al mosto (Ganga et al., 2001). Los resultados obtenidos mostraron la presencia de las cuatro carbohidrolasas en *L. thermotolerans*, siendo esta la única especie en la que se detectó la actividad xilanasa. Por otro lado, en los aislados de *W. pratensis* no se detectó ninguna de las cuatro actividades carbohidrolasa. En *Cryptococcus* spp. y *D. hansenii*, un elevado porcentaje de las cepas presentó tres de las actividades. Otros autores también han observado la presencia de actividades carbohidrolasas en aislados de levaduras no-*Saccharomyces*. Strauss y colaboradores (2001) detectaron actividades pectinasa, glucanasa, celulasa y xilanasa en cepas de *K. apiculata* y en cepas de diferentes especies de *Candida* spp. En dicho trabajo la actividad xilanasa fue la menos observada, lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio.

También se consideró interesante estudiar otras enzimas producidas por las levaduras que pueden aportar aromas defectuosos en el vino, como la sulfito reductasa (SR) y la hidroxycinamato descarboxilasa (HCDC). La presencia de la actividad SR en las levaduras puede dar lugar a la liberación de compuestos azufrados al vino que se asocian con el carácter reducido (Ugliano, Kolouchova, & Henschke, 2011). Nuestros resultados mostraron que en *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* esta actividad se presentó en una elevada proporción de las cepas estudiadas, 100%

y 94% respectivamente. En *Cryptococcus* spp. y *D. hansenii* la proporción fue menor (20% y 33%) y en el resto de las especies no se encontró esta actividad enzimática. En el estudio llevado a cabo por Comitini y colaboradores (2011) el 100% de las cepas de *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* estudiadas presentaron actividad SR, lo que está en la línea de los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, estos autores también observaron que el 100% de las cepas de *L. thermotolerans* y *Candida* spp. fueron positivas para la actividad SR, a diferencia de las evaluadas en nuestro estudio. Las diferencias observadas entre ambos trabajos podrían explicarse debido a que esta es una característica cepa-dependiente y no se relaciona con un determinado género o especie. En cuanto a la enzima HCDC, las levaduras que presentan esta actividad son capaces de descarboxilar los ácidos ferúlico y p-cumárico dando lugar a vinilfenoles. A partir de estos vinilfenoles las levaduras de los géneros *Dekkera/Brettanomyces* pueden formar etilfenoles. Estos fenoles volátiles están relacionados con aromas desagradables descritos como “sudor de caballo” o “cuero” (Smith & Divol, 2016; Steensels et al., 2015). La síntesis de vinilfenoles varía en las especies, de ahí la importancia de la selección de cepas con baja actividad HCDC para evitar la aparición de defectos en el aroma. En el estudio de Viana y colaboradores (Viana, Gil, Genovés, Vallés, & Manzanares, 2008) ninguna de las cepas de *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp., *T. delbrueckii* y *Zygosaccharomyces* spp. estudiadas presentaron actividad HCDC. De las cepas estudiadas en nuestro ensayo, solo el 50% de las de *M. pulcherrima* presentó actividad HCDC, mientras que en el resto de géneros y especies no fue detectada, siendo estos resultados positivos en cuanto al aroma.

Muchas de las enzimas que pueden aportar mejoras en el aroma del vino tienen también efectos positivos en el color y la clarificación, como es el caso de las carbohidrolasas. La degradación de los polisacáridos estructurales por parte de estas enzimas mejora la extracción del mosto, la clarificación y la filtrabilidad del vino, además de aumentar la extracción de sustancias responsables del color y el aroma durante la maceración (Strauss et al., 2001). Louw y colaboradores (2006) observaron incrementos significativos del mosto extraído y de la intensidad y la estabilidad del color en elaboraciones con cepas de *S. cerevisiae* capaces de degradar glucano y xilano. En el presente estudio la actividad carbohidrolasa más frecuentemente detectada fue la pectinasa, encontrada en nueve de las diez especies analizadas. Otros autores han detectado algunas de estas actividades carbohidrolasas en diferentes géneros de levaduras no-*Saccharomyces* como *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Dekkera*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia* y *Hanseniaspora* (Ganga & Martínez, 2004; Manzanares, Ramón & Querol, 1999).

A pesar de su efecto negativo para la calidad aromática, la actividad HCDC puede tener una influencia positiva en el color del vino. Los vinilfenoles originados por la descarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos pueden formar aductos con antocianinas, dando lugar a

piroantocianinas vinilfenólicas que aportan gran estabilidad del color (He et al., 2012a). Benito y colaboradores (2011) llevaron a cabo fermentaciones mixtas empleando levaduras con elevada actividad HCDC que dieron lugar a un aumento en la concentración de pigmentos estables sin desviaciones organolépticas. En otro estudio, observaron que la actividad HCDC de las levaduras favoreció la formación de piroantocianos vinilfenólicos evitando la acumulación de vinilfenoles y consiguiendo de esta forma minimizar la producción de etilfenoles por parte de levaduras *Brettanomyces* (Benito, Palomero, Morata, & Uthurry, 2009). Estos resultados apuntan a un efecto positivo de la actividad HCDC no solo para el color del vino, sino también para el aroma, al evitar la aparición de defectos aromáticos. En nuestro estudio la única especie que presentó esta actividad enzimática fue *M. pulcherrima*, por lo que las cepas HCDC positivas de esta especie podrían ser interesantes como inóculo para mejorar el color del vino.

De forma contraria a lo que ocurre en el caso de la actividad HCDC, la actividad β -glucosidasa se considera positiva para el aroma del vino, pero puede ser perjudicial para otras características como el color debido a su capacidad para degradar las antocianinas (Suárez-Lepe & Morata, 2015). En todas las especies de este estudio existían cepas que no presentaron esta actividad, por lo que podrían ser seleccionadas en inóculos destinados a mejorar el color en vinos tintos.

La hidrólisis de las proteínas por parte de las enzimas proteolíticas mejora la clarificación de mostos y vinos y reduce la inestabilidad proteica (Lagace & Bisson, 1990). Como se ha indicado anteriormente, en *L. thermotolerans* y *W. pratensis* se encontraron cepas con las tres actividades aminopeptidasas estudiadas en este trabajo. Por el contrario, en la especie *D. hansenii* no se encontró ninguna cepa con actividad proteolítica. La enzima que se detectó con mayor frecuencia fue la leucina arilamidasa, presente en nueve de las especies con altos porcentajes.

Una vez analizados los resultados obtenidos, las cepas de cada especie se agruparon en perfiles enzimáticos con el fin de facilitar su selección en función de las características del vino que se quisieran modular (aroma o color). Las principales diferencias entre los perfiles enzimáticos relacionados con el aroma se debieron a la presencia de las actividades esterasa, lipasa y β -glucosidasa. Por esta razón, en el siguiente paso de selección se incluyeron las cepas incluidas en los perfiles enzimáticos que presentaran estas actividades: CA5 de *Candida* spp., CCA1 de *Cryptococcus* spp., LA5 de *L. thermotolerans*, MA4 de *M. pulcherrima*, ZA3 de *Z. bailii* y DA2 de *D. hansenii*. También pasaron a la siguiente etapa las cepas incluidas en los perfiles PKA1 de *P. kluyveri*, SPA2 de *Sp. salmonicolor*, TA5 de *T. delbrueckii*, WA1 de *W. pratensis* y ZA5 de *Z. bailii*, que presentaron dos de las actividades. En los perfiles relacionados con el color se seleccionaron aquellos que presentaron el mayor número de actividades enzimáticas: CC1 de *Candida* spp., CCC2 de *Cryptococcus* spp., LC6 de *L. thermotolerans*, MC4

y MC6 de *M. pulcherrima*, PKC1 de *P. kluyveri*, SPC1 de *Sp. salmonicolor*, TC4 de *T. delbrueckii*, WC1 de *W. pratensis* y ZC1 de *Z. bailii*. El perfil LC6 de *L. thermotolerans* resultó ser el único que reunió todas las actividades carbohidrolasas y aminopeptidasas estudiadas. Además, esta especie fue la única en la que se encontraron todas las actividades evaluadas que tienen una influencia positiva en la calidad del vino.

La producción de enzimas por parte de las levaduras y su actividad puede estar influenciada por las condiciones del medio como el pH, la presencia de glucosa, etanol o polifenoles (Chatonnet et al., 1992; Ganga & Martínez, 2004; Swiegers & Pretorius, 2005). Por esta razón es necesario evaluar los efectos de las cepas seleccionadas en condiciones de vinificación, tarea que se llevó a cabo en las siguientes etapas de selección.

Para continuar con el proceso, además de los perfiles enzimáticos relacionados con el aroma y el color, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización inicial de las cepas (resistencia al SO₂ y fenotipo killer) a la hora de seleccionar las cepas que pasaban a la siguiente fase. Por otro lado, algunas de las cepas fueron descartadas del estudio debido a su incapacidad para desarrollarse en medio líquido y para resistir el SO₂, como fue el caso de los aislados de *Sp. salmonicolor*. En cuanto a las cepas de *P. kluyveri*, no resistían bien los pases del cultivo en placa y dejaron de crecer, por lo que también fueron descartadas. De esta forma, se seleccionaron un total de 24 cepas, pertenecientes a ocho especies (*C. zeylanoides*, *Cr. uzbekistanensis*, *D. hansenii*, *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *W. pratensis* y *Z. bailii*) para continuar con el proceso de selección.

3.2. Comportamiento fermentativo de las distintas levaduras no-*Saccharomyces*

Continuando con el proceso de selección, se llevó a cabo un ensayo en el que se evaluó la capacidad de implantación, las características fermentativas y la formación de compuestos aromáticos de las 24 cepas de levaduras no-*Saccharomyces*. Para ello, se llevaron a cabo vinificaciones en mosto blanco pasteurizado y los resultados se compararon con los obtenidos en las vinificaciones con *S. cerevisiae* (Escribano et al., 2018).

La implantación fue total en la mayoría de los casos, con la excepción de los aislados de *W. pratensis*, dos de las cepas de *C. zeylanoides* y la cepa de *Cr. uzbekistanensis*, que tuvieron dificultades para desarrollarse en el mosto.

Tal y como era esperable, *S. cerevisiae* fue la única levadura capaz de consumir todo el azúcar, mientras que las levaduras no-*Saccharomyces* dieron lugar a vinos dulces en todos los casos, siendo el consumo de azúcares prácticamente nulo en *D. hansenii*. Otros autores ya habían señalado previamente la limitada capacidad de *D. hansenii* para el consumo de azúcares

(Hernández-Orte et al., 2008). Por otro lado, *C. zeylanoides* y *M. pulcherrima* fueron las especies menos eficientes en cuanto al azúcar consumido, necesitando mayores cantidades de azúcares para generar un grado alcohólico. Esta característica puede emplearse para reducir el contenido en alcohol en vinos procedentes de uvas con elevados contenidos de azúcar (Canónico, Comitini, Oro, & Ciani, 2016; Ciani et al., 2016). *C. zeylanoides* fue además la mayor productora de glicerol respecto al etanol, lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores en *Candida* spp. (Di Maio et al., 2012; Giaramida et al., 2013). Sin embargo, en *C. zeylanoides* también se detectaron niveles elevados de acidez volátil y acetaldehído que podrían afectar negativamente a la calidad del vino.

El acetaldehído es un compuesto que al combinarse con el SO₂ del vino limita su acción y además puede aportar aromas desagradables al vino si se encuentra en altas concentraciones. Normalmente los niveles de acetaldehído producidos por *S. cerevisiae* son más elevados (5-120 mg/l) que los producidos por las levaduras no-*Saccharomyces*, que suelen llegar hasta los 40 mg/l (Lambrechts & Pretorius, 2000). En este estudio, *C. zeylanoides* superó los niveles detectados en las vinificaciones con *S. cerevisiae*, mientras que *Z. bailii* mostró valores similares a los obtenidos en *S. cerevisiae*. La especie que presentó la menor producción de este compuesto fue *T. delbrueckii*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Li y Mira de Orduña (2017), que mostraron la baja producción de acetaldehído de las levaduras no-*Saccharomyces* con algunas excepciones como *C. stellata*, *Z. bailii* y *Sch. pombe*.

El principal compuesto responsable de la acidez volátil de los vinos es el ácido acético, que da lugar a defectos aromáticos cuando se presenta en concentraciones superiores a 0,7-1,1 g/l (Lambrechts & Pretorius, 2000). Los valores aceptables en el vino se encuentran entre 0,2 y 0,7 y en este estudio ninguna de las levaduras superó los 0,5 g/l, por lo que el riesgo de que afectaran a la calidad organoléptica del vino fue bajo.

En el presente estudio, las especies *L. thermotolerans* y *Z. bailii* mostraron capacidad para incrementar la acidez total del vino. Otros autores han descrito previamente la producción de ácido láctico por parte de *L. thermotolerans* (Gobbi et al., 2013), dando lugar a una reducción en los valores de pH. Esta característica ha hecho que se proponga el empleo de *L. thermotolerans* para ajustar la acidez de los vinos elaborados (Benito, Calderón, Palomero, & Benito, 2015; Gobbi et al., 2013). Por otra parte, *Z. bailii* mostró una elevada producción de ácido málico y alcanzó los niveles más altos de ácido pirúvico y succínico. Este último tiene un sabor salado-amargo que en niveles excesivos puede afectar a la calidad del vino (Jolly et al., 2014). Otros autores ya habían descrito la producción de ácido málico en especies del género *Zygosaccharomyces* como *Z. rouxii* (Taing & Taing, 2007).

En *Z. bailii* también se encontraron los mayores niveles de glicerol, por encima de los de *S. cerevisiae*, seguidos de los detectados en *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima*. Este compuesto, que aporta suavidad, dulzor y complejidad al vino, ha sido detectado en concentraciones más altas en vinificaciones con levaduras no-*Saccharomyces* en comparación con *S. cerevisiae* (Rossouw & Bauer, 2016). Otros autores también habían descrito una elevada producción de este compuesto en *L. thermotolerans* y *C. zemplinina* (Jolly et al., 2014; Masneuf-Pomarede, Bely, Marullo, & Albertin, 2016).

Además de los parámetros fisicoquímicos de los vinos inoculados con levaduras no-*Saccharomyces* o con *S. cerevisiae*, se estudió también su composición aromática. Para ello, se determinó la concentración de un total de 30 compuestos aromáticos fermentativos, incluyendo alcoholes superiores, ésteres, ácidos y compuestos como el diacetilo o la acetoína.

Los resultados mostraron una concentración más elevada de alcoholes superiores en *M. pulcherrima* y *S. cerevisiae*. Por otro lado, *D. hansenii* y *C. zeylanoides*, ambas con bajo poder fermentativo, produjeron las concentraciones más bajas de alcoholes superiores. La presencia de estos compuestos en concentraciones por debajo de los 350 mg/l contribuye a la complejidad aromática del vino, mientras que niveles por encima de los 400 mg/l pueden resultar negativos, ya que aportan olores punzantes (Rapp & Versini, 1995). En el presente estudio, en todos los casos los niveles de alcoholes superiores se mantuvieron por debajo de los 300 mg/l, contribuyendo positivamente al aroma del vino. En *L. thermotolerans* se detectaron las mayores concentraciones de 1-propanol, que aporta aromas alcohólicos y a fruta madura, y de 1-hexanol, que aporta aromas herbáceos (Louw et al., 2010). Por otro lado, *M. pulcherrima* mostró los valores más altos de 2-fenil etanol, lo que coincide con los resultados de otros autores (Clemente-Jimenez, Mingorance-Cazorla, Martínez-Rodríguez, Las Heras-Vázquez, & Rodríguez-Vico, 2004; Padilla, Gil, & Manzanares, 2016; Prior et al., 2019).

M. pulcherrima también alcanzó los mayores niveles de 2-fenil etil acetato. Este compuesto con aroma a rosa contribuye positivamente al perfil organoléptico del vino (Ribéreau-Gayon et al., 2007). Otros autores han detectado previamente la producción de elevadas concentraciones de ésteres en *M. pulcherrima* (Rodríguez, Lopes, Barbagelata, Barda, & Caballero, 2010), así como en otras especies de levaduras no-*Saccharomyces* (Rojas, Gil, Piñaga, & Manzanares, 2001; Rojas et al., 2003; Viana et al., 2008). *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans* presentaron las mayores concentraciones de propionato de etilo y *L. thermotolerans* tuvo la mayor producción de lactato de etilo. En *M. pulcherrima* se observaron niveles de acetato de etilo más elevados que en el resto de especies, lo que concuerda con los resultados obtenidos en estudios anteriores (Liu et al., 2017). *M. pulcherrima* mostró también niveles elevados de diacetilo y acetoína. Junto con *M. pulcherrima*, *C. zeylanoides* fue la única

levadura que superó para la acetoína el valor límite de 150 mg/l, por encima del cual puede aportar aromas mantecosos desagradables (Romano & Suzzi, 1996).

Tras el estudio de los parámetros analíticos en los vinos elaborados con las diferentes especies de levaduras no-*Saccharomyces*, se analizaron las diferencias existentes entre las cepas pertenecientes a la misma especie. Las especies en las que se incluían diferentes clones fueron *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans*. De forma general, las diferencias en los parámetros analíticos entre las cepas de las especies incluidas en el estudio fueron menores que las encontradas entre las distintas especies.

Con los parámetros analizados en esta fase del proceso de selección (Escribano et al., 2018), se construyó un dendrograma para determinar cómo se agrupaban los resultados de las vinificaciones de las diferentes cepas de la misma especie. Los resultados mostraron que la variación entre las cepas de *T. delbrueckii* fue menor que la encontrada entre las cepas de *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans*. En el dendrograma la mayoría de los clones de *T. delbrueckii* aparecieron agrupados juntos y las diferencias significativas entre los genotipos se encontraron únicamente en cuatro parámetros: el ácido málico consumido, la acidez volátil y la concentración de 1-butanol y de ácido isovalérico. En *M. pulcherrima*, las diferencias significativas entre los clones se detectaron en diferentes parámetros analíticos y varios compuestos aromáticos, de forma que tres de los clones se ubicaron en una rama o cluster del dendrograma y los otros dos en otra. Los tres clones agrupados en la primera rama coincidían en su composición fisicoquímica, mientras que los dos restantes eran más parecidos en cuanto a su composición aromática. En el caso de *L. thermotolerans*, los cuatro genotipos aparecieron agrupados en dos ramas diferenciadas principalmente por los parámetros de acidez. La producción de ácido láctico, característica de *L. thermotolerans*, varió ampliamente entre clones. De nuevo, se observó un factor cepa determinante, tal y como se ha publicado en diferentes estudios que han señalado la importancia de la heterogeneidad intraespecífica en levaduras no-*Saccharomyces* (Ciani & Maccarelli, 1998; Renault et al., 2009; van Breda, Jolly, & van Wyk, 2013). Por otro lado, Gamero y colaboradores (2016) observaron que en algunas especies de levaduras no convencionales los perfiles organolépticos de los vinos eran cepa-dependientes, mientras que en otras especies los distintos genotipos presentaban una gran homogeneidad.

Uno de los parámetros que presentó diferencias significativas entre los clones en las tres especies fue la acidez volátil. Además, en *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans* se observaron diferencias significativas en el acetato de etilo y la acetoína, que también pueden dar lugar a defectos aromáticos, lo que subraya la importancia de la selección de cepas para su empleo en vinificación.

Los resultados obtenidos en cuanto a la composición química del vino apuntaron a *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans* como buenas candidatas para ser empleadas como inóculo, la primera por su elevada producción de glicerol sin altos niveles de acidez volátil y la segunda por su capacidad para aumentar la acidez total de los vinos. Por otro lado, desde el punto de vista del aroma, *M. pulcherrima* también mostró características positivas, como el incremento del contenido en 2-fenil etanol y 2-fenil etil acetato. Estos compuestos aportan aromas frutales y florales, de gran importancia en vinos jóvenes. No obstante, la producción por parte de esta levadura de elevadas concentraciones de acetato de etilo podría causar desviaciones organolépticas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans*, se seleccionaron dos cepas de cada especie. En el caso de *M. pulcherrima* se eligieron dos de las cepas que presentaban una mayor producción de glicerol con niveles bajos de acidez volátil. En *T. delbrueckii*, debido a las escasas diferencias encontradas entre los clones en los parámetros estudiados en este ensayo, se seleccionaron dos de las cepas que presentaban un mayor número de actividades enzimáticas de interés. Por otra parte, las dos cepas de *C. zeylanoides*, la cepa de *Cr. uzbekistanensis* y cuatro de las cinco cepas de *W. pratensis* que no se habían implantado en el medio, finalmente fueron descartadas. Al tratarse de una especie poco estudiada en cuanto a sus aplicaciones enológicas, una de las cepas de *W. pratensis* se incluyó en la siguiente etapa con el fin de conocer con más detalle su comportamiento enológico.

Durante el desarrollo del estudio se realizaron diversos test de pureza para descartar contaminaciones cruzadas. En uno de ellos se observó que dos de las cepas consideradas inicialmente como *L. thermotolerans* en realidad contenían un 70% de colonias identificadas como *T. delbrueckii*, es decir, se trataba de inóculos mixtos espontáneos. Otros autores han señalado el interés de trabajar con inóculos mixtos (Benito, Calderón, & Benito, 2019a; Ciani & Comitini, 2015; Del Fresno et al., 2017) por lo que, debido al interés que podría tener esta combinación de cepas en la vinificación, se decidió contar con estos inóculos mixtos en el siguiente ensayo, incluyendo también las cepas individuales de *L. thermotolerans*, una vez purificado el cultivo. Finalmente, teniendo en cuenta los resultados de este ensayo y los datos obtenidos en los estudios anteriores, de las 24 cepas, nueve continuaron con el proceso de selección.

Además de las características fermentativas y la producción de compuestos aromáticos, en este ensayo se comprobó que las cepas de levaduras no completaban la fermentación de los mostos, por lo que para su aplicación como inóculo para la vinificación sería necesario llevar a cabo inoculaciones mixtas o secuenciales con *S. cerevisiae*. En base a este concepto se desarrolló la siguiente fase del proceso de selección.

3.3. Efecto de la inoculación secuencial no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae* en la composición fisicoquímica y aromática de los vinos tintos.

En esta etapa se evaluó el comportamiento de las cepas que fueron elegidas para continuar el proceso de selección en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae* llevadas a cabo en mosto de Tempranillo tinto no estéril. En el estudio se incluyeron nueve cepas pertenecientes a seis especies diferentes (*T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *Z. bailii*, *W. pratensis* y *C. zeylanoides*), además de los dos inóculos mixtos formados por *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* en proporción 70/30, porcentaje encontrado en el cultivo inicial. Los resultados se compararon con los obtenidos en fermentaciones llevadas a cabo con una cepa comercial de *S. cerevisiae*.

Los controles de implantación de las levaduras inoculadas mostraron que en el cuarto día (24 horas después de la inoculación de *S. cerevisiae*) *Z. bailii*, *W. pratensis*, *C. zeylanoides* y una de las cepas de *M. pulcherrima* ya no estaban presentes en el medio. La otra cepa de *M. pulcherrima* permaneció en el medio hasta el día cuatro, las cepas de *L. thermotolerans* permanecieron hasta el día cinco y las cepas de *T. delbrueckii* estuvieron presentes hasta el día seis. Los dos inóculos mixtos *L. thermotolerans*/*T. delbrueckii* mantuvieron las proporciones iniciales en las que habían sido inoculados hasta el momento en el que se añadió *S. cerevisiae* y se detectaron en el medio hasta el día seis.

Los resultados mostraron que los parámetros enológicos analizados presentaron diferencias entre los vinos fermentados con *S. cerevisiae* y los correspondientes a las inoculaciones secuenciales con levaduras no-*Saccharomyces*.

Los niveles de glicerol fueron más elevados en los vinos inoculados secuencialmente, con diferencias significativas respecto a los de *S. cerevisiae* en las cepas de *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* y los dos inóculos mixtos. Estudios anteriores han demostrado la capacidad de diferentes levaduras no-*Saccharomyces* para producir concentraciones elevadas de glicerol (Jolly et al., 2014; Masneuf-Pomarede et al., 2016; Rossouw & Bauer, 2016), lo que concuerda con nuestros resultados. De forma general, en las inoculaciones secuenciales se detectaron mayores niveles de etanol y mayor consumo de ácido málico que los alcanzados con *S. cerevisiae*. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Dutraive y colaboradores (2019), que también observaron un menor consumo de ácido málico en fermentaciones con *S. cerevisiae* que en fermentaciones secuenciales con diferentes levaduras no-*Saccharomyces*. A pesar de que las levaduras no-*Saccharomyces* han sido descritas tradicionalmente como grandes productoras de acidez volátil (Comitini et al., 2011), en este estudio tendieron a producir menores niveles de acidez volátil que los observados en *S. cerevisiae*. En general, los vinos de las fermentaciones

secuenciales presentaron mayores concentraciones de etanal y glicerol y valores más bajos de acidez volátil que los fermentados solo con *S. cerevisiae*.

La producción de aromas se estudió en dos momentos: a los tres días del encubado (antes de inocular *S. cerevisiae*) y al final de la FA. Tras el tratamiento estadístico de los datos de los compuestos aromáticos, se seleccionaron únicamente aquellos que presentaron diferencias significativas entre las diferentes vinificaciones y se emplearon para construir un dendrograma en el que se agruparon en clusters las distintas cepas en función de los atributos aromáticos, pudiendo establecer relaciones entre los perfiles aromáticos generados con cada tratamiento.

Los resultados del primer muestreo (a los tres días del encubado) mostraron que la vinificación únicamente con *S. cerevisiae* se separaba claramente de las elaboraciones con levaduras no-*Saccharomyces*, que se agrupaban en dos clusters diferentes. El cluster A estaba formado por *Z. bailii*, *W. pratensis*, *C. zeylanoides*, una de las cepas de *L. thermotolerans* y los inóculos mixtos. En el cluster B se ubicaban *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* y la otra cepa de *L. thermotolerans*. A excepción de *L. thermotolerans*, los distintos clones de la misma especie aparecieron juntos en el dendrograma, lo que indicó la existencia de pocas diferencias en el perfil aromático de los vinos inoculados con cepas de la misma especie. Tampoco se detectaron muchas diferencias significativas entre las muestras inoculadas con las levaduras no-*Saccharomyces* incluidas en los clusters A y B, destacando la tendencia de los aislados del cluster A a producir una menor concentración de alcoholes superiores que los aislados del cluster B. Por otro lado, la inoculación únicamente con *S. cerevisiae* generó concentraciones más altas de alcoholes superiores, acetatos y ácidos que las observadas en las vinificaciones con las levaduras no-*Saccharomyces*.

Los resultados del segundo muestreo, al final de la FA, mostraron que la mayoría de los vinos inoculados con las levaduras no-*Saccharomyces* se agrupaban junto con los inoculados únicamente con *S. cerevisiae*. Solamente las vinificaciones secuenciales inoculadas con *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* se agruparon en otro cluster, lo que indicaría que el perfil organoléptico de estos vinos se diferenció del resto. Sin embargo, los vinos que habían sido inoculados con el resto de levaduras no-*Saccharomyces* fueron más similares a los de *S. cerevisiae*. Las diferencias observadas en las vinificaciones secuenciales con *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* se debieron a concentraciones más elevadas de alcoholes superiores, propionato de etilo, acetoína y diacetilo. Estas dos especies permanecieron durante más tiempo en los depósitos, siendo más resistentes a las condiciones de FA y a la presión selectiva de *S. cerevisiae* en esta etapa, lo que indica la importancia de la capacidad de implantación del inóculo seleccionado para conseguir la modulación de las características del vino.

Al estudiar la evolución de la composición aromática durante la FA, se observaron diversos cambios en las vinificaciones. Por ejemplo, los niveles de lactato de etilo en el muestreo inicial fueron similares en todas las muestras inoculadas con las levaduras no-*Saccharomyces*, con la única excepción de una de las cepas de *T. delbrueckii* y en todos los casos con niveles más bajos que los detectados en *S. cerevisiae*. Sin embargo, al final de la FA los niveles de lactato de etilo de las muestras de *L. thermotolerans* fueron significativamente más elevados que los de *S. cerevisiae* y los del resto de levaduras no-*Saccharomyces*. Esto podría deberse a la necesidad de mayores niveles de etanol en el medio para la formación del éster. En su trabajo, Del Fresno y colaboradores (2017) solo detectaron lactato de etilo en fermentaciones con *L. thermotolerans*, lo que se explica por la habilidad de esta levadura para producir ácido láctico y la dependencia de la formación de lactato de etilo de los niveles de ácido láctico presentes en el medio.

En el primer muestreo, las muestras correspondientes a las vinificaciones secuenciales de los inóculos mixtos *T. delbrueckii/L. thermotolerans* se agruparon en el cluster A junto con las inoculadas con una de las cepas de *L. thermotolerans*, pero separadas de las de los dos aislados de *T. delbrueckii* y la otra cepa de *L. thermotolerans*. Sin embargo, al final de la FA las muestras de las vinificaciones con los dos inóculos mixtos se agruparon en el cluster A, esta vez separados de las de todos los aislados de *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii*. Esto indicó que los vinos obtenidos a partir de los inóculos mixtos tenían características diferentes a los inoculados con las especies del inóculo por separado. De hecho, los datos de los inóculos mixtos mostraron menores concentraciones de metionol que *T. delbrueckii*, menores concentraciones de ácido láctico y lactato de etilo que *L. thermotolerans* y menores concentraciones de diacetilo que las dos especies por separado.

En este estudio en el que se llevaron a cabo inoculaciones secuenciales con *S. cerevisiae*, se observaron menos diferencias en los vinos que en las fermentaciones puras con levaduras no-*Saccharomyces* realizadas en la etapa anterior (Escribano et al., 2018). La inoculación con *S. cerevisiae* habría dado lugar a una homogeneización en las características de los vinos obtenidos. Únicamente las vinificaciones con *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* mostraron diferencias en el perfil aromático del vino.

3.4. Estudio del efecto de la inoculación secuencial no-*Saccharomyces/S. cerevisiae* en la composición de antocianos y estilbenos de los vinos tintos

Los compuestos fenólicos son responsables del color, la astringencia y las propiedades antioxidantes del vino. En el proceso de selección de levaduras no-*Saccharomyces* se estudiaron los efectos que la vinificación con estos inóculos podía tener en la composición de antocianos y estilbenos (Escribano-Viana et al., 2019), compuestos polifenólicos relacionados con las

características del vino mencionadas anteriormente. El análisis de estos compuestos se llevó a cabo en los mismos vinos del ensayo anterior (Escribano-Viana et al., 2018) que habían sido elaborados por inoculación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*.

Los vinos inoculados en el encubado con *S. cerevisiae* alcanzaron un contenido de antocianinas totales de 221 mg/l y los obtenidos por inoculación secuencial con *W. pratensis*, *L. thermotolerans*, y los inóculos mixtos no mostraron diferencias significativas en el contenido de antocianinas respecto de *S. cerevisiae*. Sin embargo, en los vinos inoculados con *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *Z. bailii* y *C. zeylanoides* se observó un incremento significativo en el contenido de antocianinas respecto a los vinos fermentados únicamente con *S. cerevisiae*. En su trabajo, Chen y colaboradores (2018) observaron una mayor concentración de antocianinas totales en fermentaciones secuenciales con *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii* respecto de las fermentaciones llevadas a cabo con *S. cerevisiae*. Por su parte, Belda y colaboradores (2016a) mostraron incrementos en IC e IPT en fermentaciones mixtas con *M. pulcherrima* respecto a fermentaciones solo con *S. cerevisiae*. Estos autores relacionan las mejoras observadas en el color e IPT con la actividad pectinolítica que había sido detectada en la cepa empleada. Esta actividad también había sido detectada en las cepas de *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii* empleadas en nuestro trabajo (Escribano et al., 2017). Por otro lado, los parámetros enológicos estudiados muestran en los vinos inoculados con *M. pulcherrima* el valor más alto de IPT, lo que coincide con los resultados obtenidos en el estudio de Belda y colaboradores (2016a).

Algunos metabolitos producidos por las levaduras durante la FA como el ácido pirúvico o el acetaldehído pueden condensar con las antocianinas de la uva dando lugar a aductos muy estables, como las vitisinas A y B (Morata, Calderón, González, Gómez-Cordovés, & Suárez, 2007). Las concentraciones más altas de vitisina A se detectaron en los vinos inoculados con *Z. bailii* y *C. zeylanoides*, mientras que la concentración más baja fue la de los vinos inoculados con *L. thermotolerans*. En cuanto a los niveles de vitisina B, los más elevados fueron los de las vinificaciones con *L. thermotolerans* mientras que los vinos de los tratamientos con *M. pulcherrima*, *W. pratensis* y *S. cerevisiae* presentaron concentraciones significativamente más bajas de vitisina B. La vitisina B se forma a partir de la condensación del acetaldehído con la malvidina-3-glucósido (Morata et al., 2007). La mayor concentración de acetaldehído detectada en los vinos del tratamiento con *L. thermotolerans* podría haber facilitado la formación de estos aductos que favorecen la estabilización del color del vino.

En cuanto al contenido en estilbenos, las vinificaciones con *S. cerevisiae* mostraron los valores más bajos de estilbenos totales, *cis*-piceido, *trans*-piceido y *trans*-resveratrol. En los vinos inoculados con *C. zeylanoides* y *Z. bailii* el aumento en el contenido total de estilbenos y de cada uno de los tres compuestos estudiados fue significativo respecto al detectado en las vinificaciones

con *S. cerevisiae*. En el caso de los vinos del tratamiento con *T. delbrueckii*, los incrementos en el contenido de estilbenos fueron significativos respecto a *S. cerevisiae* excepto en el caso del *trans*-piceido. Varios trabajos han demostrado la influencia que diferentes cepas de levadura pueden tener en los niveles de estilbenos del vino (Clare, Skurray, & Shalliker, 2005; Kostadinović et al., 2012). Por otra parte, actividades enzimáticas como la β -glucosidasa pueden tener influencia en el contenido en resveratrol. Gaensly y colaboradores (2015) observaron que las cepas de levadura con esta actividad enzimática favorecían la hidrólisis del *trans*-piceido en *trans*-resveratrol. Debido a que los estilbenos se encuentran principalmente en el hollejo de la uva, las levaduras con actividades enzimáticas que mejoren su extracción pueden contribuir al aumento de su contenido en el vino. En este sentido, existen trabajos en los que se ha observado un incremento en los niveles de estilbenos en el mosto al llevar a cabo tratamientos con pectinasa en las uvas (Leblanc, Johnson, & Wilson, 2008). Las cepas de *C. zeylanoides*, *Z. bailii* y *T. delbrueckii* de nuestro trabajo, en cuyas vinificaciones se observaron incrementos significativos en el contenido en estilbenos, presentaban actividad pectinasa.

Por otro lado, se estudiaron las diferencias en el contenido de antocianinas y estilbenos entre las cepas de la misma especie de las levaduras no-*Saccharomyces* incluidas en el estudio. La única diferencia que se encontró fue en la concentración de petunidina-3-glucósido, que fue significativamente menor en la cepa 57 de *L. thermotolerans* que en la cepa 54.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio (Escribano-Viana et al., 2019), de entre las levaduras interesantes para la mejora del color y las propiedades antioxidantes del vino, se eligió una de las cepas de *M. pulcherrima* para ser evaluada en la última etapa de selección. Ya que no hubo diferencias significativas en los parámetros de color entre las dos cepas estudiadas, se seleccionó la cepa M28, que presentaba un mayor número de actividades enzimáticas relacionadas con el color del vino (Escribano et al., 2017). Por otro lado, la combinación de las características positivas que *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* aportaban al vino en los inóculos mixtos, como el aumento en el contenido de ácido láctico o glicerol, así como su permanencia durante la fermentación fue determinante en la selección del inóculo mixto para su estudio en la siguiente fase del trabajo. Se seleccionó el inóculo mixto LT1 debido a su permanencia durante la fermentación en proporciones algo más elevadas que las observadas en LT2 y por su mayor potencial para modular la acidez del vino, ya que en etapas anteriores del proceso de selección se había observado una mayor producción de ácido láctico en la cepa de *L. thermotolerans* presente en el inóculo mixto LT1.

Estudios previos han sugerido que el comportamiento de una misma cepa puede ser diferente dependiendo de la variedad de uva de la que se trate (Romano, Fiore, Paraggio, Caruso, & Capece, 2003), por lo que en la siguiente etapa de selección se decidió comprobar la influencia

de los inóculos seleccionados en vinificaciones llevadas a cabo con diferentes variedades de uva. Además, con el fin de observar el comportamiento de las cepas en condiciones similares a las de las vinificaciones industriales, los siguientes ensayos se llevaron a cabo en bodega experimental, similar a escala de planta piloto.

3.5. Influencia de las levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en las características de los vinos de tres variedades de uva diferentes

Esta etapa del estudio se llevó a cabo en la bodega experimental del ICVV con tres variedades de uva tinta de la D.O.Ca. Rioja: Tempranillo, Garnacha y Graciano (Escribano-Viana et al., 2020). Las levaduras seleccionadas para evaluar su impacto en las características de los diferentes vinos elaborados fueron *M. pulcherrima* y un inóculo mixto formado por *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii*. Las características de los vinos fermentados por inoculación secuencial con las cepas seleccionadas se compararon con las de los vinos control fermentados únicamente con una cepa comercial de *S. cerevisiae*.

El análisis discriminante canónico (ADC) de los parámetros enológicos estudiados en los mostos iniciales mostró que la variabilidad entre los mostos de las tres variedades se explicaba mediante dos funciones canónicas. En la primera función el parámetro más destacable fue el grado alcohólico probable y en la segunda el contenido en ácido málico. El mosto de Tempranillo presentó menor contenido en azúcar y alto contenido en ácido málico, el de Graciano se caracterizó por un bajo alcohol probable y elevada acidez total, mientras que el mosto de Garnacha tenía un valor alto de alcohol probable y un bajo contenido en ácido málico.

En cuanto a la carga microbiana de los mostos estudiados en un muestreo inicial, se observó que la población microbiana de Tempranillo y Graciano fue similar, con una población reducida de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* y una presencia elevada de *H. uvarum*. En Garnacha, la población del mosto inicial se caracterizó por una elevada proporción de *H. uvarum* y una elevada diversidad de otras especies entre las que se encontraba *S. cerevisiae* como especie residual. Estas diferencias intrínsecas en los mostos de partida podrían condicionar la implantación y actividad de los inóculos.

El desarrollo de la FA en los diferentes tratamientos de la variedad Tempranillo fue rápido, con una duración de seis días en el control y de siete días en los depósitos inoculados con no-*Saccharomyces*. En el muestreo realizado a los tres días tras el encubado, antes de la inoculación con *S. cerevisiae*, la implantación en los depósitos del inóculo de *M. pulcherrima* era del 60% y en los depósitos del inóculo mixto se detectó un 87% de *T. delbrueckii* y un 13% de *L. thermotolerans*.

La implantación de las levaduras inoculadas en los mostos de Garnacha fue menor que la observada en Tempranillo y las fermentaciones se extendieron hasta los ocho días. A los tres días del encubado, la implantación del inóculo de *M. pulcherrima* fue del 53% y en el caso del inóculo mixto se detectó un 23% de *T. delbrueckii* y un 17% de *L. thermotolerans*. Probablemente, la competencia de las otras especies presentes en el medio habría dificultado el establecimiento de las levaduras inoculadas.

En Graciano los porcentajes de implantación de las levaduras inoculadas también fueron menores que los observados en Tempranillo. En los depósitos de Graciano inoculados con *M. pulcherrima* los niveles de implantación del inóculo fueron los más bajos de las tres variedades, con un 17% el tercer día. Para el inóculo mixto los porcentajes de implantación a los tres días del encubado fueron del 43% para *T. delbrueckii* y del 6% para *L. thermotolerans*. La cinética fermentativa fue más lenta en esta variedad y las fermentaciones se extendieron hasta 12 días en el caso de los vinos control y hasta 13 días en los tratamientos con los inóculos de levaduras no-*Saccharomyces*.

Como muestran los resultados, los porcentajes de implantación de las levaduras no-*Saccharomyces* inoculadas fueron más altos en las muestras de Tempranillo que en las otras dos variedades. Probablemente la mayor implantación de los inóculos se debió a la adaptación previa de las cepas a las condiciones de esta variedad, ya que habían sido originalmente aisladas en elaboraciones con Tempranillo.

Una vez finalizada la FA se analizaron los parámetros enológicos de los vinos. Con el fin de detectar posibles diferencias entre los vinos debidas únicamente a la estrategia de inoculación, en el análisis estadístico no se incluyeron los datos del alcohol probable y el ácido málico, que eran diferentes y venían condicionados por el mosto de partida. Los resultados mostraron que la inoculación con *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans*/*T. delbrueckii* en las variedades Graciano y Garnacha no dieron lugar a cambios destacables en los parámetros enológicos, y solo las muestras de vino inoculadas secuencialmente con el inóculo mixto en Tempranillo se diferenciaron de las muestras control y las inoculadas con *M. pulcherrima*. Los vinos de Tempranillo elaborados con el inóculo mixto se caracterizaron por un pH bajo y una acidez total elevada, probablemente debidos a la capacidad de la cepa de *L. thermotolerans* del inóculo para producir ácido láctico (Gobbi et al., 2013; Morata et al., 2018).

El ADC llevado a cabo en los parámetros del color indicó que el índice de polifenoles totales era el parámetro que tenía más peso en la separación de las muestras de las diferentes variedades. Al igual que había ocurrido en el caso de los parámetros enológicos, en las muestras de Graciano y Garnacha no se observó separación en base al inóculo empleado en la vinificación. De nuevo, las muestras correspondientes al inóculo mixto en Tempranillo se separaron de las

otras dos estrategias de inoculación llevadas a cabo en esta variedad. Las muestras control y las inoculadas con *M. pulcherrima* presentaron niveles más elevados de IPT que los detectados en las muestras del inóculo mixto en Tempranillo. En la etapa anterior del proceso de selección (Escribano-Viana et al., 2019) también se habían observado valores de IPT significativamente más elevados en las vinificaciones con *M. pulcherrima* que los detectados en las muestras del inóculo mixto, aunque en este caso fueron también significativamente más altos que los observados en las muestras inoculadas solo con *S. cerevisiae*.

En lo referente a los compuestos aromáticos de los vinos de las tres variedades, las diferencias se debieron principalmente a los contenidos de 1-propanol, que aporta notas alcohólicas y a fruta madura. En Tempranillo, los vinos del inóculo LT presentaron concentraciones más elevadas de 1-propanol que los vinos control y los inoculados con *M. pulcherrima*. En el caso de los vinos de Garnacha y Graciano, las muestras control presentaron menores valores de este compuesto que las de los vinos elaborados con el inóculo mixto LT y los inoculados con *M. pulcherrima*. En su trabajo, Giudici y colaboradores (1993) mostraron que la formación de 1-propanol dependía de la cepa de levadura y de la variedad del mosto empleados. No obstante, aunque se observaron diferencias en el contenido de 1-propanol en los diferentes tratamientos, los valores no alcanzaron el límite de detección de este compuesto, establecido en 306 mg/l (Peinado, Moreno, Bueno, Moreno, & Mauricio, 2004). Por esta razón, las diferencias detectadas en los niveles de 1-propanol probablemente no darían lugar a diferencias sensoriales en los vinos.

El análisis multivariante del conjunto de los parámetros enológicos y de color tras la FML indicó que los vinos elaborados con el inóculo mixto en Tempranillo y Graciano se diferenciaron del resto, mientras que en Garnacha los vinos distintos fueron los inoculados con *M. pulcherrima*. La diferenciación de los vinos elaborados con el inóculo mixto en Tempranillo y Graciano podría deberse a la mejor implantación del inóculo en esas variedades, que habría permitido una mayor modulación de las características del vino. Por otro lado, la diferenciación de los vinos inoculados con *M. pulcherrima* en Garnacha podría deberse a la baja concentración inicial de antocianinas característica de los vinos de esta variedad (García-Beneytez, Revilla, & Cabello, 2002), que haría que el efecto de la inoculación de la levadura produjera cambios más significativos en estos parámetros en Garnacha. En etapas previas del proceso de selección se había observado un incremento significativo de la concentración de antocianinas en los vinos inoculados con *M. pulcherrima* (Escribano-Viana et al., 2019).

Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que la mayoría de las diferencias observadas debidas a la estrategia de inoculación se produjeron en los vinos de la variedad Tempranillo. Otros autores han indicado previamente la importancia de la variedad de uva

empleada en las vinificaciones llevadas a cabo con levaduras no-*Saccharomyces* (Duarte, Egipto, & Baleiras-Couto, 2019). El hecho de que las levaduras no-*Saccharomyces* empleadas en el presente estudio fueran originalmente aisladas en mostos de Tempranillo podría ser una de las causas de los resultados obtenidos. La preadaptación de las cepas a las condiciones de los mostos de esta variedad podría haber propiciado la mejor implantación de las levaduras observada. De esta forma, la mayor modulación de las características detectada en los vinos de Tempranillo estaría ligada a la mejor implantación y desarrollo de las levaduras en el mosto y por consiguiente a su mayor participación durante la vinificación. Los resultados de este trabajo subrayan la importancia de la variedad de uva como factor a tener en cuenta en la selección y empleo de inóculos de levaduras en vinificación con el objetivo de conseguir una diferenciación del vino elaborado.

3.6. Selección final del inóculo de levaduras no-*Saccharomyces*

En los ensayos anteriores se pudo comprobar que el inóculo LT1 formado por *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* mostró una mayor capacidad para implantarse en el medio durante la fermentación, así como para permanecer durante un tiempo más prolongado en los depósitos. Por otro lado, la combinación de las características de las dos cepas que forman el inóculo permitió la liberación de compuestos de interés para la calidad del vino como el glicerol, el lactato de etilo o el ácido láctico, característico de *L. thermotolerans*.

Este inóculo presentaba actividades enzimáticas relacionadas con el aroma como esterasa, esterasa-lipasa, lipasa, β -glucosidasa o leucina arilamidasa y valina arilamidasa, estas dos últimas relacionadas también con el color y la clarificación del vino. Además de la presencia de actividades enzimáticas, a lo largo del proceso de selección se realizaron ensayos que permitieron conocer otras características del inóculo. Así, el inóculo seleccionado resiste una concentración de 20 mg/l sulfuroso a las 24 horas, tiene fenotipo killer neutro, no inhibe la cepa neutra de *S. cerevisiae* y no inhibe *B. bruxellensis*. Asimismo, se ha observado una mejora del contenido en vitisina B de los vinos elaborados secuencialmente con este inóculo mixto. Las características del inóculo seleccionado se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características del inóculo mixto *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans* seleccionado.

Características del inóculo		
Resistencia al SO ₂ (24 h)	20 mg/l	
Fenotipo killer	Neutro	
Inhibición de <i>S. cerevisiae</i>	No	
Inhibición de <i>B. bruxellensis</i>	No	
Actividades enzimáticas	Esterasa	+
	Esterasa-lipasa	+
	Lipasa	+
	B-glucosidasa	+
	Leucina A	+
	Valina A	+
Poder fermentativo	8%	
Producción ácido láctico	Significativa	
Producción glicerol	Significativa	
Producción de lactato de etilo	Significativa	
Formación de vitisina B	Significativa	

Considerando sus características positivas para la calidad de los vinos, y dado que no existe en el mercado un inóculo compuesto por estas especies de levaduras no-*Saccharomyces*, el inóculo mixto de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* TL1 podría tener potencial para ser comercializado, por lo que es el que finalmente ha sido seleccionado en este estudio.

Capítulo VI

Conclusiones/Conclusions

Las conclusiones que pueden extraerse de los resultados obtenidos en este trabajo son las siguientes:

1. La producción de enzimas de interés enológico presentó una elevada variabilidad intraespecífica en las levaduras no-*Saccharomyces* incluidas en el estudio.
2. Se encontraron diferencias significativas en la producción de ácido láctico entre los diferentes clones de *L. thermotolerans*.
3. *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* individualmente o formando parte de los inóculos mixtos fueron las levaduras que más tiempo permanecieron en los depósitos durante la fermentación.
4. La inoculación secuencial con *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* produjo un incremento significativo en el contenido en glicerol de los vinos.
5. Los vinos elaborados mediante inoculación secuencial con las levaduras *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* mostraron perfiles aromáticos diferenciados de los fermentados únicamente con *S. cerevisiae* y de los inoculados secuencialmente con el resto de levaduras.
6. La inoculación secuencial con los inóculos mixtos *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans* dio lugar a vinos diferentes de los elaborados individualmente con cada especie.
7. Los vinos elaborados mediante inoculación secuencial con las levaduras *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *Z. bailii* y *C. zeylanoides* mostraron un incremento significativo en el contenido de antocianinas totales respecto a los vinos fermentados solo con *S. cerevisiae*.
8. La inoculación secuencial con las levaduras *C. zeylanoides*, *T. delbrueckii* y *Z. bailii* produjo un incremento significativo en el contenido de estilbenos totales respecto a los vinos fermentados solo con *S. cerevisiae*.
9. Los vinos inoculados secuencialmente con *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*, los inóculos mixtos *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans*, *Z. bailii* y *C. zeylanoides* mostraron un incremento en el contenido en vitisina B respecto a los vinos fermentados solo con *S. cerevisiae*.
10. La fermentación secuencial con el inóculo mixto *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans* dio lugar a más cambios en los parámetros enológicos de los vinos de Tempranillo que en los vinos de Garnacha y Graciano.
11. La inoculación con levaduras no-*Saccharomyces* debe ajustarse a las propiedades y características de la variedad de uva que se emplee en la vinificación con el fin de incrementar la heterogeneidad del producto final.
12. Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas, aromáticas y el color de los vinos, se ha seleccionado un inóculo mixto formado por *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans* para su uso en inoculación secuencial con *S. cerevisiae* en la elaboración de vinos tintos.

Conclusión general:

El proceso de selección de levaduras no-*Saccharomyces* ha permitido obtener un inóculo mixto formado por las levaduras *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* en proporciones 70/30, que ha demostrado ser adecuado para la producción de vinos tintos de calidad. Este inóculo incrementó el nivel de acidez y el contenido en glicerol y lactato de etilo del vino, además de contribuir a la mejora de la estabilidad del color mediante el aumento de la concentración de aductos como la vitisina B.

The conclusions that can be drawn from the results obtained in this work are the following:

1. The production of enzymes of enological significance showed a wide intraspecific variability within the non-*Saccharomyces* yeasts included in the study.
2. Significant differences were found in the lactic acid production between the clones of *L. thermotolerans*.
3. *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* alone or in the mixed inocula were the yeasts that remained longer in tanks during fermentation.
4. Sequential inoculation with *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* gave rise to a significant increase in the glycerol content of the wines.
5. The wines made by sequential inoculation with the yeasts *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* showed different aromatic profiles from those fermented only with *S. cerevisiae* and from those sequentially inoculated with the rest of the yeasts.
6. Sequential inoculation with the mixed inocula *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans* gave rise to wines different from those made individually with each species
7. The wines sequentially fermented with *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *Z. bailii* and *C. zeylanoides* showed a significant increase in total anthocyanin content compared to wines fermented only with *S. cerevisiae*.
8. Sequential inoculation with *C. zeylanoides*, *T. delbrueckii* and *Z. bailii* gave rise to a significant increase in total stilbene content compared to wines fermented only with *S. cerevisiae*.
9. The wines sequentially inoculated with *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*, the mixed inocula *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans*, *Z. bailii* and *C. zeylanoides* showed an increase in vitisin B content compared to wines fermented only with *S. cerevisiae*.
10. Sequential fermentation with the mixed inoculum *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans* induced more oenological changes in Tempranillo wines than in Grenache and Graciano wines.
11. The inoculation with non-*Saccharomyces* should be adjusted to the properties and features of a specific grape variety in order to increase the heterogeneity of the final product.
12. Taking into account the physicochemical, aromatic and color characteristics of the produced wines, a mixed inoculum formed by *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans* has been selected for use in sequential inoculation with *S. cerevisiae* in red winemaking.

General conclusion:

The non-*Saccharomyces* yeast selection process has allowed to obtain a mixed inoculum formed by the yeasts *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* in 70/30 proportions, which has proven to be suitable for the production of quality red wines. This inoculum increased the acidity level and the glycerol and ethyl lactate content of the wine, in addition to contributing to the improvement of the color stability by increasing the concentration of vitisin B.

Bibliografía

- Abrahamse, C. E., & Bartowsky, E. J. (2012). Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: Influence on chemical composition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0814-3>
- Albergaria, H., & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2035–2046. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0>
- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., & Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: Current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.013>
- Aranda, A., Jiménez-Martí, E., Orozco, H., Matallana, E., & Del Olmo, M. (2006). Sulfur and adenine metabolisms are linked, and both modulate sulfite resistance in wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5839–5846. <https://doi.org/10.1021/jf060851b>
- Aranda, A., Matallana, E., del Olmo, M. (2005) Levaduras. *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación. En Carrascosa, A. V., Muñoz, R. y González, R. (Eds.) *Microbiología del vino* (pp 273-297). Madrid, España. AMV Ediciones.
- Azzolini, M., Tosi, E., Vagnoli, P., Krieger, S., & Zapparoli, G. (2010). Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Italian Journal of Food Science*, 22(3), 257–263.
- Bae, S., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 712–727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02890.x>
- Barbosa, C., Lage, P., Esteves, M., Chambel, L., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2018). Molecular and phenotypic characterization of *Metschnikowia pulcherrima* strains from Douro Wine Region. *Fermentation*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation4010008>
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Salvesen, G., & Fred Woessner, J. (2013). Introduction. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00838-3>
- Bartowsky, E. J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation - Moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 174–187. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x>

- Bauer, F. F., & Pretorius, I. S. (2019). Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine - A review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 21(1), 27–51. <https://doi.org/10.21548/21-1-3557>
- Belda, I., Conchillo, L. B., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016a). Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.003>
- Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016b). Unraveling the enzymatic basis of wine “Flavorome”: A phylo-functional study of wine related yeast species. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00012>
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., ... Santos, A. (2017). Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 257(June), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdiou, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019a). Mixed alcoholic fermentation of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* and its influence on mannose-containing polysaccharides wine Composition. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0738-0>
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019b). The influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters. *Fermentation*, 5(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030054>
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., & Benito, S. (2015). Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules*, 20(6), 9510–9523. <https://doi.org/10.3390/molecules20069510>

- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Palmero, D., & Suárez-Lepe, J. A. (2013). Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines. *European Food Research and Technology*, 236(1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1836-2>
- Benito, S, Morata, A., Palomero, F., & González, M. C. (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chemistry*, 124(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.096>
- Benito, S, Palomero, F., Morata, A., & Uthurry, C. (2009). Minimization of ethylphenol precursors in red wines via the formation of pyranoanthocyanins by selected yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2–3), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.015>
- Benito, Santiago, Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., ... Rauhut, D. (2015). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Food Research and Technology*, 241(5), 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Berbegal, C., Garofalo, C., Russo, P., Pati, S., Capozzi, V., & Spano, G. (2017). Use of autochthonous yeasts and bacteria in order to control *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Fermentation*, 3(4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040065>
- Berg, H., Filipello, E., Hinreiner, E. & Webb, A., 1955. Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines: I. Water solutions for pure substances. *Food Technology*. 9, 23-26.
- Berry, D.R., 1995. *Alcoholic beverage fermentations*. En: Lea, A.G.H. & Piggott, J.R. (Eds). *Fermented beverage production*. Blackie Academic & Professional, Glasgow. pp. 32-44.
- Boutou, S., & Chatonnet, P. (2007). Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A*, 1141(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.106>
- Câmara, A. de A., Maréchal, P. A., Tourdot-Maréchal, R., & Husson, F. (2019). Dehydration stress responses of yeasts *Torulasporea delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*: Effects of glutathione and trehalose biosynthesis. *Food Microbiology*, 79(November 2018), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.008>

- Canonico, L., Comitini, F., Oro, L., & Ciani, M. (2016). Sequential fermentation with selected immobilized non-*Saccharomyces* yeast for reduction of ethanol content in wine. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00278>
- Capece, A., Fiore, C., Maraz, A., & Romano, P. (2005). Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 136–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02434.x>
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*, 181, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>
- Caridi, A., De Bruno, A., De Salvo, E., Piscopo, A., Poiana, M., & Sidari, R. (2017). Selected yeasts to enhance phenolic content and quality in red wine from low pigmented grapes. *European Food Research and Technology*, 243(3), 367–378. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2750-9>
- Casalone, E., Colella, C. M., Daly, S., Gallori, E., Moriani, L., & Polsinelli, M. (1992). Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 22(6), 435–440. <https://doi.org/10.1007/BF00326407>
- Casassa, L. F., Bolcato, E. A., & Sari, S. E. (2015). Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak. *Food Chemistry*, 174, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.146>
- Charoenchai, C., Fleet, G. h., Henschke, P. a., & 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(1), 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. -n, & Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
- Chatonnet, P., Viala, C., & Dubourdieu, D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(4), 443 LP – 448. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/48/4/443.abstract>

- Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J. M., Morata, A., Tesfaye, W., ... Benito, S. (2018). Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology*, *69*, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.018>
- Ciani, M., & Fatichenti, F. (2001). Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(7), 3058–3063. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3058-3063.2001>
- Ciani, M., & Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*(2), 199–203. <https://doi.org/10.1023/A:1008825928354>
- Ciani, Maurizio, & Comitini, F. (2006). Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behaviour of *Candida stellata* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(6), 619–623. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9080-6>
- Ciani, Maurizio, & Comitini, F. (2011). Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of Microbiology*, *61*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0069-5>
- Ciani, M., & Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, *1*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, *10*(2), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Ciani, M., & Ferraro, L. (1996). Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(1), 128–132. <https://doi.org/10.1128/aem.62.1.128-132.1996>
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J. A., ... Gonzalez, R. (2016). Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00642>
- Clare, S. S., Skurray, G. R., & Shalliker, R. A. (2005). Effect of yeast strain selection on the concentration of cis- and trans-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(1), 9–14. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00274.x>

- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., & Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21(2), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00063-7)
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Comitini, F., & Ciani, M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: Purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiology Letters*, 316(1), 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02194.x>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Comitini F., Gobbi M., Languet P., Ciani M. (2009) Zymocidal activity of two killer yeasts to keep under control the development of *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. Book abstracts 2nd International Symposium "Micro Safety Wine" Martina Franca (TA), Italy, 18-20 November, p. 22.
- Comitini, F., Ingeniis De, J., Pepe, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 238(1), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.040>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1670–1678. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., & Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research and Technology*, 236(1), 193–207. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1874-9>

- Corison, C. A., Ough, C. S., Berg, H. W., & Nelson, K. E. (1979). Must acetic acid and ethyl acetate as mold and rot indicators in grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(2), 130–134.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36(4), 290–301. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/36/4/290.short>
- De Santis, D., & Frangipane, M. T. (2010). Effect of prefermentative cold maceration on the aroma and phenolic profiles of a Merlot red wine. *Italian Journal of Food Science*, 22(1), 47–53.
- Degré, R. (1993) Selection and Commercial Cultivation of Wine Yeast and Bacteria. En: Fleet, G. H. (Ed.) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood, Chur, Switzerland.
- Del Fresno, J. M., Morata, A., Loira, I., Bañuelos, M. A., Escott, C., Benito, S., ... Suárez-Lepe, J. A. (2017). Use of non-*Saccharomyces* in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. *European Food Research and Technology*, 243(12), 2175–2185. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2920-4>
- Di Maio, S., Genna, G., Gandolfo, V., Amore, G., Ciaccio, M., & Oliva, D. (2012). Presence of *Candida zemplinina* in sicilian musts and selection of a strain for wine mixed fermentations. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 33(1), 80–87. <https://doi.org/10.21548/33-1-1309>
- Dittrich HH, Großmann M (2005) Mikrobiologie des Weines. Ulmer, Stuttgart
- Divol, B., Du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 601–613. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4186-x>
- Dizy, M., & Bisson, L. F. (2000). Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 155–167.
- Domínguez, C., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. (2002). Determination of volatile phenols in fino sherry wines. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 95–102. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01581-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01581-1)
- Downey, M. O., Dokoozlian, N. K., & Krstic, M. P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 257–268.

- Du, G., Zhan, J., Li, J., You, Y., Zhao, Y., & Huang, W. (2012). Effect of fermentation temperature and culture medium on glycerol and ethanol during wine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(1), 132–138. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11067>
- Duarte, F. L., Egipto, R., & Baleiras-Couto, M. M. (2019). Mixed fermentation with *Metschnikowia pulcherrima* using different grape varieties. *Fermentation*, 5(3), 5–7. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030059>
- Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Des Gachons, C. P., & Murat, M. L. (2006). The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: The example of Sauvignon blanc. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(1), 81–88.
- Dutraive, O., Benito, S., Fritsch, S., Beisert, B., Patz, C. D., & Rauhut, D. (2019). Effect of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts on riesling wine chemical composition. *Fermentation*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation5030079>
- Echave, J., Barral, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Bottle aging and storage of wines: A review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(3). <https://doi.org/10.3390/molecules26030713>
- Eglinton, J.M. & Henschke, P.A. (1999) The occurrence of volatile acidity in Australian wines. *Australian Grapegrower & Winemaker*, pp. 7-12.
- Erasmus, J. D., Cliff, M., van Vuuren H.J.J. (2004) Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 55: 371-378.
- Escribano-Viana, R., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R. & González-Arenzana, L. (2020). Do non-*Saccharomyces* yeasts work equally with three different red grape varieties? *Fermentation* (2020) 6(1), 3.
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., ... Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*, 112(March), 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.06.018>
- Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., ... González-Arenzana, L. (2019). Effect of the sequential inoculation of non-*Saccharomyces/Saccharomyces* on the anthocyanins and stilbenes composition of Tempranillo wines. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00773>

- Escribano, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., ... Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(6), 1521–1531. <https://doi.org/10.1111/jam.13735>
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., ... Santamaría, P. (2017). Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(6), 1555–1564. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2587-7>
- Fernández-González, M., Di Stefano, R., & Briones, A. (2003). Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiology*, *20*(1), 35–41.
- Fernández, M., Úbeda, J. F., & Briones, A. I. (2000). Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology*, *59*(1–2), 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00283-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00283-X)
- Ferreira, A. M., Clímaco, M. C., & 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01348.x>
- François, J., & Parrou, J. L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(1), 125–145. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00059-0)
- Gaensly, F., Agustini, B. C., da Silva, G. A., Picheth, G., & Bonfim, T. M. B. (2015). Autochthonous yeasts with β -glucosidase activity increase resveratrol concentration during the alcoholic fermentation of *Vitis labrusca* grape must. *Journal of Functional Foods*, *19*, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.041>
- Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.006>
- Ganga, M. A., & Martínez, C. (2004). Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, *96*(1), 76–83. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02080.x>

- Ganga, M. A., Piñaga, F., Querol, A., Vallés, S., & Ramón, D. (2001). Cell-wall degrading enzymes in the release of grape aroma precursors. *Food Science and Technology International*, 7(1), 83–87. <https://doi.org/10.1106/7CAF-U2DW-BBH2-VUQV>
- García-Beneytez, E., Revilla, E., & Cabello, F. (2002). Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *European Food Research and Technology*, 215(1), 32–37. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0526-x>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., & Arroyo, T. (2016). Non-*Saccharomyces* yeasts: biotechnological role for wine production. *Grape and Wine Biotechnology*, (October). <https://doi.org/10.5772/64957>
- Garijo Jiménez, M. P. (2013). Estudio del aire como vía de diseminación de microorganismos enológicos, 3–28. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/41551.pdf>
- Giaramida, P., Ponticello, G., Di Maio, S., Squadrito, M., Genna, G., Barone, E., ... Oliva, D. (2013). *Candida zemplinina* for production of wines with less alcohol and more glycerol. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(2), 204–211. <https://doi.org/10.21548/34-2-1095>
- Giudici, P., Zambonelli, C., & Kunkee, R. E. (1993). Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(1), 17–21.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33(2), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2016). Genetic and phenotypic intraspecific variability of non-*Saccharomyces* yeasts populations from la rioja winegrowing region (Spain). *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.13341>
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., ... Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*, 240(5), 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>

- González, R., Muñoz, R. & Carrascosa, A. V. (2005) Producción de cultivos iniciadores para elaborar vino. En: Carrascosa, A. V., Muñoz, R. y González, R. (Eds.) *Microbiología del vino* (pp 318-341). Madrid, España. AMV Ediciones.
- González, R., Quirós, M., & Morales, P. (2013). 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 and Technology*, 29(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.015>
- Goretti, M., Turchetti, B., Buratta, M., Branda, E., Corazzi, L., Vaughan-Martini, A., & Buzzini, P. (2009). In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.013>
- Hashizume, K., & Samuta, T. (1997). Green odorants of grape cluster stem and their ability to cause a wine stemmy flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1333–1337. <https://doi.org/10.1021/jf960635a>
- He, F., Liang, N., Mu, L., Pan, Q., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. (2012a). Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, 17(2), 1483–1519. <https://doi.org/10.3390/molecules17021483>
- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012b). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2), 1571–1601. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>
- Henschke, P.A. (1997). Wine yeasts. En: Zimmermann F.K., Entian K.D., eds, *Yeast sugar metabolism*, Technomic Publishing Co., Lancaster, Pennsylvania, pp. 527- 560.
- Hernández-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., & Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry*, 107(3), 1064–1077. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.032>
- Hidalgo, J. (2011). *Tratado de enología* (2ª edición). Madrid, España: Mundi Prensa.
- Holland, R., Liu, S. Q., Crow, V. L., Delabre, M. L., Lubbers, M., Bennett, M., & Norris, G. (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*, 15(6–9), 711–718. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.012>

- Hong, M., Li, J., & Chen, Y. (2019). Characterization of tolerance and multi-enzyme activities in non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Vidal blanc icewine fermentation. *Journal of Food Biochemistry*, 43(11), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13027>
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 15–39.
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Kántor, A., Hutková, J., Petrová, J., Hleba, L., & Kačániová, M. (2016). Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 05(03), 282–285. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015/16.5.3.282-285>
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., & Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 735–739. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9283-5>
- Kostadinović, S., Wilkens, A., Stefova, M., Ivanova, V., Vojnoski, B., Mirhosseini, H., & Winterhalter, P. (2012). Stilbene levels and antioxidant activity of Vranec and Merlot wines from Macedonia: Effect of variety and enological practices. *Food Chemistry*, 135(4), 3003–3009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.118>
- Krieger-Weber, S. (2009) Application of yeast and bacteria as starter cultures. En: König, H., Uden, G. & Fröhlich, J. (Eds.) *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Berlin-Heidelberg, Alemania. Springer.
- Kürbel, H., & Rauhut, D. (1996) Identification of wine aroma defects caused by sulfur-containing metabolites of yeasts. In *Oenologie 95: 5e. Symposium International d'Oenologie* (pp. 515-519). Technique & Documentation.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *Definition, classification and nomenclature of the yeasts*. *The Yeasts* (Vol. 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00001-X>
- Lagace, L.S. y Bisson L.F. (1990) Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *American Journal of Enology and Viticulture* Vol. 41 (2), 147-155.
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(Special Issue), 97–129.

- Leblanc, M. R., Johnson, C. E., & Wilson, P. W. (2008). Influence of pressing method on juice stilbene content in muscadine and bunch grapes. *Journal of Food Science*, 73(4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00733.x>
- Li, E., & Mira de Orduña, R. (2017). Acetaldehyde kinetics of enological yeast during alcoholic fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(2), 229–236. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1879-7>
- Lin, M. M. H., Boss, P. K., Walker, M. E., Sumbly, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2020). Evaluation of indigenous non-*Saccharomyces* yeasts isolated from a South Australian vineyard for their potential as wine starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 312(June 2019), 108373. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108373>
- Linderholm, A. L., Findleton, C. L., Kumar, G., Hong, Y., & Bisson, L. F. (2008). Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1418–1427. <https://doi.org/10.1128/AEM.01758-07>
- Liu, J., Arneborg, N., Toldam-Andersen, T. B., Zhang, S., Petersen, M. A., & Bredie, W. L. P. (2017). Impact of sequential co-culture fermentations on flavour characters of Solaris wines. *European Food Research and Technology*, 243(3), 437–445. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2757-2>
- Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M. J., González, C., Calderón, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2015). Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspora delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Research International*, 76, 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.030>
- Lonvaud-Funel, A. (2010). 3 - Effects of malolactic fermentation on wine quality. *Managing wine quality*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-798-3.50003-6>
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., & Desens, C. (1988). Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44(2), 183–191. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740440209>
- Lopes, C. A., Rodríguez, M. E., Sangorrín, M., Querol, A., & Caballero, A. C. (2007). Patagonian wines: The selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(8), 539–546. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0227-3>
- Louw, C., Grange, D. La, Pretorius, I. S., & Rensburg, P. Van. (2006). The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour, 125, 447–461. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.029>

- Louw, L., Tredoux, A. G. J., van Rensburg, P., Kidd, M., Naes, T., & Nieuwoudt, H. H. (2010). Fermentation-derived aroma compounds in varietal young wines from South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *31*(2), 213–225. <https://doi.org/10.21548/31-2-1418>
- Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., & Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science and Technology*, *40*(1), 6–19. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.001>
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., & Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, *10*(3), 369–400. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.3.369>
- Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P., & Albertin, W. (2016). The genetics of non-conventional wine yeasts: Current knowledge and future challenges. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01563>
- Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Kuchen, B., Toro, M. E., Mercado, L. A., Vazquez, F., & Combina, M. (2019). Optimization of fermentation-relevant factors: A strategy to reduce ethanol in red wine by sequential culture of native yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, *289*(April 2018), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.016>
- Maturano, Y. P., Rodríguez Assaf, L. A., Toro, M. E., Nally, M. C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L. I., ... Vazquez, F. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *155*(1–2), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015>
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., ... Carrau, F. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, *141*(3), 2513–2521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.056>
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
- Mierczynska-Vasilev, A., & Smith, P. A. (2015). Current state of knowledge and challenges in wine clarification. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *21*, 615–626. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12198>

- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- Morata, A., Calderón, F., González, M. C., Gómez-Cordovés, M. C., & Suárez, J. A. (2007). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food Chemistry*, 100(3), 1144–1152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.024>
- Morata, A., Escott, C., Loira, I., Del Fresno, J. M., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). Influence of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in the formation of pyranoanthocyanins and polymeric pigments during red wine making. *Molecules*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/molecules24244490>
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M. A., González, C., & Suárez Lepe, J. A. (2018). *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>
- Nissen, P., Nielsen, D., & Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell - cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, 20(4), 331–341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>
- Noble, A. C., & Bursick, G. F. (1984). Viscosity and sweetness in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), 110–112.
- Nykänen, L.L., Nykänen, I. & Suomalainen, H., 1977. Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium. *J. Inst. Brew.* 83, 32-34.
- Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2013). Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination. *Food Control*, 34(2), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.044>
- Ocón, E., Gutiérrez, A. R., Garijo, P., López, R., & Santamaría, P. (2010). Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology*, 27(8), 1023–1027. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.012>
- Ocón, E., Gutiérrez, A. R., Garijo, P., Tenorio, C., López, I., López, R., & Santamaría, P. (2010). Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. *European Food Research and Technology*, 230(6), 885–891. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1233-7>

- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, *116*(5), 1209–1217. <https://doi.org/10.1111/jam.12446>
- Ough, C. S., Fong, D., & Amerine, M. A. (1972). Glycerol in wine: determination and some factors affecting. *American Journal of Enology and Viticulture*, *23*(1), 1–5.
- Padilla, B., Gil, J. V., & 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*(MAR), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, *47*, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>
- Park, H., & Bakalinsky, A. T. (2000). SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (Chichester, England), *16*(10), 881–888.
- Parker, M., Capone, D. L., Francis, I. L., & Herderich, M. J. (2018). Aroma precursors in grapes and wine: flavor release during wine production and consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(10), 2281–2286. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05255>
- Pascual, O., González-Royo, E., Gil, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J. M., ... Zamora, F. (2016). Influence of grape seeds and stems on wine composition and astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(34), 6555–6566. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01806>
- Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., & Mauricio, J. C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, *84*(4), 585–590. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00282-6)
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., & Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - Influence of different culture conditions. *Food Microbiology*, *21*(4), 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.009>
- Pizarro, F., Vargas, F. A., Agosin, E. (2007) A systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast*, *24* (11), 977-91.

- Prior, K. J., Bauer, F. F., & Divol, B. (2019). The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine. *Food Microbiology*, 79(December 2018), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.002>
- Querol, A., Huerta, T., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: Selection and DNA patterns. *Journal of Food Science*, 57(1), 183–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05451.x>
- Querol, A., Manzanares, P., & Ramón, D. (1999). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of b -D-xylosidase activity, 46, 105–112.
- Quirós, M., Rojas, V., González, R., & Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>
- Radler, F., & Schtitz, H. (1982). Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33(1), 36–40.
- Rainieri, S., & Pretorius, I. S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*, 50(1), 15–31.
- Rankine, B. C., & Bridson, D. A. (1971). Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 22(1), 6–12.
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., ... 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.06768-11>
- Rapp, A. & Mandery, H. (1986) Wine aroma. *Experientia* 42, 873-884.
- Rapp, A., & Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Developments in Food Science*, 37(C), 1659–1694. [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80257-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80257-8)
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud-Funel, A. (2007). *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications* (Vol. Second). West Sussex, England: John Willey and son.

- Rodríguez, M. E., Infante, J. J., Molina, M., Domínguez, M., Rebordinos, L., & Cantoral, J. M. (2010). Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(4), 1292–1302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04524.x>
- Rodríguez, María Eugenia, Lopes, C. A., Barbagelata, R. J., Barda, N. B., & Caballero, A. C. (2010). Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *International Journal of Food Microbiology*, *138*(1–2), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025>
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, *70*(3), 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00552-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00552-9)
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 181–188. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00255-1)
- Roland, A., Cavelier, F. & Schneider, R. (2012) Los tioles varietales: información actualizada sobre las vías de la biogénesis y el impacto de técnicas vitivinícolas. ACE: Revista de enología, ISSN-e 134, 1697-4123.
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Divol, B. (2018). Altered fermentation performances, growth, and metabolic footprints reveal competition for nutrients between yeast species inoculated in synthetic grape juice-like medium. *Frontiers in Microbiology*, *9*(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3)
- Romano, P., Capece, A., & Jespersen, L. (2006). *Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts. Yeasts in Food and Beverages*. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_2
- Romano, P., & Suzzi, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(2), 309–315. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.309-315.1996>
- Rossouw, D., & Bauer, F. F. (2016). Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food Microbiology*, *55*, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.017>

- Santamaría, P., López, R., Portu, J., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Gutiérrez A.R., Garde-Cerdán, T. (2015) Role of phenylalanine in Viticulture and Enology, En: Elliamson D (Ed.) Phenylalanine. Dietary, sources, functions and health effects. Nova Publisher, New York, pp 49–70.
- Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., & Baumes, R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2 SPEC. ISS.), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.057>
- Schvarczová, E., Štefániková, J., Jankura, E., & Kolek, E. (2017). Selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains for production of typical Pinot Gris wines. *Journal of Food and Nutrition Research*, 56(4), 389–397.
- Semon, M. J., Edwards, C. G., Forsyth, D., & Dinn, C. O. (2001). Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(1), 52–59. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00194.x>
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., & Tourdot-Maréchal, R. (2018). Inoculation of *Torulasporea delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Research International*, 107(January), 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.034>
- Simonin, S., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., ... Tourdot-Maréchal, R. (2020). Bio-protection as an alternative to sulphites: Impact on chemical and microbial characteristics of red wines. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01308>
- Sipiczki, M. (2006). *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6716–6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-06>
- Smith, B. D., & Divol, B. (2016). *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiology*, 59, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.008>
- Spayd, S. E., Tarara, J. M., Mee, D. L., & Ferguson, J. C. (2002). Separation of light and temp on Merlot. *Am. J. Enol. Vitic.*, 3(December 2001), 171–182.

- Spiropoulos, A., & Bisson, L. F. (2000). MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4421–4426. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4421-4426.2000>
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. J. (2015). *Brettanomyces* yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., & Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 182–190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x>
- Suárez-Lepe, J.A. & Íñigo, B. (2004) Microbiología Enológica. Fundamentos de vinificación (p. 716) Madrid, España. Mundi Prensa.
- Suárez-Lepe J.A. & Morata, A. (2015) Actividad b glicosidasa y degradación de antocianos. En: Levaduras para vinificación en tinto. AMV ediciones, Madrid, pp 146–147.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Swiegers, Jan H., Kievit, R. L., Siebert, T., Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., ... Pretorius, I. S. (2009). The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiology*, 26(2), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.08.004>
- Swiegers, Jan H., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Advances in Applied Microbiology*, 57(SUPPL. A), 131–175. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(05\)57005-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(05)57005-9)
- Taing, O., & Taing, K. (2007). Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *European Food Research and Technology*, 224(3), 343–347. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0323-z>
- Tavares, M. J., Güldener, U., Mendes-Ferreira, A., & Mira, N. P. (2021). Genome sequencing, annotation and exploration of the SO₂-tolerant non-conventional yeast *Saccharomycodes ludwigii*. *BMC Genomics*, 22(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07438-z>
- Tominaga, T., Des Gachons, C. P., & 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. <https://doi.org/10.1021/jf980481u>

- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00144-7)
- Trinh, T. T. T., Woon, W. Y., Yu, B., Curran, P., & Liu, S. Q. (2010). Effect of L-isoleucine and L-phenylalanine addition on aroma compound formation during longan juice fermentation by a co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 116–124. <https://doi.org/10.21548/31-2-1408>
- Tristezza, M., Fantastico, L., Vetrano, C., Bleve, G., Corallo, D., Mita, G., & Grieco, F. (2014). Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of Susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy. *International Journal of Microbiology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/897428>
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., ... Grieco, F. (2013). Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food Microbiology*, 36(2), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.001>
- Türkel, S., Korukluoğlu, M., & Yavuz, M. (2014). Biocontrol activity of the local strain of *Metschnikowia pulcherrima* on different postharvest pathogens. *Biotechnology Research International*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/397167>
- Ugliano, M., Kolouchova, R., & Henschke, P. A. (2011). Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: Influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(3), 423–429. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0786-6>
- van Breda, V., Jolly, N., & van Wyk, J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2–3), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.011>
- Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., McLean, H., & Henschke, P. A. (2009). Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with “wild” indigenous and inoculated yeasts: Role of yeast volatile compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(3), 238–248. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00054.x>
- Vernhet, A. (2018). *Red Wine Clarification and Stabilization*. *Red Wine Technology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00016-5>

- Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S., & Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*, 25(6), 778–785. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.015>
- Viegas, C. A., Rosa, M. F., Correia, I. S., & Novais, J. M. (1989). Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 21–28. <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.21-28.1989>
- Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., & Côrte-Real, M. (2008). Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 881–890. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1616-x>
- Vilela, A. (2018). *Lachancea thermotolerans*, the Non-*Saccharomyces* yeast that reduces the volatile acidity of wines. *Fermentation*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation4030056>
- Werner-Washburne, Braun, E., Johnston, G. C. & Singer, R. A. (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 57, 2. pp. 383-401.
- Zamora, F. (2009). *Biochemistry of alcoholic fermentation*. En Moreno-Arribas, M.V. y Polo, M.C. (Eds.) *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp 3-26). Nueva York, EE.UU. Springer.
- Zapparoli, G., Tosi, E., Azzolini, M., Vagnoli, P., & Krieger, S. (2009). Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in high-alcohol wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 30(1), 49–55. <https://doi.org/10.21548/30-1-1424>
- Zara, G., & Nardi, T. (2021). Yeast metabolism and its exploitation in emerging winemaking trends: From sulfite tolerance to sulfite reduction. *Fermentation*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation7020057>
- Zhang, P., Zhang, R., Sirisena, S., Gan, R., & Fang, Z. (2021). Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiology*, 100(June), 103859. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103859>
- Zoecklein, B. W., Marcy, J. E., Williams, J. M., & Jasinski, Y. (1997). Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* on glycosyl glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(1), 55–65. <https://doi.org/10.1006/jfca.1996.0518>
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., & Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001>

Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., & Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology*, *151*(2), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026>



Instituto de
Ciencias de la
Vid y del Vino

