



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado

Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Título de la Tesis

“Análisis del proteoma y volatiloema de nuevas cepas de levadura silvestres con mejor aptitud enológica para afrontar la adaptación de la enología al cambio climático”

Thesis Title

“Proteome and volatilome analysis of new wild yeast strains with good oenological aptitude to face the adaptation of oenology to climate change”

Directores

RAFAEL A. PEINADO AMORES

JUAN CARLOS GARCÍA MAURICIO

Autor

FRANCISCO JOSÉ MARTÍN GARCÍA

Fecha de depósito de la Tesis

1 de mayo de 2024

TITULO: *Análisis del proteoma y volatiloma de nuevas cepas de levadura silvestres con mejor aptitud enológica para afrontar la adaptación de la enología al cambio climático.*

AUTOR: *Francisco José Martín García*

© Edita: UCOPress. 2024
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

**DOCTORANDA/O**

Francisco José Martín García

TÍTULO DE LA TESIS:

Análisis del proteoma y volatiloema de nuevas cepas de levadura silvestres con mejor aptitud enológica para afrontar la adaptación de la enología al cambio climático

INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS**(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)**

Los doctores JUAN CARLOS GARCÍA MAURICIO, Catedrático de Universidad del Área de Microbiología del Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología de la Universidad de Córdoba y RAFAEL ANDRÉS PEINADO AMORES, Catedrático de Universidad del Área de Química Agrícola y Edafología del Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación presentado por Don Francisco José Martín García, titulado "ANÁLISIS DEL PROTEOMA Y VOLATILOEMA DE NUEVAS CEPAS DE LEVADURA SILVESTRES CON MEJOR APTITUD ENOLÓGICA PARA AFRONTAR LA ADAPTACIÓN DE LA ENOLOGÍA AL CAMBIO CLIMÁTICO" se ha realizado bajo la dirección y supervisión de ambos directores en los laboratorios del Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología de la Universidad de Córdoba, y reúne las condiciones exigidas para su presentación y defensa pública como Tesis Doctoral.

El trabajo presentado por D. Francisco José Martín García, Graduado en Biología por la Universidad de Córdoba, se encuadra en la línea de investigación "Proteómica y metabolómica de levaduras vínicas" integrada dentro del programa científico del grupo de investigación AGR-146 (VITICULTURA Y ENOLOGÍA, "Vitenol", <http://www.uco.es/investiga/grupos/vitenol/>), del que es miembro. Este grupo está formado por un equipo de investigación multidisciplinar compuesto por químicos, microbiólogos y enólogos, que trabajan de una manera colaborativa en todos sus proyectos vigentes. Esta línea de investigación tiene como objetivo principal estudiar la relación de la composición y condiciones de los medios fermentativos y de crianza de los vinos con la respuesta de las levaduras vínicas, así como la identificación de las proteínas expresadas y de los metabolitos afectados.

El doctorando Francisco José Martín García ha desarrollado, desde su incorporación al programa de doctorado Biociencias y Ciencias Agroalimentarias, una intensa y excelente actividad investigadora y docente, cuya novedad e interés para la comunidad científica internacional está avalada por la publicación incorporada en la Tesis Doctoral como primer autor de un artículo de investigación en una revista internacional de un elevado índice de impacto indexada en el segundo cuartil del Journal Citation Reports (JCR) en las categorías de Biotecnología y Microbiología Aplicada.

El doctorando ha realizado una extensa revisión bibliográfica de las publicaciones más relevantes y actuales sobre su tema de investigación, que le ha permitido elaborar una importante introducción de la Tesis Doctoral. Esta introducción consiste en una descripción detallada del proceso de vinificación y, desde un extenso punto de vista microbiológico, de la fermentación alcohólica. También aborda en profundidad la problemática vigente que conlleva un escenario de cambio climático en España sobre los cultivos de vid, la integridad de la uva y las consecuencias organolépticas del producto final, así como las principales vías paliativas y de investigación surgidas en los últimos tiempos para afrontar la situación. Sin duda, esta exhaustiva y actualizada introducción puede servir como base para la publicación de una o dos revisiones sobre el tema.

El fundamento de esta Tesis Doctoral estriba en el uso de herramientas ómicas como la metabolómica y la proteómica para el estudio de la eficiencia fermentativa de levaduras en condiciones de estrés, así como para la evaluación del aroma de los productos vínicos producidos de sus fermentaciones.

Las investigaciones realizadas en la presente Tesis se han dirigido, fundamentalmente, a estudiar el efecto de diversos factores similares a los propiciados por un escenario de cambio climático en el metaboloma y el proteoma de levaduras silvestres con potencial enológico para afrontarlas, comparando sus aptitudes fermentativas y su resistencia a dichos factores con los de una levadura comercial.

Los objetivos planteados tienen una sólida coherencia y han facilitado la obtención de unos resultados importantes e

innovadores dentro del área de Ciencias y Tecnología de los Alimentos. La colaboración interdisciplinar Microbiología – Química Enológica ha hecho posible la consecución de los objetivos propuestos en la Tesis, obteniéndose un artículo publicado en referencia a uno de ellos y ostentando como perspectivas próximas de futuro la publicación de varios más, referentes al resto de objetivos.

El conocimiento generado en esta Tesis Doctoral y su transferencia al sector agroalimentario y a la comunidad científica permitirá disponer de herramientas interesantes, sostenibles y comprometidas con el medio ambiente para tratar de mitigar los efectos del cambio climático sin perder la calidad organoléptica ni la identidad de los productos vínicos de cada zona productora de vinos. Todo ello en un país cuya situación geográfica presenta especial susceptibilidad a un potencial cambio climático que podría perjudicar, a medio y corto plazo y en un extenso rango, la rica, variada e internacionalmente alabada industria vitivinícola española.

En dos ocasiones, el doctorando ha sido premiado en congresos científicos por su originalidad y por la utilidad y aplicabilidad que pueden suponer sus resultados para el sector vitivinícola andaluz y español.

Por todo lo expuesto, se considera que la investigación desarrollada y recogida en la presente memoria reúne los requisitos de interés, originalidad, novedad y calidad científica exigidos para una Tesis Doctoral por la Universidad de Córdoba, y se emite este informe favorable para la presentación de la Tesis Doctoral de D. Francisco José Martín García.

Este trabajo se ha realizado gracias a los siguientes proyectos:

Intervenciones agronómicas y enológicas para mitigar los efectos del cambio climático sobre la maduración de la uva y la calidad del vino (Proyectos Propios de Innovación y Transferencia de la Universidad de Córdoba, ref.: PPIT_2022E_025820).

Análisis del proteoma y exo-metaboloma de las cepas de levadura de la uva con mejor aptitud enológica para la fermentación de mostos de vides silvestres (Contrato artículo 83 LOU, ref.:12017081).

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 30 de abril de 2024

Las/los directoras/es

Fdo.: Rafael A. Peinado Amores
Juan Carlos García Mauricio

INFORME CON EL FACTOR DE IMPACTO Y CUARTIL DEL JOURNAL CITATION REPORTS (JCR)

Esta Tesis Doctoral cuenta con un artículo publicado en la revista científica de alto índice de impacto internacional Fermentation, la cual está incluida en el segundo cuartil según la última relación publicada, en 2022, por el Journal Citation Reports (JCR) en la categoría Biotechnology & Applied Microbiology. La siguiente tabla recoge la información referente a dicha publicación, citable como Martín-García *et al.*, 2023.

<i>Título del artículo</i>	The effect of yeast, sugar and sulfur dioxide on the volatile compounds in wine
<i>Autores</i>	Martín-García, F. J., Palacios-Fernández, S., López de Lerma, N., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., Peinado, R.
<i>Revista científica</i>	Fermentation
<i>Año de publicación</i>	2023
<i>Índice de impacto (JCR)</i>	3.7
<i>Cuartil</i>	Q2
<i>Categoría</i>	Biotechnology & Applied Microbiology
<i>DOI</i>	10.3390/fermentation9060541
<i>Número de citas</i>	1

AGRADECIMIENTOS

La recompensa al esfuerzo en todos nuestros propósitos, sean grandes, pequeños, duros o llevaderos, se alcanza justo en ese momento... ese instante único e irrepetible, en el que pensamos: “Por fin, lo conseguí”. En mi caso, uno de los objetivos que con más envergadura me he propuesto hasta la fecha ha sido ser doctor y contribuir a nuestra excelente comunidad científica, atravesando en el camino una de las etapas más gratificantes y enriquecedoras de mi vida. Como dicen por ahí: “Algunas veces se gana, y otras... se aprende”, y aunque estos seis años han estado plagados de vivencias, intensas en un amplio espectro, todas ellas han contribuido a hacer de mí quien soy hoy en día.

Trabajar en un laboratorio ha servido para cultivarme no solo a nivel científico, sino también en la buena organización y el respeto por mi entorno de trabajo. He aprendido a cuidar al máximo mis experimentos, dedicándoles el tiempo, la paciencia y la consideración que merecen. Por otra parte, elaborar una tesis doctoral, enfrentarme a hablar públicamente en congresos y ponencias, y publicar mi primer artículo científico no siempre han resultado tarea fácil; sin embargo, los resultados han logrado que todo mereciese la pena. He de destacar la magnífica experiencia que ha supuesto ser profesor sustituto interino durante un periodo breve, pero intenso. Gracias a ello, considero que he descubierto una apasionante vocación profesional.

No obstante, en la escalera hacia la meta, la cual también debo reconocer que, en ocasiones, ha conllevado un ascenso lento, difícil e irregular, lo realmente inolvidable para mí han sido las personas que me han acompañado, orientado, enseñado, y mostrado su apoyo y su cariño. Es muy posible que mi trabajo, sobre todo el “sprint” final, haya sido motivado en gran parte por la fuerza recibida de todas estas personas.

Por ello, gracias a mis amigos/as de toda la vida, los que siempre están ahí, aunque no siempre hayamos sido conscientes. Me habéis visto crecer, con todo lo que eso implica, y habéis dejado una marca eterna en mí. Gracias, mis “Paciphihtah”, por seguir a mi lado. También quiero darles las gracias a mi gran familia del teatro y los musicales. Gracias por ser mi bálsamo en las adversidades y por sacarme a una terraza a tomar algo cuando

llevaba demasiado tiempo con el flexo como única fuente de luz. Gracias, mis artistas, por acogerme y no soltarme. Y no quisiera dejarme a nadie atrás, pero, aunque no dé nombres, sé que algunos/as os sentiréis identificados/as con la palabra “incondicional”. Mil gracias a mis incondicionales, por teneros a mi lado, por las risas y los llantos, por ser mi refugio.

Con permiso, por haber sido como mi segunda casa durante casi diez años, dedico, de forma más personal, unos párrafos de mis agradecimientos al Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología de la Universidad de Córdoba. Muchas personas han transitado por sus pasillos y ocupado sus despachos: profesores/as, becarios/as y técnicos. Aunque algunas personas ya no estén, todas ellas, junto a las que continúan, me han transmitido no solo su admirable profesionalidad, sino su enorme amor por el trabajo que desempeñan, así como un compañerismo que difícilmente se encuentra.

Gracias a M^a Carmen Millán, Pepe Aguilar y Pepe Ramos, del área de Microbiología. Hacéis y habéis hecho de este departamento un lugar de luz con una estela inapagable. Muchas gracias también a Pilar Martínez, por tu inestimable ayuda y tu cercanía durante mi experiencia como profesor, cediéndome temporalmente el testigo de tu impecable trabajo. Gracias a M^a Carmen Fernández y Esther Martínez por vuestra eterna disposición y simpatía durante estos años. ¡Sin vuestra ayuda habría sido muy difícil ser profesor de prácticas! A los/as profesores/as del área de Química Agrícola: María Pérez, Lourdes Moyano, Azahara López, Julieta Mérida, Juan Martín y Keka; por sus palabras de aliento y su sonrisa constante.

A mis compañeros/as y amigos/as que ya alzaron el vuelo para convertirse en inmensos profesionales: Juanan, Minami, Yeni, Núria, Silvia y Sandra; mil gracias. ¡Seguid volando alto y ojalá nos reencontremos muchas veces! Destaco a una persona a la que debo muchísimo y de quien jamás podré olvidar su entrega, su cariño y su fuerza. Gracias, May, por dejar en este trabajo y en mí mismo un legado muy importante.

A los que yo llamaré siempre “mis compañeros/as” de departamento, entre los que nombro a Rafa Martínez, Trini, Juan Carlos, Juanito, Josemi, Cristina y Roger. ¡Os deseo lo mejor en vuestros caminos! También a nuestros/as vecinos/as de Microbiología

Agrícola, destacando a Francis, Ángel, Gabi, Eli y Helena; y a los/as profesores/as Andrés Bermúdez, Alberto Ramírez y Elena Pérez. Gracias por hacerme sentir uno más.

De todos/as mis compañero/as, debo, por muchos motivos, destacar a tres que, muy especialmente, quiero conservar siempre como amigos del corazón. Juanje: mi confidente, mi amigo, entre nosotros sobran las palabras. Es un orgullo haberte conocido y nunca podré olvidar tu apoyo, tu ayuda y tantos buenos momentos vividos. Te mereces todo lo bueno del mundo. Irene: para mí, la definición de persona luchadora, constante, entregada y tenaz. No dejes de luchar, porque eres una leona. Gracias por compartir esta dura etapa conmigo. Jaime: mi ejemplo a seguir, y el que muchos deberían tener. Gracias por demostrarme que, más allá de los laboratorios y las collejas, estás para todo y más. A los tres: no sé qué podría haber mejor que teneros a mi lado estos años, y los que vendrán.

Mi agradecimiento y admiración más sinceros a Juan Moreno, director del equipo de investigación Vitenol, por ser una de las primeras personas en abrirme las puertas de este maravilloso departamento y brindarme la oportunidad de trabajar en él. A Teresa García, por ser como una madre para todos nosotros y por confiar siempre en mí, incluso cuando las fuerzas flaqueaban, tanto a ti como a mí. Nunca olvidaré el gran apoyo que me has dado para continuar y no rendirme. También quiero expresar mi agradecimiento a Carlos Fuentes, a Francisco Amil y a los equipos del IRTA-INCAVI y del Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química, por vuestra espléndida labor científica.

Me gustaría añadir que, en este trabajo, hay, sin duda, dos grandes maestros y referentes para mí. Rafael Peinado Amores y Juan Carlos García Mauricio, me siento muy satisfecho y orgulloso de haber sido tutorizado por vosotros, muy agradecido por vuestra comprensión y por vuestro conocimiento y, sobre todo, por vuestra entrega, paciencia y cercanía. Considero que la gran virtud que define a un maestro es que, cuando ama lo que hace, consigue transmitir esa pasión en sus enseñanzas. Gracias por amar lo que hacéis.

Finalmente, quisiera dedicar este trabajo a mi familia. A mis padres, Paco y Mercedes, por no dejar de apostar por mí; a mi hermana Esther (Gracias por regalarme tu arte en los dibujos que decoran estas portadas); a mis cuatro abuelos/as, y a mis tíos/as y primos/as. Gracias por seguir mis pasos en esta etapa, creer siempre en mis metas y animarme constantemente a no tirar nunca la toalla. La lucha y el esfuerzo incansable es una de las grandes herencias que recibo de vosotros. Por último, gracias a Fran, un zorrillo

que apareció sin avisar y desde entonces espero que jamás se marche. Gracias por ser un equipo conmigo, mi gran apoyo y el mejor compañero de aventuras. ¡Os quiero!

Como podréis ver, el premio no es solo ser doctor... también lo es el gran crecimiento profesional y personal adquirido en el proceso. Esta etapa se acaba, pero para las mentes inquietas siempre hay nuevos objetivos por lograr. Deseo que, en todos ellos, sigáis formando parte de mi vida, y me permitáis a mí seguir siendo parte de las vuestras.

Os quisiera dedicar, por último, una fórmula que, en muchos momentos de esta etapa predoctoral, me ha ayudado a seguir **P**ersistiendo. Por supuesto, con música de por medio, ya que ésta nunca dejará de acompañarme. Espero que esta fórmula, igual que me ha ayudado a mí, pueda seguir presente no solo en el resto de los desafíos y aventuras de mi vida, sino también en los de quienes luchen sin descanso por materializar sus sueños.

Fórmula de las tres “P”s:

- Que nunca falte la **PACIENCIA**:

Y distinguir, en mitad del quiero y duelo, si se ha parado el velero o navega en calma.
“Quiero y duelo” (Karmento).

- Que nunca falte la **PERSEVERANCIA**:

Cuando el duelo termine y levite mi ser, abriré bien mis brazos sin miedo a perder, que no hay peso ni sogas que amarren mis pies. Volaré, volaré, volaré.
“Mirlo blanco” (Vega).

- Que nunca falte la **PASIÓN**:

Que no habrá cielo tan alto que no pueda tocar con mis manos. Sí, eso es lo que quiero.
Dame una oportunidad, quiero dejar mis huellas en la eternidad.
“Una oportunidad” (Aslánticos).

¡Muchas gracias a todos/as!

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. El vino y la vid	9
1.1.1. Expansión histórica y geográfica de la vid: globalización de la enología	9
1.1.2. Condiciones climáticas adecuadas para el cultivo de la vid	12
1.1.3. El vino en España: zonas vitivinícolas del territorio español	14
1.1.4. Maduración de la uva del vino	18
1.1.5. Aspectos generales de la vinificación	22
1.2. Microbiología del vino	25
1.2.1. Fermentación alcohólica	25
1.2.2. Microorganismos involucrados en el proceso de fermentación	27
1.2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
1.2.4. Cinética de crecimiento durante el proceso fermentativo	33
1.2.5. Criterios de selección de cepas fermentadoras	35
1.2.6. Levaduras autóctonas y comerciales	36
1.3. Ciencias ómicas en la enología	37
1.3.1. Concepto y tipos	37
1.3.2. Proteómica	39
1.3.2. Metabolómica	42
1.4. Análisis del vino	46
1.4.1. Parámetros enológicos	46
1.4.2. Perfil aromático del vino. Compuestos que contribuyen al aroma	48
1.5. Cambio climático en la industria vitivinícola	59
1.5.1. Cambio climático: concepto y repercusión a nivel global	59
1.5.2. Efectos del cambio climático en la vid y el vino de España	62
1.5.3. Estrategias de lucha del sector vitivinícola frente al calentamiento global	64
1.5.4. Líneas de investigación en el ámbito biológico	67
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS	69
2.1. Justificación	71

2.2. Objetivos	72
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
3.1. Microorganismos.....	75
3.2. Procedimiento general y diseño de la experimentación.....	76
3.3. Medios de cultivo y fermentación	77
3.4. Cultivos microbiológicos y condiciones experimentales	78
3.5. Análisis de la cinética de fermentación y estimación del grado alcohólico....	81
3.6. Análisis de parámetros enológicos.....	82
3.7. Análisis metabólico	83
3.7.1. Determinación de compuestos volátiles mayoritarios.....	83
3.7.2. Determinación de compuestos volátiles minoritarios	84
3.7.3. Cálculo de series aromáticas	86
3.8. Análisis proteómico.....	88
3.8.1. Lisis celular, solubilización de proteínas y limpieza de extractos proteicos..	88
3.8.2. Determinación de la cantidad de proteínas en los extractos	89
3.8.3. Separación y determinación de proteínas.....	90
3.9. Búsqueda en bases de datos	92
3.10. Análisis estadístico	92
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
4.1. Capítulo I. Análisis de los parámetros enológicos y del perfil aromático de los vinos de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestres y una cepa comercial con buena aptitud enológica frente a los efectos del cambio climático	97
4.1.1. Parámetros enológicos	99
4.1.2. Compuestos volátiles	103
4.1.3. Perfil aromático.....	113
4.1.4. Análisis multivariante.....	115
4.1.5. Análisis de conglomerados.....	117
4.1.6. Análisis de Componentes Principales	120
4.2. Capítulo II. Evaluación de los efectos del anhídrido sulfuroso en la concentración de compuestos mayoritarios de los vinos fermentados por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestres y una comercial con buena aptitud enológica frente a los efectos del cambio climático	127
4.2.1. Compuestos volátiles mayoritarios	129
4.2.2. Análisis de Componentes Principales	137

4.3. Capítulo III. Evaluación de la influencia del alto contenido en azúcares y de anhídrido sulfuroso en la eficiencia fermentativa de dos cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> silvestres y una cepa comercial en el perfil aromático de sus vinos ...	145
4.3.1. Resumen.....	147
4.3.2. Artículo: “The effect of yeast, sugar and sulfur dioxide on the volatile compounds in wine” (Martín-García <i>et al.</i> , 2023).....	149
4.3.3. Material suplementario del artículo Martín-García <i>et al.</i> , 2023.....	164
4.4. Capítulo IV. Análisis del proteoma de dos cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (una silvestre y una comercial) con buen potencial enológico frente a la acción del cambio climático en dos condiciones de adición de anhídrido sulfuroso	171
4.4.1. Evaluación cualitativa de perfiles proteómicos por análisis de intersección	174
4.4.2. Análisis de agrupamiento jerárquico de proteínas por patrones de cuantificación	175
4.4.3. Evaluación de la expresión de proteínas de respuesta a estrés.....	178
4.4.3.1. Proteínas de respuesta a estrés osmótico	179
4.4.3.2. Proteínas de respuesta a estrés oxidativo.....	186
5. CONCLUSIONES	193
5.1. Conclusiones	195
5.2. Perspectivas futuras.....	198
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	201
7. ANEXO I. Tablas suplementarias	241
8. ANEXO II. Contribuciones científicas.....	285
8.1. Contribuciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral.....	287
8.1.1. Publicación científica	287
8.1.2. Comunicaciones en congresos	287
8.1.3. Reconocimientos	288
8.2. Contribuciones científicas no derivadas de la Tesis Doctoral.....	288
8.2.1. Publicación científica	288
8.2.2. Comunicaciones en congresos	289

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Jarra neolítica del sitio de Khramis Didi Gora (Museo Nacional de Georgia).....	10
Figura 2. Distribución geográfica de las regiones productoras de vino a nivel mundial	12
Figura 3. Diversidad climática en España	14
Figura 4. Denominaciones de Origen de vinos de España	16
Figura 5. Estructura general de los ácidos benzoicos y cinámicos y principales representantes de cada grupo	20
Figura 6. Estructura general de los flavonoides y principales grupos agrupados por las características estructurales del heterociclo	21
Figura 7. Resumen esquematizado del proceso general de vinificación	22
Figura 8. Formación de etanol a partir de ácido pirúvico durante la fermentación alcohólica.....	27
Figura 9. Etapas de la curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> durante la fermentación alcohólica	34
Figura 10. Niveles de investigación ómica relacionados con el proceso fermentativo del vino.....	38
Figura 11. Esquema de funcionamiento de la técnica GC-MS	44
Figura 12. Rutas de biosíntesis de isoprenoides	51
Figura 13. Vías de síntesis de los alcoholes superiores	54
Figura 14. Sumario de los efectos del estrés por altas temperaturas en el metabolismo de la uva	62
Figura 15. 15a: Sistema de baño termostático con dedo frío acoplado; 15b: Mostos en fermentación	80
Figura 16. 16a: Mosto al inicio del proceso fermentativo; 16b: Mosto con burbujas y turbidez.....	82
Figura 17. Equipo GC-FID empleado para la detección de compuestos mayoritarios	83
Figura 18. Equipo GC-MS empleado para la detección de compuestos volátiles minoritarios.....	85
Figura 19. 19a: Agitador Vibrogen; 19b: Secador de vacío SpeedVac	88
Figura 20. Espectrofotómetro UV-VIS	90
Figura 21. Niveles (% v/v) de etanol cuantificados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio .	99
Figura 22. Niveles (g/L) de azúcares residuales de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	100
Figura 23. Niveles (g ácido tartárico/L) de acidez titulable de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	101
Figura 24. Niveles (g ácido acético/L) de acidez volátil de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	101
Figura 25. Niveles (g/L) de ácido málico de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio.....	102
Figura 26. Niveles (mg/L) de nitrógeno fácilmente asimilable de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	102
Figura 27. Niveles (mg/L) de ácidos grasos detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	104
Figura 28. Niveles (mg/L) de alcoholes detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	105
Figura 29. Niveles (mg/L) de acetatos detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio .	107
Figura 30. Niveles (mg/L) de ésteres etílicos detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	108
Figura 31. Niveles (mg/L) de lactonas detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio .	109

Figura 32. Niveles (mg/L) de compuestos carbonílicos detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio.....	110
Figura 33. Niveles (µg/L) de nor-isoprenoides detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	111
Figura 34. Niveles (µg/L) de terpenoides detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio.....	112
Figura 35. Diagramas radiales construidos por análisis multivariantes de los VAOs de las series aromáticas en las diferentes condiciones de estudio, obtenidos de vinos fermentados a 18 °C con SO ₂ (a), a 18 °C sin SO ₂ ; (b), a 25 °C con SO ₂ ; (c) y a 25 °C sin SO ₂ (d).....	116
Figura 36. Análisis de conglomerados de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio que comparan las muestras fermentadas a 18 °C (36a) y a 25 °C (36b)	118
Figura 36 (Continuación). Análisis de conglomerados de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio que comparan las muestras fermentadas a partir de mostos con SO ₂ (c) y sin SO ₂ (d).....	119
Figura 37. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio a 18 °C, usando las series aromáticas como variables de clasificación.....	121
Figura 38. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio a 25 °C, usando las series aromáticas como variables de clasificación.....	122
Figura 39. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio con SO ₂ en mostos, usando las series aromáticas como variables de clasificación	124
Figura 40. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio sin SO ₂ en mostos, usando las series aromáticas como variables de clasificación	125
Figura 41. Niveles (mg/L) de alcoholes isoamílicos de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	130
Figura 42. Niveles (mg/L) de 2-feniletanol y metanol de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	131
Figura 43. Niveles (mg/L) de isobutanol y propanol de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	132
Figura 44. Niveles (mg/L) de glicerina de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	133
Figura 45. Niveles (mg/L) de ambos estereoisómeros del 2,3-butanodiol (<i>levo</i> y <i>meso</i>) de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	134
Figura 46. Niveles (mg/L) de ambos estereoisómeros de acetato de etilo y succinato de dietilo de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	135
Figura 47. Niveles (mg/L) de acetaldehído y acetoina de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio	136
Figura 48. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio a 18 °C, usando los compuestos mayoritarios como variables de clasificación	138
Figura 49. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio a 25 °C, usando los compuestos mayoritarios como variables de clasificación	139
Figura 50. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio con SO ₂ en los mostos, usando los compuestos mayoritarios como variables de clasificación	141

Figura 51. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio sin SO ₂ en los mostos, usando los compuestos mayoritarios como variables de clasificación	142
Figura 52. Gráfico de intersección de las proteínas de las levaduras de estudio (B6 y LC) identificadas de forma válida.....	174
Figura 53. Mapa de calor que representa el agrupamiento jerárquico de las proteínas identificadas como válidas y detectadas en todas las muestras de estudio	176
Figura 54. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T0 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en ausencia de SO ₂	180
Figura 55. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T1 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en presencia o ausencia de SO ₂	181
Figura 56. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T2 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en presencia o ausencia de SO ₂	183
Figura 57. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0.05), identificadas por su AN, por parte de la levadura B6 en presencia o ausencia de SO ₂ y en todos los tiempos de muestreo	184
Figura 58. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0.05), identificadas por su AN, por parte de la levadura LC en presencia o ausencia de SO ₂ y en todos los tiempos de muestreo	185
Figura 59. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T0 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en ausencia de SO ₂	187
Figura 60. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T1 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en ausencia de SO ₂	188
Figura 61. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T2 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en ausencia de SO ₂	189
Figura 62. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, por parte de la levadura B6 en presencia o ausencia de SO ₂ y en todos los tiempos de muestreo	191
Figura 63. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, por parte de la levadura LC en presencia o ausencia de SO ₂ y en todos los tiempos de muestreo	192

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Contenidos máximos de SO₂ total (mg/L) permitidos en la UE en los vinos</i>	24
Tabla 2. <i>Propiedades valorables como criterios de selección de cepas de levadura con características enológicas óptimas</i>	36
Tabla 3. <i>Nomenclatura de las levaduras silvestres de estudio</i>	75
Tabla 4. <i>Composición de los medios de cultivo utilizados en el proyecto</i>	77
Tabla 5. <i>Series aromáticas establecidas para describir el perfil odorante de los vinos de estudio, compuestos que contribuyen a ellas y sus umbrales de percepción (µg/L)</i>	86
Tabla 5 (Continuación). <i>Series aromáticas establecidas para describir el perfil odorante de los vinos de estudio, compuestos que contribuyen a ellas y sus umbrales de percepción (µg/L)</i>	87
Tabla 6. <i>Nomenclatura de las muestras procesadas en el estudio proteómico</i>	173
Tabla 7. <i>Proteínas de respuesta a estrés osmótico cuya expresión es significativamente diferencial entre las muestras de estudio, con un q-value < 0.05</i>	179
Tabla 8. <i>Proteínas de respuesta a estrés oxidativo cuya expresión es significativamente diferencial entre las muestras de estudio, con un q-value < 0.05</i>	186
Tabla A1. <i>Niveles promedio de los parámetros enológicos evaluados en las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en presencia de SO₂</i>	243
Tabla A2. <i>Niveles promedio de los parámetros enológicos evaluados en las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en ausencia de SO₂</i>	244
Tabla A3. <i>Niveles promedio de los parámetros enológicos evaluados en las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 25 °C en presencia de SO₂</i>	245
Tabla A4. <i>Niveles promedio de los parámetros enológicos evaluados en las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 25 °C en ausencia de SO₂</i>	246
Tabla A5. <i>Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de los valores de los parámetros enológicos evaluados en los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura empleada, la temperatura de fermentación y la presencia o ausencia de SO₂ en los mostos</i>	247
Tabla A6. <i>Niveles promedio de los ácidos grasos y alcoholes detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en presencia de SO₂</i>	248
Tabla A7. <i>Niveles promedio de los ácidos grasos y alcoholes detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en ausencia de SO₂</i>	249
Tabla A8. <i>Niveles promedio de los ácidos grasos y alcoholes detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en presencia de SO₂</i>	250
Tabla A9. <i>Niveles promedio de los ácidos grasos y alcoholes detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en ausencia de SO₂</i>	251

Tabla A10. Niveles promedio de los ésteres etílicos detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en presencia de SO ₂	252
Tabla A11. Niveles promedio de los ésteres etílicos detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en ausencia de SO ₂	253
Tabla A12. Niveles promedio de los ésteres etílicos detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en presencia de SO ₂	254
Tabla A13. Niveles promedio de los ésteres etílicos detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en ausencia de SO ₂	255
Tabla A14. Niveles promedio de los acetatos y lactonas detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en presencia de SO ₂	256
Tabla A15. Niveles promedio de los acetatos y lactonas detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en ausencia de SO ₂	257
Tabla A16. Niveles promedio de los acetatos y lactonas detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en presencia de SO ₂	258
Tabla A17. Niveles promedio de los acetatos y lactonas detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en ausencia de SO ₂	259
Tabla A18. Niveles promedio de compuestos carbonílicos y sulfurados detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en presencia de SO ₂	260
Tabla A19. Niveles promedio de compuestos carbonílicos y sulfurados detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en ausencia de SO ₂	261
Tabla A20. Niveles promedio de compuestos carbonílicos y sulfurados detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en presencia de SO ₂	262
Tabla A21. Niveles promedio de compuestos carbonílicos y sulfurados detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en ausencia de SO ₂	263
Tabla A22. Niveles promedio de los nor-isoprenoides y terpenoides detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en presencia de SO ₂	264
Tabla A23. Niveles promedio de los nor-isoprenoides y terpenoides detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en ausencia de SO ₂	265
Tabla A24. Niveles promedio de los nor-isoprenoides y terpenoides detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en presencia de SO ₂	266
Tabla A25. Niveles promedio de los nor-isoprenoides y terpenoides detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en ausencia de SO ₂	267
Tabla A26. Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de las concentraciones de los ácidos grasos, alcoholes y ésteres etílicos volátiles detectados en los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura empleada (L), la temperatura de fermentación (T) y la presencia o ausencia de SO ₂ en los mostos (S).....	268

Tabla A27. Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de las concentraciones de acetatos, lactonas, compuestos carbonílicos, compuestos sulfurados, nor-isoprenoides y terpenoides volátiles detectados en los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura, la temperatura de fermentación y la presencia o ausencia de SO ₂ en los mostos	269
Tabla A28. VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en presencia de SO ₂	270
Tabla A29. VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en ausencia de SO ₂	271
Tabla A30. VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 25 °C en presencia de SO ₂	272
Tabla A31. VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en presencia de SO ₂	273
Tabla A32. Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de los VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura, la temperatura de fermentación y la presencia o ausencia de SO ₂ en los mostos ..	274
Tabla A33. Contribución de las series aromáticas a las componentes seleccionadas para los Análisis de Componentes Principales (PCA) de los vinos fermentados a 18 y 25 °C	275
Tabla A34. Contribución de las series aromáticas a las componentes seleccionadas para los Análisis de Componentes Principales (PCA) de los vinos fermentados en presencia (75 mg/L) y ausencia (0 mg/L) de SO ₂	276
Tabla A35. Niveles promedio (mg/L) de los compuestos mayoritarios detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C con SO ₂ en los mostos	277
Tabla A36. Niveles promedio (mg/L) de los compuestos mayoritarios detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C sin SO ₂ en los mostos.....	278
Tabla A37. Niveles promedio (mg/L) de los compuestos mayoritarios detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C con 75 de SO ₂ en los mostos	279
Tabla A38. Niveles promedio (mg/L) de los compuestos mayoritarios detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C sin SO ₂ en los mostos.....	280
Tabla A39. Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de las concentraciones de los compuestos mayoritarios detectados en los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura empleada, la temperatura de fermentación y la presencia o ausencia de SO ₂ en los mostos.....	281
Tabla A40. Contribución de los compuestos mayoritarios a las componentes seleccionadas para los Análisis de Componentes Principales (PCA) de los vinos fermentados a 18 y 25 °C	282
Tabla A41. Contribución de los compuestos mayoritarios a las componentes seleccionadas para los Análisis de Componentes Principales (PCA) de los vinos fermentados en presencia (75 mg/L) y ausencia (0 mg/L) de SO ₂	283

ABREVIATURAS

<i>Siglas</i>	<i>Significado</i>
ADH	Alcohol-deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Carbono
Cas	CRISPR-Associated Protein
CCD	Carotenoides dioxigenasa
CE	Capillary Electrophoresis
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CGE	Capillary Gel Electrophoresis
CHAPS	[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CH ₃ CH ₂ OH	Etanol
CO ₂	Dióxido de carbono
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
C ₂ H ₄ O	Acetaldehído
C ₃ H ₄ O ₃	Ácido pirúvico
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucosa
D.O.P.	Denominación de Origen Protegida
DOXP	1-desoxi-D-xilosa-5-fosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESI	Electrospray Ionization
EtOH	Etanol
FID	Flame Ionization Detector
FT	Fourier Transform
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
Fase G (1, 2)	Fase Gap (1, 2)
GC	Gas Chromatography

<i>Siglas</i>	<i>Significado</i>
GO	Gene Ontology
H	Hidrógeno
HG	Homogeneous group
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H ₂ O	Agua
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
ICR	Ion Cyclotron Resonance
IEF	Isoelectric Focusing
INCAVI	Institut Català de la Vinya i el Vi
IPG	Immobilized pH Gradient
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
K ₂ O ₅ O ₂	Metabisulfito potásico
LC	Liquid Chromatography
LC	Lalvin Clos
LTQ	Linear Trap Quadrupole
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight
MIP	Manejo Integrado de Plagas
MS	Mass Spectrometry
MVA	Ácido mevalónico
NAD [±]	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidruro
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NMR-2D	Nuclear Magnetic Resonance – Two Dimensions
O	Oxígeno
OIV	Organización Internacional del Vino
OCH ₃	Grupo carbonilo
OH	Grupo hidroxilo
PCA	Principal Components Analysis
PDC	Piruvato-descarboxilasa
PDMS	Polidimetilsiloxano

<i>Siglas</i>	<i>Significado</i>
PI	Punto Isoeléctrico
PMFS	Fenilmetilsulfonilo
PX	Pedro Ximénez
R (1, 2)	Radical (1, 2)
rpm	Revoluciones por minuto
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SCAI	Servicio Central de Apoyo a la Investigación
sCoA	Coenzima A
SD	Standard Dilution
SGD	Saccharomyces Genome Database
SO ₂	Anhídrido sulfuroso (dióxido de azufre)
STSC	Scientific Time Sharing Corporation
TCA	Tricloroacetic acid
TD	Thermal Desorption
TE	Tampón de Extracción
TDU	Thermal Desorption Unit
TDN	Trimetil-dihidronaftaleno
TS	Tampón de Solubilización
T (0, 1, 2)	Tiempo de muestreo (0, 1, 2)
UCO	Universidad de Córdoba
UE	Unión Europea
UFC	Unidad Formadora de Colonias
VAO	Valor de Actividad Odorante
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose medium
2D-PAGE	Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

RESUMEN

A nivel global, la gran mayoría de sectores científicos coinciden en afirmar la existencia del cambio climático hoy en día; un cambio climático cuyo impacto en la viticultura conllevará notables efectos en la calidad de la uva y sus vinos. Como consecuencia, se producirá un desajuste entre la madurez tecnológica y fenólica, algo que provocará que los mostos y vinos lleguen a presentar con más frecuencia características cualitativas no deseables. Dichas características pueden ir desde un contenido elevado de azúcar en la uva y, consecuentemente, un elevado grado alcohólico de los vinos; hasta una disminución de la acidez, fundamentalmente del ácido málico, resultando de tales efectos vinos planos y frágiles.

Desde el punto de vista de la microbiología enológica, las variaciones asociadas al cambio climático previstas en las condiciones ambientales (temperatura, estrés hídrico, etc.) en la composición del sustrato, o incluso en la fisiología de la uva y en las técnicas de cultivo, incrementan la probabilidad de que se modifiquen la ecología, la biodiversidad y el metabolismo de los microorganismos presentes en la viña, la uva, el mosto y el vino.

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo realizar un estudio proteómico de cepas de levaduras silvestres con mejor aptitud enológica que puedan aportar nuevas características necesarias para la adaptación de la enología al cambio climático. Asimismo, se pretende la búsqueda de potenciales parámetros indicadores basados en el estudio de los exo-metabolitos de dichas levaduras relacionados con el volatiloma y con las características organolépticas del vino.

Se han aislado y seleccionado, por su potencial enológico en condiciones similares a las propiciadas por el cambio climático, diversas cepas silvestres del género de levadura *Saccharomyces*. Junto a ellas, se ha escogido una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* con conocida resistencia a dichas condiciones. Con estas levaduras se han llevado a cabo microvinificaciones en mosto blanco para evaluar, tanto en el proceso como en sus resultados, la influencia de factores de estrés como una alta temperatura de fermentación, una adición moderada de anhídrido sulfuroso y un elevado nivel de azúcar

en el mosto de partida. De igual modo, se determinó analizar la expresión proteica de las levaduras en diversos puntos de la fermentación, contemplando con mayor interés las proteínas asociadas a procesos biológicos de respuesta a estrés osmótico y oxidativo. Para llevar a cabo los análisis metabolómicos y proteómicos necesarios para el estudio se emplearon diversas herramientas ómicas de detección y cuantificación precisa, como la cromatografía de gases (GC), asociada a detector FID o combinada con la espectrometría de masas (SM); o la cromatografía de líquidos (LC) asociada con espectrometría de masas.

Los resultados revelaron que todas las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* evaluadas obtuvieron vinos con niveles adecuados de los parámetros enológicos más importantes, los cuales mostraron dependencia de la cepa utilizada. Algunos parámetros, como la acidez volátil, la acidez titulable y el nitrógeno fácilmente asimilable, reflejaron la influencia de la alta temperatura de fermentación con un incremento de sus niveles. El elevado contenido de azúcar inicial en el mosto influyó aumentando el grado alcohólico de los vinos, así como los valores de acidez volátil y de azúcares residuales. La presencia de SO₂, sin embargo, no influyó en ninguno de estos parámetros. Con respecto a las cepas de levaduras, se observaron desfases en el inicio de la fermentación de algunas cepas silvestres, B6 y B29, debidos al SO₂, sin que ello impidiese que estas cepas pudieran culminar el proceso fermentativo. La levadura comercial, LC, no mostró influencia de la temperatura o la adición de SO₂, pero los altos niveles de azúcar residual y el menor grado alcohólico observado en sus vinos en comparación con los de otras cepas fueron indicativo de fermentaciones incompletas.

Por otra parte, la composición volátil de los vinos mostró grandes diferencias debidas a las cepas de levaduras, viéndose afectados más del 90% de los compuestos determinados. La temperatura de fermentación influyó en las concentraciones del 75% de ellos, mientras que la concentración alta de azúcar inicial y la adición de SO₂, solo afectaron a un 30% de los compuestos. Aun así, la presencia de SO₂ resultó significativa en los niveles de varios compuestos mayoritarios (> 10 mg/L en vino), conllevando incrementos en los niveles de alcoholes superiores, polioles y compuestos carbonílicos.

En cuanto al perfil aromático de los vinos, los compuestos que presentaron mayores valores de actividad odorante fueron el acetato de isoamilo y el octanoato de etilo, ésteres

con descriptores aromáticos frutales, con valores 60 y 43 veces superiores a la unidad. Otros compuestos, como la β -damascenona o la β -ionona, descritos como aportadores de esencias florales y herbáceas, mostraron, respectivamente, valores de actividad odorante 38 y 21 veces superiores a su umbral de percepción. Todo ello propició que los vinos obtenidos se caracterizaran por un mayor contenido en compuestos relacionados con descriptores odorantes florales y frutales, y fueron las cepas LC, B29 y B6 las que presentaron mayores cantidades de dichos compuestos. Al realizar análisis de conglomerados y de componentes principales, se puso de manifiesto que los vinos obtenidos con las cepas B29 y LC fueron diferentes al resto, siendo las series aromáticas floral y la herbácea las responsables de dicha diferenciación. En el caso de la cepa B6 fue la serie frutal la que diferenció a los vinos producidos por esta, en comparación con los obtenidos por el resto de las cepas. Con todo ello, se comprobó la eficiencia fermentativa de ambas cepas de levadura en cuanto a la obtención de vinos con diferentes perfiles aromáticos, algo que, a nivel industrial, concede múltiples alternativas al enólogo para elaborar vinos con características organolépticas específicas.

El análisis del proteoma de las cepas de levaduras B6 y LC reveló que un 80.7% de las proteínas expresadas resultaron comunes a ambas levaduras, tanto en presencia como ausencia de SO₂. La levadura LC presentó, sin mostrar influencia del SO₂, la mayor intensidad de expresión de proteínas de respuesta a estrés osmótico y oxidativo a la mitad del proceso fermentativo (7% de etanol (v/v)), relacionándose este hecho con su incapacidad para terminar la fermentación en altas concentraciones de azúcar. Por otro lado, la cepa B6, mostró mayores intensidades en el inicio y a las 48 horas del proceso, observándose influencia del SO₂. Este hecho se corresponde con el retardo que esta cepa presentó para comenzar la fermentación, aunque posteriormente pudiera adaptarse.

La investigación realizada en este trabajo ha permitido asentar un punto de anclaje a la obtención de un pool de levaduras silvestres con las mejores aptitudes enológicas para ponerlo a disposición de la industria vitivinícola en un escenario de cambio climático. Estos hallazgos pueden contribuir a la detección, selección y empleo de levaduras silvestres que fermenten con solvencia en condiciones de estrés. Con ello, se presenta un método reproducible y sostenible para combatir los efectos climatológicos adversos a los que el sector vitivinícola se enfrenta a medio y corto plazo, sin perder, para ello, la identidad que caracteriza a sus productos.

ABSTRACT

Nowadays, most scientific sectors agree in affirming the existence of climate change, whose impact on viticulture will have notable effects on the quality of the grapes and wines. Consequently, there will be a mismatch between technological and phenolic maturity, which is likely to cause undesirable qualitative characteristics in musts and wines. These characteristics can range from a high sugar content in the grapes and, consequently, a high alcoholic level in the wines; to a decrease in acidity, mainly affecting malic acid levels, resulting in flat and fragile wines.

Regarding an oenological microbiology viewpoint, the variations associated with climate change expected in the environmental conditions (higher temperature, water stress, etc.) in the composition of the substrate, or even in the physiology of the grape and in cultivation techniques, increase the probability that the ecology, biodiversity, and metabolism of the microorganisms present in the vineyard, grapes, must and wine will be modified.

This Doctoral Thesis aims to carry out a proteomic study of wild yeast strains with good oenological aptitude that can provide new characteristics necessary for the adaptation of oenology to climate change. Likewise, the search for potential indicator parameters based on the study of the exo-metabolites of these yeasts related to the volatilome and the organoleptic characteristics of the wine is intended.

Several wild strains of the *Saccharomyces* yeast genus have been isolated and selected due to their oenological potential under conditions similar to those caused by climate change. Along with them, a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* with known resistance to these conditions has been chosen. Some microvinifications have been carried out in white must with these yeasts to evaluate, both in the process and in its results, the influence of stress factors such as a high fermentation temperature, a moderate addition of sulfur dioxide and a high level of sugar in the must. Furthermore, it was determined to analyze the protein expression of the yeasts at various checkpoints during the fermentation, focusing on the proteins associated with biological processes in

response to osmotic and oxidative stress. To develop the metabolomic and proteomic analyzes necessary for the study, some omics tools for detection and precise quantification were used, such as gas chromatography (GC), associated with a FID detector or combined with mass spectrometry (SM); or liquid chromatography (LC) associated with mass spectrometry.

The results revealed that all *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains evaluated obtained wines with adequate levels of the most important oenological parameters, which showed dependence on the strain used. Some parameters, such as volatile acidity, titratable acidity and yeast assimilable nitrogen, reflected the influence of the high fermentation temperature with an increase in their levels. The high initial sugar content in the must led to an increase in the alcoholic degree of the wines, as well as in the values of volatile acidity and residual sugars. The presence of SO₂, however, did not influence any of these parameters. Regarding the yeasts, delays due to SO₂ were observed in the beginning of fermentation of some wild strains, B6 and B29, without this preventing these strains from completing the fermentation. The commercial yeast, LC, showed no influence of temperature or the addition of SO₂, but the high levels of residual sugar and the lower alcoholic degree observed in its wines compared to those of other strains were indicative of incomplete fermentations.

On the other hand, the volatile composition of the wines showed great differences due to the yeast strains, with more than 90% of the determined compounds being affected. The fermentation temperature influenced the concentrations of 75% of them, while the high initial sugar concentration and the addition of SO₂ only affected 30% of the compounds. Nevertheless, the presence of SO₂ was significant in the levels of several major compounds (> 10 mg/L in wine), leading to increases in the levels of higher alcohols, polyols and carbonyl compounds.

Regarding the aromatic profile of the wines, the compounds that presented the highest values of odorant activity were isoamyl acetate and ethyl octanoate, which are esters with fruity aromatic descriptors. They showed, respectively, values 60 and 43 times higher than unity. Other compounds, such as β -damascenone or β -ionone, which are described as providing floral and herbaceous essences, showed, respectively, odorant activity values 38 and 21 times higher than their perception threshold. All of this led to

the wines obtained being characterized by a higher content of compounds related to floral and fruity odorant descriptors. LC, B29 and B6 were the strains that presented the highest amounts of these compounds. When performing cluster and principal component analysis, it was revealed that the wines obtained with the B29 and LC strains were different from the rest, with the floral and herbaceous aromatic series being responsible for that differentiation. In the case of the B6 strain, it was the fruity series that differentiated the wines produced by it, compared to those obtained by the rest of the strains. According to this, the fermentative efficiency of both yeast strains was verified in terms of obtaining wines with different aromatic profiles. From an industrial level viewpoint, it grants the winemaker multiple alternatives to produce wines with specific organoleptic characteristics.

The analysis of the proteome of the B6 and LC yeast strains revealed that 80.7% of the expressed proteins were common to both yeasts, both in the presence and absence of SO₂. The LC yeast showed no influence of SO₂ in its proteome fingerprint and presented the highest intensity of expression of proteins responding to osmotic and oxidative stress in the middle of the fermentation process (7% ethanol (v/v)). This fact was related to its inability to finish fermentation at high sugar concentrations. On the other hand, strain B6 showed higher intensities at the beginning of the process and 48 hours after starting the fermentation, with the influence of SO₂ being observed. This fact corresponds to the delay that this strain presented to begin fermentation, although it could later adapt.

The research carried out in this work has made it possible to establish a starting point for obtaining a pool of wild yeasts with the best oenological aptitudes to make it available to the wine industry in times of climate change. These findings may contribute to the detection, selection and use of wild yeasts that ferment reliably under stress conditions. With this, a reproducible and sustainable method is presented to combat the adverse climatological effects that the wine sector faces in the medium and short term, without losing, to do so, the identity that characterizes its products.

Sección I



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL VINO Y LA VID

1.1.1. Expansión histórica y geográfica de la vid: globalización de la enología

El vino constituye, desde la antigüedad y en todas sus variedades, una de las bebidas más estudiadas, elaboradas y comercializadas del mundo, y así como la sociedad evoluciona en busca de nuevos estímulos sensoriales, el vino sigue siendo continuo objeto de investigación, transformación y adaptación a los nuevos tiempos.

La definición técnica del vino lo describe como una bebida alcohólica elaborada y tratada a partir de la fermentación del jugo o mosto de uvas recién recolectadas de la vid, en un proceso completo conocido como vinificación (Buja, 2022; Harding, 2015). La elaboración de esta bebida puede ser considerada en su amplio espectro como una de las transformaciones biotecnológicas más antiguas y longevas de la historia de la humanidad, y la investigación de toda la variedad de productos vínicos y de sus potenciales aplicaciones abarca un inmenso territorio dentro del ámbito científico.

De este modo surge la enología, que etimológicamente procede del griego “oinos”, o “vino”; y “logos”, o “conocimiento”, y constituye una amplia ciencia cuya extensión agrupa numerosas áreas y subáreas de índole química, biológica, física, industrial y agroalimentaria, entre muchas otras. La enología puede definirse como la rama de la ciencia vinculada a la elaboración de vino, comprendiendo una serie de conocimientos y técnicas que permiten el estudio y el desarrollo de todo el proceso productivo, desde la recolección de las uvas hasta la conservación del producto final (Pérez-Porto & Gardey, 2018). Atenerse a dicha descripción proporciona una interesante visión sobre los orígenes de la enología, ligados irrefutablemente a las primeras muestras de elaboración de vino en el mundo.

Hasta donde hoy se conoce, la historia sitúa los primeros indicios de elaboración de esta bebida en el periodo del Neolítico, alrededor de ocho mil años antes de nuestros días. Las marcas fueron encontradas en una jarra de cerámica (Figura 1) hallada en unas

excavaciones realizadas en dos asentamientos neolíticos al sur de Tiflis (Georgia) por científicos de la Universidad de Toronto (Canadá) y del Museo Nacional de Georgia, en el año 2017.



Figura 1. Jarra neolítica del sitio de Khramis Didi Gora (Museo Nacional de Georgia). Fuente: *National Geographic*, (2017).

La sal de calcio del ácido tartárico, uno de los componentes más característicos y distintivos de la uva y el vino; y la presencia de tres ácidos orgánicos asociados: cítrico, málico y succínico; determinaron en estos fragmentos de cerámica las primeras evidencias químicas e históricas de la existencia de esta bebida (McGovern *et al.*, 2017). Si bien la investigación continúa abierta a nuevos posibles orígenes históricos y geográficos, dicho hallazgo posicionó el descubrimiento y el posterior desarrollo de la vinificación al sur de la cordillera del Cáucaso (Magris *et al.*, 2021).

La domesticación de la vid ancestral silvestre, la *Vitis vinífera* L. subsp. *sylvestris* C.C. Gmel., y el cultivo de las variedades que posteriormente surgirían de ella siguieron una tendencia de distribución geográfica y de asentamiento predominantes hacia el occidente y el sur, con un patrón de dispersión impulsado por la migración humana y el

comercio terrestre y marítimo. De este modo, partiendo de sus orígenes transcaucásicos, el cultivo de la uva domesticada se remonta a cuatro milenios en el Mediterráneo oriental, y a dos milenios en Europa occidental (Magris *et al.*, 2021). Con el tiempo, el cultivo de especies domésticas de la vid se acabaría viendo también representado en gran parte del área del Mediterráneo, exceptuando las zonas inframediterráneas y no mediterráneas más meridionales (Terral *et al.*, 2009), y en diversas zonas del sur de Asia y de Europa central (Grassi *et al.*, 2020; Zohary *et al.*, 2012; Soleas *et al.*, 1997).

Especialmente importante fue el comercio marítimo para la expansión de la vid en zonas más aisladas y alejadas del epicentro de la expansión terrestre de los cultivos. Sudamérica recibió de España los primeros injertos de vides hace más de 500 años, aunque no fue hasta aproximadamente 1800 cuando se empezó a cultivar variedades de vides asentadas al clima y a las condiciones vigentes, mejorándose la calidad del vino (Pastron, 2016). A mediados del siglo XVII, los viñedos llegaron a Sudáfrica procedentes de India (*Wines of South Africa – History*, s. f.), y entre 1788 y 1820 surgieron los primeros viñedos en Australia, a partir de vides introducidas desde Brasil (*The Wine Industry of Australia 1788-1979*, s. f.). No fue hasta hace unos 200 años cuando los misioneros franciscanos posibilitaron el asentamiento de la viticultura en Norteamérica, plantando los primeros viñedos a gran escala en California (Terral *et al.*, 2009). Todo este proceso de expansión favoreció la adaptación de la vid a diversas zonas geográficas y el surgimiento de nuevas y variadas especies cultivables.

Ya en la segunda mitad del siglo XIX, cuando el cultivo de la vid para uvas de mesa y para vinificación se había asentado y prosperaba a nivel global, una devastadora pandemia provocada por un pulgón perteneciente al orden de los hemípteros, *Phylloxera vitifoliae* F., hizo que Europa viese amenazada la presencia de la *V. vinífera* L. autóctona hasta casi su extinción (Terral *et al.*, 2009; Battey & Simmonds, 2005). Para solventar la catástrofe, fue necesario replantar los viñedos europeos con portainjertos nativos de Estados Unidos resistentes al parásito, como *Vitis rupestris* S., *Vitis riparia* M., o *Vitis berlandieri* P. (Terral *et al.*, 2009), y así, mediante el injerto de vides de uvas de vino europeas, pudo salvarse la *V. vinífera* (Buja, 2022; Soleas *et al.*, 1997).

Aquella pandemia, conocida como la “crisis de la filoxera”, no solo tuvo un gran impacto en las variedades de vid cultivadas, sino que sus efectos, sumados a la presión

antropogénica sobre los hábitats naturales de la vid silvestre, han determinado a lo largo del tiempo que la distribución actual de esta, la *V. vinífera* subsp. *sylvestris*, se encuentre altamente fragmentada en la actualidad. Aunque aún resisten micropoblaciones o metapoblaciones disjuntas, con pocos individuos, al menos en la parte occidental de la cuenca mediterránea, actualmente la especie de vid silvestre se considera amenazada de extinción (Magris *et al.*, 2021; Terral *et al.*, 2009). No obstante, hoy en día, existen unas sesenta especies de vides domésticas aceptadas, todas interfértiles y pertenecientes a la familia Vitaceae J.

1.1.2. Condiciones climáticas adecuadas para el cultivo de la vid

Desde sus comienzos, los viñedos dedicados al vino se han extendido por zonas muy variadas del mundo, pudiendo encontrarse actualmente en cerca de ocho millones de hectáreas distribuidas por numerosos países del centro y el sur de Europa, la zona norte de África, Asia, Norteamérica, Sudamérica y Oceanía (OIV, 2022; Magris *et al.*, 2021; Sancho-Galán *et al.*, 2021; Myles *et al.*, 2011; Terral *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2005) (Figura 2). Generalmente, las zonas de viñedos existentes en los territorios mencionados comparten características medioambientales de los climas mediterráneos, subtropicales y continentales templados (Terral *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2005).

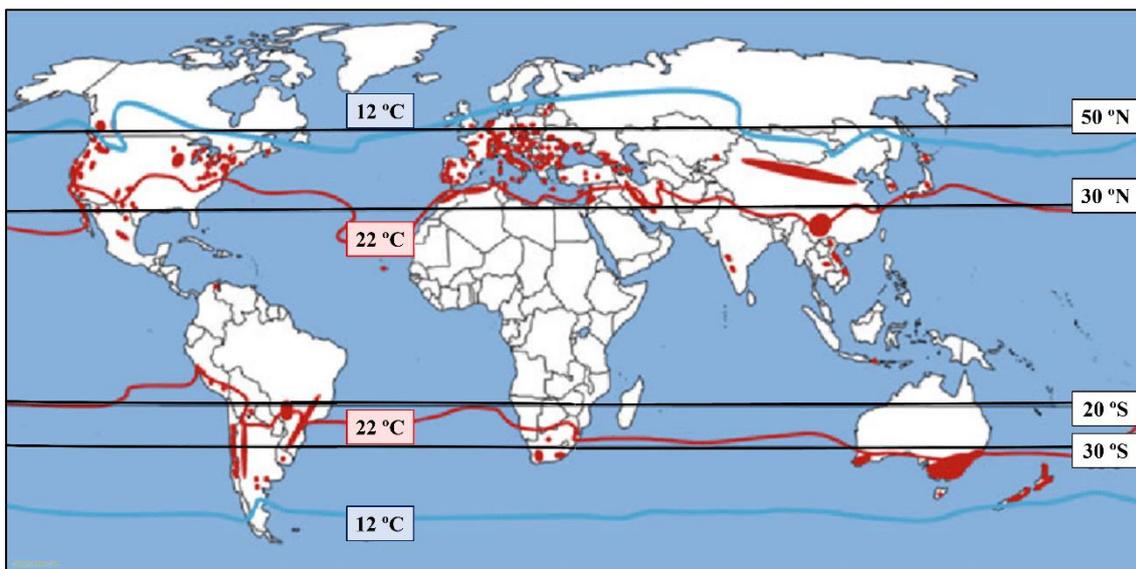


Figura 2. Distribución geográfica de las regiones productoras de vino a nivel mundial (en rojo), mostrándose las latitudes y temperaturas propias de las zonas templadas donde éstas se establecen. Fuente: Modificación propia a partir de Tiefenbacher & Townsend (2019).

Históricamente, las zonas con clima mediterráneo se caracterizan por la alternancia regular de periodos estacionales cálidos y secos con otros fríos y húmedos (Dalu *et al.*, 2012; Sotomayor & Ruíz, 2000), lo cual ha determinado condiciones ambientales óptimas para el asentamiento y el buen crecimiento de la vid cultivable, así como para la producción de vinos (Hannah *et al.*, 2013). De entre los muchos los factores climáticos que pueden influir en el desarrollo de los cultivos y la calidad del producto final destacan por su gran importancia la temperatura, la humedad, la luminosidad, y otros como el viento o la presión atmosférica, así como el terreno sobre el que se asientan las viñas, considerando tanto las características topográficas de la superficie como las cualidades fisiológicas del suelo (Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2021; *Climate, weather and vineyard management – eVineyard blog*, 2019). Todos estos factores, sumados a las técnicas de viticultura de la zona, se agrupan en un conjunto definido bajo el término “terroir” (terruño, en francés).

La temperatura y la humedad son, junto con la luz, los factores medioambientales que presentan un mayor impacto sobre la prosperidad de los cultivos de vid. Se considera que la amplitud térmica diaria a la que éstos se ven sometidos debe ser suficientemente amplia, y que la duración de las estaciones anuales cálidas y frías, así como su alternancia, debe ser más o menos constante (Sotomayor & Ruíz, 2000). Mientras que el calor y la humedad son cruciales durante el periodo floración y maduración, el frío y la lluvia son muy importantes en el periodo de inactividad (*Climate, weather and vineyard management – eVineyard blog*, 2019). Sin embargo, aunque cada especie de vid cultivable, dependiendo de su mayor o menor sensibilidad, crezca mejor en determinadas condiciones ambientales (*Climate change and wine overview – Thirty Fifty*, 2023), se consideran estrechos los intervalos térmicos que favorecen la maduración de uvas de vino de calidad. Generalmente, y si las demás condiciones son propicias, la uva suele madurar mejor entre los 25 y los 30 °C, aunque su crecimiento no está limitado a este rango térmico. Por una parte, si bien es cierto que la exposición durante un tiempo moderado a temperaturas superiores a 30 °C puede ser beneficioso durante la maduración del fruto, las temperaturas excesivamente elevadas pueden ocasionar muchos tipos de estrés en la planta, tanto internos como externos (Camps & Ramos, 2011). Por otra parte, aunque la división celular es eficiente a temperaturas que rondan los 20 °C (Claret *et al.*, 2020), el crecimiento de la vid se dificulta cuando éstas disminuyen por debajo de los 10 °C (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008), e incluso los brotes tiernos se ven afectados cuando

desciende de 0 °C. Las heladas tempranas en otoño y las tardías de primavera son igualmente perjudiciales durante ciertos estados del período vegetativo, afectando sobre todo a la floración y a la madurez del fruto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). En contrapunto, los inviernos fríos y lluviosos permiten asegurar la suficiente reserva de agua en el suelo y una temperatura fría moderada para que las yemas completen su desarrollo (Sotomayor & Ruíz, 2000), así como la alternancia con los veranos secos y cálidos favorece el aprovechamiento del agua del invierno, evitando excesos perjudiciales para la vid.

Otro de los factores involucrados en el crecimiento de la vid y la calidad de sus productos es el tipo de suelo sobre el cual se asientan los cultivos (Dalu *et al.*, 2012). La vid puede crecer en una amplia variedad de suelos, desde pedregosos y arenosos hasta arcillosos, y se puede asentar sin dificultad en terrenos de fertilidad elevada o reducida, siempre que el viento no provoque problemas de erosión. Son precisamente los suelos pobres los más demandados para establecer viñedos, ya que en suelos más fértiles y profundos la abundancia de recursos provoca un crecimiento excesivo que con frecuencia empobrece la calidad de la uva (Sotomayor & Ruíz, 2000).

1.1.3. El vino en España: zonas vitivinícolas del territorio español

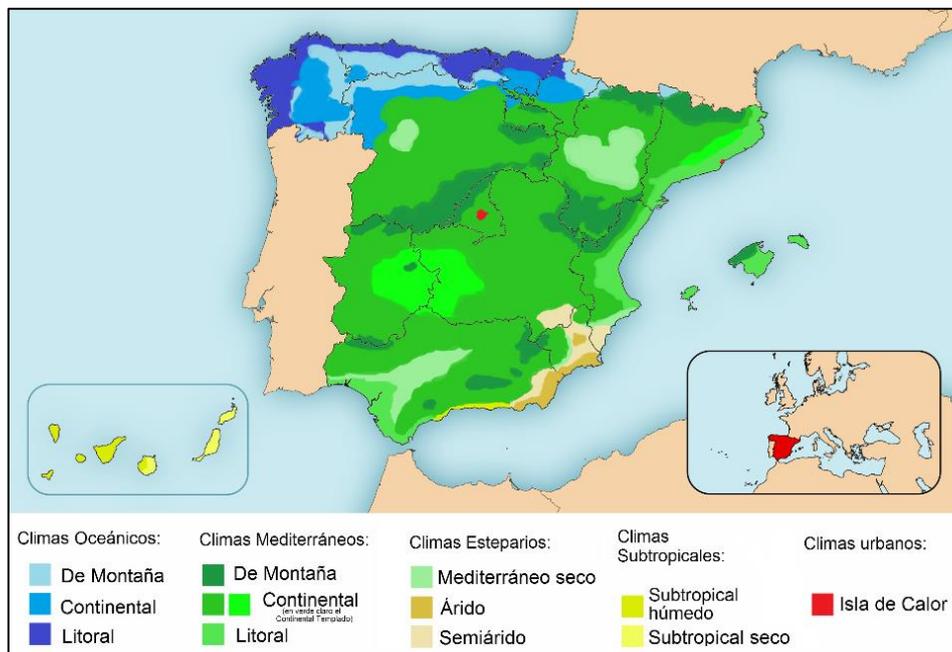


Figura 3. Diversidad climática en España. Fuente: *ClimaManía* (2023).

Debido a sus circunstancias medioambientales, como su situación geográfica en el planeta, su condición peninsular rodeada de mar y la heterogeneidad del relieve donde se asienta, España se encuentra en confluencia de diversos climas (Figura 3). Mientras en algunas zonas las temperaturas medias son suaves, de unos 15 °C, en otras se pueden alcanzar más de 40 durante el verano. De forma general, es posible distinguir cuatro tipos de climas generales en nuestro país (*ClimaMania*, 2023):

- Atlántico: Lluvioso y de temperaturas suaves por su cercanía al océano Atlántico, influye en el norte y noroeste peninsular, desde Pirineos hasta Galicia. Las temperaturas medias de invierno oscilan entre los 12 y los 15 °C, y en verano, entre los 20 y los 25 °C.
- Mediterráneo: Es el más representativo e influyente, pues abarca todo el litoral mediterráneo, el interior peninsular, las islas Baleares, Ceuta y Melilla. La lluvia es irregular y suele producirse en otoño y primavera. La temperatura media anual oscila entre los 15 y los 18 °C, los inviernos son cortos y suaves, y los veranos, largos y calurosos. En algunas zonas como la depresión del Ebro, la Meseta, la zona superior del valle del Guadalquivir, las temperaturas pueden llegar a ser extremas, entre los -13 y los 25 °C, con inviernos largos y fríos, y veranos muy calurosos con precipitaciones muy poco frecuentes durante el año. En la zona sureste de España (Murcia, Alicante y Almería), las lluvias son prácticamente nulas, por lo que los suelos son bastante áridos y desérticos, con calor intenso estival.
- Subtropical: Es típico de las Islas Canarias, con presencia de vientos alisios y corrientes de agua fría. Presenta una temperatura cálida y estable todo el año, con un reducido intervalo térmico medio de entre 22 y 28 °C.
- De montaña: Los picos montañosos del país, como la cordillera Cantábrica, el Sistema Central, el Sistema Ibérico, la cordillera Penibética y los Pirineos, presentan inviernos muy fríos y veranos frescos, con precipitaciones abundantes y nevadas.

La importancia de la vid y el vino en nuestro país viene abalada por las estadísticas de los datos recogidos por la OIV, en los que España se encuentra a la cabeza del mundo en cuanto a superficie dedicada al cultivo de la vid, representando un 13% del total de los viñedos del planeta. Una evidencia mayor se manifiesta al ser el tercer país con mayor producción de vino a nivel global, por detrás de Italia y Francia y sumando un 50.7% los tres en conjunto (Sancho-Galán *et al.*, 2021); y al ostentar la séptima posición mundial en cuanto al consumo de productos vnicos (OIV, 2022). En 2022, España cedió el liderazgo a Italia en cuanto a volumen de vino exportado al resto del mundo, pero ambos mantienen una notable diferencia por encima de Francia, que ocupa la tercera posición (OIV, 2022). No solamente puede medirse la gran dedicación que nuestro país profesa a la industria del vino por los datos cuantitativos, sino también por la alta calidad de los productos vnicos elaborados en sus zonas vitivinícolas, contándose hasta 138 Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.) (*Map of Spain wine regions - Wine folly, s. f.*). (Figura 4). El tipo de clima vigente en ellas, su situación geográfica y las condiciones del terreno donde se asientan los cultivos, son solo algunos de los factores propiciadores de la enorme diversidad de vinos de origen español.



Figura 4. Denominaciones de Origen de vinos de España. Fuente: Modificación propia a partir de *Wine Folly* (2016).

Las D.O.P. españolas se distribuyen generalmente a lo largo de siete regiones de vinos, clasificadas según las características climáticas de cada región:

- Noroeste “verde” español: Un clima considerablemente distinto al del resto del territorio nacional es responsable de gran parte de la identidad de los productos vínicos elaborados en la mitad sur de Galicia y oeste de León. Destacan las D.O.P. Rías Baixas, cercanas al Atlántico; Ribeiro, Ribera Sacra y Bierzo, a lo largo de los ríos Miño y Sil; y Monterrei, en las lindes de la provincia de Orense con Portugal. Las variedades de uva más cultivadas y determinantes en la identidad de los vinos de la zona son Albariño y Godello para vinos blancos; y Mencía para vino tinto.

- Valles de los ríos Ebro y Duero: Localizadas en diversos puntos de Castilla y León, Navarra, La Rioja, Euskadi y Aragón, algunas de las D.O.P. de vinos más conocidas de nuestro país se asientan junto a los valles de estos dos grandes ríos y sus afluentes. En estas zonas del norte de España se producen las influencias opuestas del clima atlántico y del clima mediterráneo, algo determinante en la identidad y las cualidades sensoriales de sus vinos. En las regiones agrupadas en el valle del Duero, con una proporción mayor de influencia del clima atlántico, D.O.P. como Ribera de Duero, Toro y Rueda destacan notablemente por la calidad de sus productos vínicos, surgidos de variedades de uva como la original Verdejo o Malvasía, para vinos blancos; y Tinta de Toro, Prieto Picudo, Mencía o Garnacha, para vinos tintos. Por otra parte, las regiones asociadas al valle del Ebro presentan una mayor influencia proporcional del clima mediterráneo, con variaciones más suaves, y esto propicia que D.O.P. como Rioja y Cariñena, además de Verdejo, Garnacha y Malvasía, produzcan variedades de vinos tan especiales como el Tempranillo y el Macabeo.

- Costa Norte Mediterránea: Cataluña es una de las zonas del mundo que presentan mayor influencia el clima mediterráneo. La existencia de pequeños microclimas únicos desde el litoral hasta la zona montañosa interior da lugar a variedades de uvas autóctonas con las que se produce desde el espumoso cava hasta los vinos tintos Priorat, Cariñena o Garnacha, entre otros tintos y blancos. Algunas D.O.P. destacadas de esta área son Cava, Montsant, Priorat, Penedès y Costers del Segre.

- **Costa Sur Mediterránea:** Desde Valencia hasta Murcia se extiende una importante zona de viñedos donde se elaboran importantes vinos tintos frutales como Monastrell o Bobal. Las D.O.P. más importantes de esta zona son Utiel-Requena, Jumilla, Yecla y Bullas.
- **Meseta Central:** Abarca un territorio extenso y elevado de la península en el cual predomina un clima más soleado y seco, donde las condiciones áridas determinan que los cultivos de vid se encuentren muy espaciados entre sí y crezcan cerca del suelo. Vinos blancos de la variedad Airén son típicos de estas zonas, pero también son muy interesantes Garnacha y Petit Verdot, entre otros. Valdepeñas, Métrida, Uclés, Ribera del Guadiana y Vinos de Madrid son ejemplos de las D.O.P. de vinos distribuidas por esta gran área.
- **Andalucía:** En esta región con influencias climáticas del Atlántico y del Mediterráneo, el vino más conocido es el Jerez, destacando vinos secos como la manzanilla y el amontillado. También se producen en Andalucía vinos muy dulces como los “PX”, elaborados con uvas Pedro Ximénez por la D.O.P. Montilla-Moriles. Sierras de Málaga, por su parte, produce vinos secos como los Moscatel de Alejandría.
- **Islas Baleares y Canarias:** La diferencia geográfica y climática de ambos archipiélagos determina una amplia variedad de vinos, desde blancos y dulces a partir de uvas Moscatel hasta tintos producidos con uvas Listán Negro. Los suelos volcánicos confieren a los vinos canarios esencias rústicas y arenosas.

1.1.4. Maduración de la uva del vino

La gran variedad de vinos producidos en nuestro país constituye, además de un atractivo turístico altamente considerado a nivel internacional, un enorme recurso para la industria y el comercio agroalimentarios. Por este motivo, las regiones vitivinícolas desarrollan y potencian la autenticidad de sus productos vnicos, ya que uno de los mayores atractivos de la industria vitivinícola lo constituye la certeza de que no hay dos vinos iguales. Previamente se mencionaron los factores medioambientales que, además de la variedad de uva cultivada, pueden influir en el crecimiento de la vid y en las

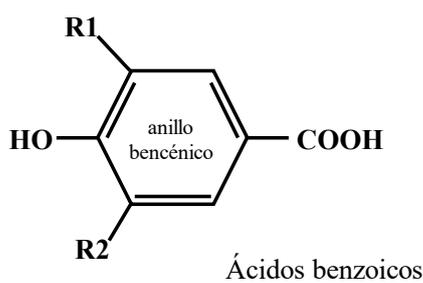
características del producto final, como son el clima y el terreno donde se asientan los cultivos. Otro de los factores que desempeñan un papel crucial en las cualidades organolépticas o sensoriales del vino son las técnicas llevadas a cabo para producirlo, es decir, el proceso de vinificación (*Climate change and wine overview – Thirty Fifty*, 2023; Dalu *et al.*, 2012).

La búsqueda de la maduración óptima de la uva antes de la obtención del mosto es muy importante, puesto que este estado de maduración condiciona en gran medida el balance de azúcares y ácidos de la baya (Sgubin *et al.*, 2022; Van Leeuwen *et al.*, 2019), y con ello, la calidad del producto final (Van Leeuwen, 2022). Los factores medioambientales tratados hasta ahora condicionan también el proceso madurativo de la uva, así como la naturaleza del suelo, la edad de la vid y la cepa cultivada, las técnicas de cultivo y el tratamiento de la planta durante la maduración, y los posibles efectos de enfermedades de origen biológico y no biológico.

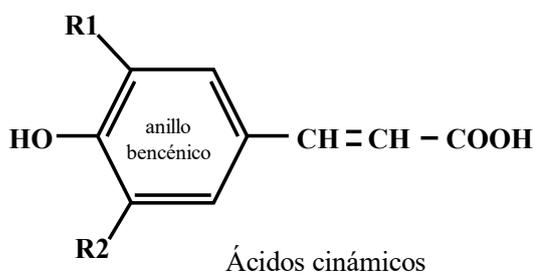
Puede afirmarse que la uva, más que constituir un simple órgano de acumulación, mantiene durante toda la maduración una elevada actividad respiratoria y un gran número de transformaciones bioquímicas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). Al inicio de la maduración, comienza a acumularse en la uva una elevada cantidad de solutos, generalmente azúcares sintetizados en las hojas. Las paredes de las células de la pulpa se multiplican y sufren cambios en su composición, lo que propicia el aumento de tamaño y el ablandamiento de la baya. Por dentro, ésta también comienza a hincharse a la vez que las células internas, ya que el agua comienza a penetrar por transpiración junto a los azúcares, las sustancias minerales y algunos compuestos nitrogenados. Sin embargo, la progresiva degeneración de estomas hace que la cantidad de agua disminuya y los azúcares deban seguir penetrando en contra de gradiente de difusión. Esto conlleva un mayor gasto energético, para lo cual el valor del cociente respiratorio aumenta hasta el 1.5 al final de la maduración, siendo esencialmente ácidos orgánicos los que constituyen los sustratos respiratorios (Sweetman *et al.*, 2014). Entre ellos se encuentran los ácidos tartárico y málico que, habiendo sido sintetizados en las hojas y en las uvas, en conjunto suman un 90% de la cantidad total de ácidos acumulados dentro de la baya en todo el proceso (Sweetman *et al.*, 2014; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008).

El ácido tartárico es un producto secundario del metabolismo de los azúcares, mientras que el ácido ascórbico constituye el intermediario principal en la biogénesis de tartárico. Por otro lado, el ácido málico es considerado un intermediario activo del metabolismo de la uva, y se acumula en gran cantidad durante la maduración, debido a que los azúcares importados son en todo caso precursores de este compuesto. Cuando el mosto está maduro, se observa una disminución en el acúmulo de ácido málico a la vez que el cociente respiratorio se incrementa, lo cual indica que este ácido es empleado para la obtención de energía en la uva (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). Tanto el ácido málico como el ácido tartárico son obtenidos a partir de los azúcares con el objetivo de regular la importación de cationes y el consumo de protones durante el metabolismo respiratorio.

Otro proceso característico de la maduración es, en el caso de las uvas tintas, la acumulación de pigmentos fenólicos, que derivan del catabolismo de azúcares como productos secundarios, dando lugar al envero. Algunos de estos pigmentos provienen de un solo ciclo bencénico y tienen su origen en la eritrosa-4-fosfato, intermediaria de la vía de las pentosas fosfatos. Esta vía de biosíntesis, conocida como vía del ácido shikímico (*Shikímico, Ruta biogénica del ácido - Unidad de Informática del Instituto de Química., s. f.*) determina la obtención de compuestos no flavonoides, los ácidos benzoicos y cinámicos (Figura 5), y de aminoácidos aromáticos.



Principales ácidos benzoicos	R1	R2
A. p-hidroxibenzoico	H	H
A. gálico	OH	OH
A. siríngico	OCH ₃	OCH ₃
A. vainílico	H	OCH ₃



Principales ácidos cinámicos	R1	R2
A. p-cumárico	H	H
A. cafeico	OH	H
A. ferúlico	OCH ₃	H

Figura 5. Estructura general de los ácidos benzoicos y cinámicos y principales representantes de cada grupo. R1: Radical 1; R2: Radical 2. Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, los flavonoides (Figura 6) son resultado de otro ciclo bencénico surgido tras la condensación de tres moléculas de acetil-coenzima A derivadas del ciclo de Krebs. Estos compuestos son variados gracias a diversas transformaciones posteriores, entre ellas, esterificación, glicosidificación, hidroxilación, metoxilación, y otras polimerizaciones. De este modo surgen los taninos, los flavonoles, las catequinas y las antocianidinas.

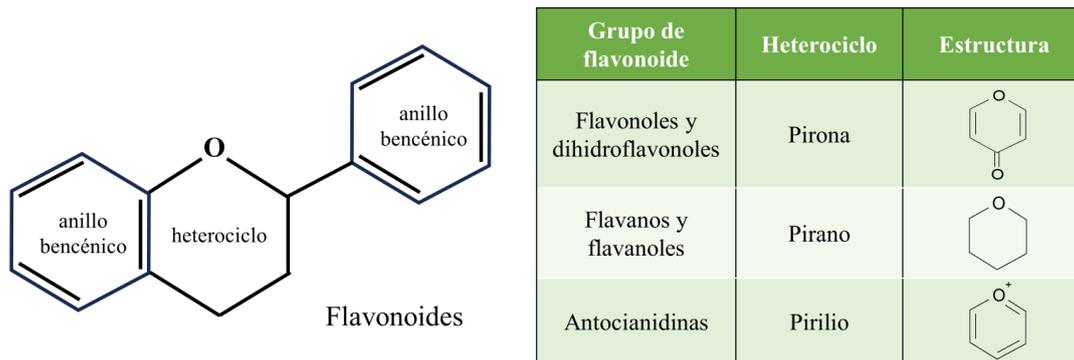


Figura 6. Estructura general de los flavonoides y principales grupos agrupados por las características estructurales del heterociclo. Fuente: Elaboración propia.

También tienen lugar en la uva el origen y la evolución de numerosas sustancias aromáticas que contribuyen a las características sensoriales de los vinos, las cuales se describen más adelante (Sección I. Apartado 1.4.2.).

Generalmente, aunque la maduración óptima no es un estado fisiológico concreto, sino que varía en función de numerosos parámetros, se considera que la uva ha madurado cuando el contenido en azúcares es suficientemente alto y la acidez ha disminuido notablemente. Sin embargo, los periodos en los que tienen lugar los procesos involucrados en la madurez de la uva deben ser considerados según el objetivo final a abordar. Los vinos blancos secos, por ejemplo, requieren para su óptima elaboración que la vendimia se produzca en un momento donde las sustancias aromáticas sean máximas y que aún se dé suficiente acidez, y de este modo, puedan acumularse y refinarse los aromas. Sin embargo, los vinos tintos de calidad requieren una maduración más duradera de la uva, para una mayor facilidad de extracción de los compuestos fenólicos. Esta sobremaduración tiene por objetivo aumentar la concentración de azúcar en la baya y, en

contraposición, permitir una mayor degradación bioquímica de los ácidos málico y tartárico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008).

1.1.5. Aspectos generales de la vinificación

El proceso de vinificación sigue una serie de procedimientos generales para todos los tipos de vinos, aunque cada tipo se elabore de forma diferente (Liti, 2015; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008) (Figura 7).



Figura 7. Resumen esquematizado del proceso general de vinificación. Fuente: Modificación propia a partir de *Catadelvino.com* (s. f).

En el momento en el que se considera ya adecuada la maduración de la uva en concordancia con el tipo de vino a elaborar, se lleva a cabo la vendimia y el transporte rápido de las uvas cosechadas a la bodega. A continuación, se procede al despalillado y el aplastado regulado de las uvas recolectadas para liberar la pulpa y el jugo. El prensado se produce en diferentes etapas y aplicando distintas presiones según el producto vínico final deseado, hasta que finalmente se obtiene el mosto. Este mosto sigue un proceso de maceración en el caso de las uvas tintas, con tiempo y método variables según el proceder de la bodega.

A modo preventivo, se ha generalizado en todo el mundo el uso del anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre (SO_2) en vinificación. Este compuesto se encuentra presente en los vinos de forma natural en dosis reducidas, pero también de forma añadida en el mosto, generalmente como metabisulfito potásico ($\text{K}_2\text{O}_5\text{O}_2$), el cual genera SO_2 en disolución (Liti, 2015). El SO_2 y sus derivados aniónicos desempeñan una doble función conservadora y protectora en el vino: antimicrobiana, puesto que impide el crecimiento de microorganismos no deseados que, afortunadamente, no son capaces de tolerar ciertas concentraciones de sulfitos que otros microorganismos implicados en vinificación sí pueden; y antioxidante, previniendo las reacciones de oxidación y la formación de radicales libres nocivos para el producto (Lage *et al.*, 2019). A bajos niveles no suponen riesgo para la salud, pero su utilización está regulada y no debe sobrepasar los niveles salubres o que interfieran en la calidad organoléptica del vino (Abramovic *et al.*, 2015). La Unión Europea marca, mediante el Reglamento Delegado 2019/934 de la Comisión, los contenidos máximos de SO_2 permitidos en diversos tipos de vinos (Tabla 2).

Tabla 1. Contenidos máximos de SO₂ total (mg/L) permitidos en la UE en los vinos. Fuente: Elaboración propia a partir de *Webmaster* (2023).

Tipo de vino	Azúcar residual	Contenido máximo (mg/L SO ₂)	Ejemplos específicos
Tintos	< 5 g/L glucosa + fructosa	150	
Blancos y rosados	< 5 g/L glucosa + fructosa	200	
Tintos	> 5 g/L glucosa + fructosa	200	
Blancos y rosados	> 5 g/L glucosa + fructosa	250	
Específicos		300	Spätlese, blancos de Bordeaux, blancos de Navarra, Penedès, Alella, Tarragona, Valencia, algunos vinos dulces de Grecia, Chipre, Francia, entre otros
Específicos		350	Auslese, algunos vinos de Rumanía, Chequia, Eslovaquia, Hungría, entre otros.
Específicos		400	Beerenauslese, Eiswein, algunos vinos dulces de Francia, Grecia, Chequia, Eslovaquia, Hungría, entre otros.
De licor		150	
De licor		200	
Espumosos de calidad		185	
Resto de espumosos		235	

Seguidamente, tras encubar el mosto, se seleccionan las levaduras que llevarán a cabo el proceso de fermentación alcohólica, mediante el cual dicho mosto se transforma en vino (Sección I. Apartado 1.2.1.), así como de las levaduras encargadas de ello. Estas levaduras, una vez seleccionadas bajo los criterios establecidos por la bodega, se añaden al mosto para comenzar la fermentación. En algunos casos, bajo ciertas circunstancias como, por ejemplo, si las condiciones climáticas no han sido del todo propicias, puede

ser necesario corregir el mosto de diversas formas previamente al proceso fermentativo, controlando parámetros como el pH y regulando la acidez. De igual modo, se debe controlar la actividad enzimática procedente de la uva y aún activa para evitar la iniciación de reacciones fermentativas espontáneas en los casos de falta de oxígeno (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008).

Cuando ya se encuentra preparado el mosto y seleccionadas las levaduras, se procede a realizar la fermentación de forma regulada, cuya duración puede ser variable dependiendo de las condiciones ambientales aplicadas y la naturaleza y el estado fisiológico de la levadura, aunque se recomienda una temperatura de entre 15 y 20 °C (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). Durante el proceso se realiza un remontado en el tanque, extrayéndose mosto desde la zona inferior hasta la superior, para homogeneizar la mezcla y airear el medio. El alcance de un determinado nivel de etanol en vino en base a la concentración inicial de azúcares determina el final de la fermentación ya que, en las condiciones adecuadas, debe obtenerse una concentración de etanol acorde con el azúcar inicial en mosto y haberse metabolizado la mayor parte de este contenido.

Una vez termina el proceso en el que el mosto inicial se ha convertido en vino se procede al descube, en el cual se vacía el tanque, se traslada el contenido a otro recipiente y se prensan los hollejos. Normalmente en el caso de los vinos tintos se permite una posterior fermentación maloláctica, la cual es llevada a cabo por bacterias lácticas presentes en el vino o posteriormente añadidas en inóculos. El fundamento de este proceder es el de corregir la acidez producida, transformándose el ácido málico, que confiere un sabor herbáceo al vino, en ácido láctico, que otorga un aroma y un sabor más agradables.

1.2. MICROBIOLOGÍA DEL VINO

1.2.1. Fermentación alcohólica

El origen etimológico de la palabra “fermentación” se encuentra en la palabra hebrea “fervere”, que significa “hervir” (Moreno & Peinado, 2012; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). Esta técnica ancestral no pasó de ser un mero arte práctico a una ciencia

aplicada hasta finales del siglo XIX, con la ciencia de Louis Pasteur. Fue gracias a él que, entre sus innumerables aportaciones a la ciencia, se demostrase la ilegitimidad de la teoría de la generación espontánea y la realidad de los procesos microbiológicos que podían acontecer en condiciones anaeróbicas (Liti, 2015). Es así como se pudo llegar a definir la fermentación como la oxidación biocatalizada de compuestos orgánicos cuyo aceptor de electrones es un compuesto endógeno generado durante el proceso, lo cual la diferencia de la respiración, en la que el aceptor final de electrones siempre es externo, ya sea esta aerobia o anaerobia, y se da la sucesión de reacciones químicas de la cadena de transporte electrónico (Moreno & Peinado, 2012).

Mediante la fermentación alcohólica, los azúcares iniciales del mosto, como la glucosa ($C_6H_{12}O_6$), son degradados por el metabolismo de las levaduras y algunas especies de bacterias, obteniéndose etanol (CH_3CH_2OH) y CO_2 , además de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) a partir de adenosín difosfato (ADP), la cual aprovechan los microorganismos. El ácido fosfórico (H_3PO_4) y algunos de sus derivados fosfatos también pueden desempeñar un papel catalizador o intermediario de la degradación de azúcares (Nilsson *et al.*, 1995). Como anteriormente se mencionó, la fermentación únicamente puede ocurrir como método alternativo a la respiración para la obtención de energía en condiciones de falta de oxígeno, por lo que solamente los tipos microorganismos mencionados son capaces llevarla a cabo en mayor o menor medida.

Profundizando un poco más, una de las diferencias que se dan a nivel químico durante los procesos de respiración y fermentación alcohólica es la oxidación del ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$) surgido tras la glucólisis. Durante la respiración, este es oxidado en el ciclo de Krebs obteniéndose tres moléculas de CO_2 y dos de agua (H_2O) por cada molécula de ácido pirúvico. Como previamente se indicó, en este proceso, el oxígeno es el último aceptor de protones tras la reoxidación de coenzimas NADH a NAD^+ en la mitocondria, pero en las condiciones anaerobias en las que sucede la fermentación alcohólica, el ácido pirúvico es el último aceptor, por lo que no se oxida, sino que se reduce a etanol una vez ha sido descarboxilado a acetaldehído (C_2H_4O) (Figura 8).

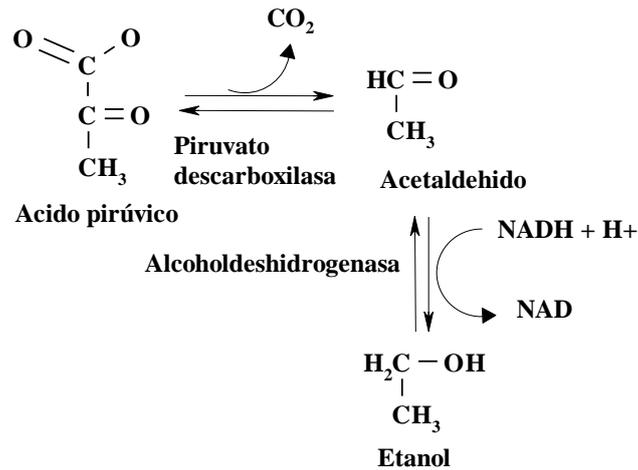


Figura 8. Formación de etanol a partir de ácido pirúvico durante la fermentación alcohólica. Fuente: Moreno & Peinado, 2012.

El conjunto de todas las reacciones químicas comprendidas dentro de este proceso se traduce en la siguiente ecuación estequiométrica general:



En Enología se considera como regla empírica que 17 gramos de azúcar producen 1 grado alcohólico (% (v/v)), el cual equivale aproximadamente a 7,9 gramos de etanol por litro (Moreno & Peinado, 2012).

1.2.2. Microorganismos involucrados en el proceso de fermentación

Además de los factores medioambientales previamente mencionados, la variedad de la uva cultivada y las técnicas de vinificación llevadas a cabo, existe un factor sumamente imprescindible en el proceso de vinificación y que imprime un gran sello en características organolépticas del vino resultante: los microorganismos encargados de llevar a cabo el proceso (Dalu *et al.*, 2012).

Todo un ecosistema microscópico y de enorme influencia en la vinificación prolifera asociado a la vid, al mosto, a la bodega y al vino. Su heterogeneidad, aunque generalmente es alta (König *et al.*, 2017), puede ser variable con dependencia de diversos factores, entre ellos, la variedad de uva, agentes climáticos como la lluvia o la

temperatura, las características del terreno, su irrigación, la fertilización y las prácticas vitivinícolas aplicadas (Petruzzi *et al.*, 2017). Numerosas especies de levaduras, bacterias de los ácidos láctico y acético, y algunas variedades de hongos filamentosos comparten nicho ecológico y su presencia puede determinar no solo diferencias sensoriales entre un vino y otro, sino también condicionar enormemente su calidad organoléptica (Tofalo, 2020; Belda *et al.*, 2017; Köning *et al.*, 2017). Por su importancia en el presente trabajo y en el proceso general de vinificación, se describen con más detalle ciertos aspectos de las levaduras presentes en la vid y el vino.

Se ha descubierto que un gran número de géneros y especies de levaduras se encuentran asociadas sobre todo a la uva en proceso de maduración y al vino, aunque su presencia y heterogeneidad varían según la zona y la especie de vid (Liti, 2015; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). Las del género *Hanseniaspora* Z.-K., por ejemplo, suelen representar el 50-75% de las levaduras presentes en la superficie del fruto, junto a otros géneros como *Candida* B., *Kluyveromyces* V., *Pichia* H. o *Torulaspota* L..

Sin embargo, aunque al principio no resultan proporcionalmente tan abundantes en la uva (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008), de todos los tipos de microorganismos asociados a la vid y al vino, se considera que las levaduras del género *Saccharomyces* M. son las más involucradas en el proceso de vinificación. Este hecho se debe a su generalmente elevada capacidad para realizar su metabolismo en medios con alto contenido en azúcar y reducida concentración de compuestos nitrogenados y otros nutrientes, así como a su gran adaptabilidad a un medio con pH bajo, alto contenido en etanol y su gran capacidad fermentativa (Parapouli *et al.*, 2020). Todo ello favorece la importancia de diversas especies de este género en la vinificación con respecto a la de otras especies de géneros diferentes a *Saccharomyces* que, salvo excepciones, no suelen presentar una naturaleza tan capacitada para tolerar los tipos de estrés mencionados, sobre todo cuando la concentración de etanol en el medio comienza a alcanzar el 4-5% (v/v) (Ciani *et al.*, 2016). En algunos estudios, sin embargo, se afirma que la presencia y el metabolismo de muchos géneros no-*Saccharomyces*, entre ellos *Brettanomyces* C., *Cryptococcus* V., *Metschnikowia* K., *Rhodotorula* H. (Querol & Fleet, 2006) y los anteriormente mencionados en algún momento del proceso fermentativo también contribuye de forma notable a la calidad del producto final (Benito *et al.*, 2019).

No todos los géneros de levaduras son capaces de seguir metabolizando azúcares ni, por tanto, sobrevivir durante todo el proceso fermentativo completo, sino que la abundancia de individuos de cada especie puede variar conforme van cambiando las condiciones ambientales y nutritivas del medio. Algunas especies como *Hanseniaspora uvarum* N. o *Metschnikowia pulcherrima* K. son comúnmente iniciadoras de la fermentación, junto a otras especies de géneros como *Candida*, *Debaromyces* L.-K., *Pichia*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, y *Rhodotorula*, todas ellas caracterizadas por su reducida capacidad alcohológena (Pretorius, 2000; Fleet & Heard 1993). Por este motivo, estas levaduras alcanzan su crecimiento máximo durante los primeros días de fermentación, el cual ronda las 10^6 - 10^7 Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) por mililitro, y en los días posteriores, las condiciones del medio se vuelven poco favorables para dichas levaduras y comienzan a sufrir un declive sin retorno (Egli *et al.*, 1998; Fleet *et al.*, 1984). Esto conlleva que las siguientes etapas de la fermentación sean llevadas a cabo por levaduras con una mayor tolerancia a dichas condiciones y una alta capacidad fermentativa, destacando entre ellas a géneros como *Torulaspora*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* B. (Jolly *et al.*, 2006; Beltran *et al.*, 2002).

Al continuar incrementándose las concentraciones de etanol y disminuyendo el pH y la cantidad de nutrientes, algunos de estos géneros comienzan a ver ralentizado su crecimiento y progresivamente se produce la muerte celular (Combina *et al.*, 2005; Granchi *et al.*, 1998). Finalmente, la fermentación llega a su fin mayoritariamente por especies del género *Saccharomyces*, por lo que se considera que el metabolismo de especies de este género, como *Saccharomyces cerevisiae* M.-H., entre otras, es el que más contribuye a la producción de etanol en el medio y que es, por tanto, la más capacitada para realizar buenas fermentaciones alcohólicas de vino (Török *et al.*, 1996). Aunque su crecimiento también se ve mermado conforme avanza la conversión del mosto en vino, las poblaciones de *S. cerevisiae* son capaces de mantenerse más o menos presentes a concentraciones altas de etanol en detrimento de otros microorganismos. No es hasta que transcurren algunas semanas desde el fin de la fermentación alcohólica cuando, debido a la falta de azúcares y nutrientes y a las condiciones de estrés en el medio, las poblaciones viables decrecen rápidamente hasta su práctica extinción (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008).

Hay, sin embargo, algunas especies de géneros como *Candida* o *Pichia*, además de algunas cepas de *S. cerevisiae*, que pueden formar agregados en la superficie del vino debido a la utilización de su metabolismo respiratorio, conocidos como velo de flor (Moreno-García *et al.*, 2014). También existen otras especies, como algunas del género *Brettanomyces*, que, por su capacidad de crecer en anaerobiosis, pueden aprovecharse de restos de azúcares no terminados de metabolizar y proliferar contaminando el vino, afectando negativamente a sus cualidades organolépticas y ocasionando en numerosas ocasiones problemas de turbidez, olor y sabor desagradables (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008).

1.2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Esta especie de levadura u hongo unicelular, perteneciente al filo Ascomycota C. dentro del reino Fungi B.-E.-J.-J., es considerado un organismo modelo para multitud de ámbitos en el campo de la Biología. En 1996 se obtuvo la completa secuenciación de su genoma, compuesto por 6.275 genes (5.800 funcionales) agrupados en 16 cromosomas lineales en el caso de cepas haploides (S288c) (Goffeau *et al.*, 1996). Estructuralmente, la levadura posee dos envolturas nucleares, la pared y la membrana plasmática (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). Una gruesa pared celular de entre 100 y 200 nanómetros (nm) de espesor conlleva la protección de la integridad fisiológica y osmótica de la célula, gracias a la posibilidad de modificar su morfología y de controlar su propia permeabilidad según las condiciones extra e intracelulares (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). La pared también posee función de reconocimiento molecular, lo cual permite la interacción entre células con diversos propósitos como la unión sexual, la floculación, o la actuación de toxinas killer (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). Estructuralmente está constituida casi exclusivamente por β -glucanos, que conforman aproximadamente un 55-65% del peso seco de la pared; varios tipos de manoproteínas (35-40%), con actividad enzimática hidrolasa, reticulante o estructural (Molon *et al.*, 2018); y una pequeña porción de quitina (1-2%).

Además de la pared celular, la levadura presenta una membrana plasmática de unos 7,5 nm de grosor que sirve como barrera hidrofóbica entre el medio extracelular y el citoplasma y que estructuralmente se compone de lípidos y proteínas. La porción lipídica de la membrana plasmática está conformada por fosfolípidos como la

fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina, y en menor medida, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol. También forman parte de ella algunos esteroides, ergosterol y zosterol. La parte proteica la componen proteínas integrales, inmersas en la región apolar de la bicapa lipídica; y periféricas, externas y unidas a las integrales. Las funciones más importantes de la parte proteica de la membrana son la de proporcionar anclaje para el citoesqueleto, la transducción de señales, el transporte de solutos por medio de permeasas, ATPasas y canales iónicos, y de transporte facilitado (Molon *et al.*, 2018).

Por su parte, el citoplasma se encuentra conformado por el citosol, que muestra un pH de entre 5 y 6 y contiene iones, compuestos orgánicos y macromoléculas solubles, además del resto de los orgánulos propios de las células eucariotas, incluyendo al núcleo envuelto por su membrana (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008); y un citoesqueleto interno formado por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios.

S. cerevisiae pertenece a la división Ascomycetes, un grupo monofilético que comprende aproximadamente al 75% de los hongos conocidos. Dicho grupo, y en concreto esta especie, puede llevar a cabo reproducción asexual multiplicándose por gemación celular cuando las condiciones ambientales son óptimas; o reproducción sexual, mediante la formación y acumulación de ascosporas en el interior de un saco denominado asca, lo cual ocurre en condiciones adversas como temperatura baja, pH ácido y falta de nutrientes.

Desde un enfoque genético, se conoce que estas levaduras, entre otras de igual modo vínicas, pueden ser mayormente diploides, aunque también poliploides o aneuploides (Duina *et al.*, 2014). El elevado polimorfismo de sus cromosomas favorece la variabilidad en la viabilidad de las esporas y en la capacidad de esporulación, lo cual supone una gran ventaja en favor de su adaptación a los cambios en las condiciones ambientales y de la sobreexpresión esencial de algunos genes en el proceso fermentativo (Carrascosa *et al.*, 2012; Pérez-Ortín & García Martínez, 2005).

Por su naturaleza anaerobia facultativa, su ubicuidad en la uva y el mosto, y su elevada tolerancia al etanol y a las condiciones de estrés previamente mencionadas, se considera que, de entre las especies del género *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* es la

principal responsable de la transformación de mosto en vino, y del mismo modo constituye el organismo más utilizado en la industria por excelencia para su elaboración y la de otros productos como la cerveza o el pan (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008). Parte de dicha capacidad es debida al gran número de enzimas que hay presentes en su citoplasma desempeñando importantes funciones en el metabolismo del carbono del azúcar y, por consiguiente, en el proceso de fermentación alcohólica. Además de ello, un estudio llevado a cabo por Moreno-García *et al.*, 2014, expone que el orgánulo responsable del cambio de metabolismo que ciertas levaduras, incluyendo a *S. cerevisiae*, experimentan durante el proceso fermentativo es la mitocondria, lo cual sin duda favorece su supervivencia incluso cuando las condiciones del medio van progresivamente volviéndose desfavorables.

Algunas cepas de esta levadura presentan una característica especial muy asociada a la fermentación alcohólica y a la crianza biológica de algunos vinos como los de Jerez o los Montilla-Moriles, además de otros vinos italianos, franceses y húngaros. Esta característica, previamente mencionada, es su capacidad de floculación y adhesión, la cual sucede al final del proceso fermentativo como mecanismo de adaptación cuando las condiciones se vuelven demasiado desfavorables, como concentraciones de etanol en torno al 15% (v/v), nivel de azúcares fermentables muy bajos, falta de oxígeno, pH ácido y la presencia alta de sulfitos. Cuando se dan estos factores, el metabolismo fermentativo de la levadura cambia a uno oxidativo, conociéndose esto como cambio diáuxico. De este modo, las levaduras comienzan a formar agregados multicelulares en la superficie del vino (Alexandre, 2013) para acceder mejor al oxígeno y conseguir crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables como el etanol y glicerol (Zara *et al.*, 2005, 2010). Por otra parte, si en el medio no hay fuente de nitrógeno disponible, las levaduras no pueden formar dichos agregados (Legras *et al.*, 2016; Berlanga *et al.*, 2006). Estos se conocen como biopelículas, biofilms o velos de flor (Alexandre, 2013, Legras *et al.*, 2014), y son favorables si están formados principalmente por cepas de *S. cerevisiae*, aunque otros géneros de levaduras y bacterias pueden originar diferentes tipos de velos en el vino, no siempre deseables (Ruíz-Muñoz *et al.*, 2022). Nuevos descubrimientos sobre la formación de velo se van revelando gracias al análisis proteómico, como el papel importante de varias proteínas, Hsp12p (Zara *et al.*, 2002), Flo11p (Zara *et al.*, 2005) y Ccw14p (Moreno-García *et al.*, 2017, 2018).

1.2.4. Cinética de crecimiento durante el proceso fermentativo

Como previamente se describe, *S. cerevisiae* puede reproducirse de forma sexual y asexual dependiendo de las condiciones ambientales. Cuando estas son propicias, se da la reproducción sexual, consistente en un ciclo de división celular que se compone de cuatro fases cíclicas: la Fase S, o fase de replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN); la Fase M, o fase de mitosis que involucra la segregación cromosómica; y dos Fases “gap” (G), denominadas G1 y G2, en las cuales la célula se prepara para dividirse. De estas dos últimas, la Fase G1 se da entre la M del primer ciclo y la S del segundo, e involucra la citoquinesis y la separación de células; y la Fase G2 acontece entre las Fases S y M de un ciclo, ocurriendo en ella la segregación cromosómica. Tras la separación de las células, la nueva célula surgida por gemación es más pequeña que aquella de la que proviene, por lo que al contrario que ésta, la nueva debe esperar hasta aumentar su tamaño considerablemente para poder iniciar una nueva gemación. Cada 90 minutos, la población de *S. cerevisiae* se puede duplicar, lo cual constituye el transcurso de una generación (Madigan *et al.*, 2019). Si, por el contrario, se dan condiciones de escasez de nutrientes o un ambiente difícil para la supervivencia, las células diploides generan ascosporas haploides por meiosis. En el momento apropiado, estas ascosporas se liberan del asca, germinan y comienzan a multiplicarse generando células haploides.

Durante la fermentación alcohólica, las células de levadura presentan una sucesión de cuatro fases de crecimiento, cuya duración depende de las condiciones ambientales, la presencia de oxígeno y nutrientes, y de la capacidad de resistencia de las células al estrés (Figura 9).

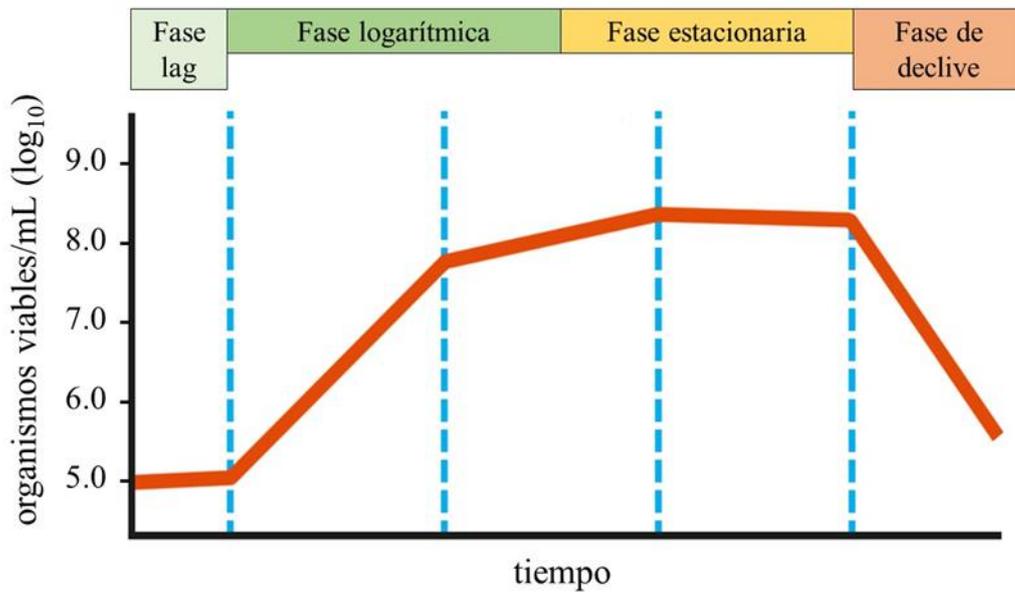


Figura 9. Etapas de la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica. Fuente: Modificación propia a partir de *Labster Theory* (2021) y Valderrama-Heller (2008).

- Periodo de latencia (o fase lag): Comprende las primeras horas desde el inicio de la fermentación alcohólica, en las cuales la población de individuos no aumenta al adaptarse a las nuevas condiciones ambientales.
- Periodo de crecimiento exponencial (o fase logarítmica): Puede durar de 3 a 6 días, en los que las levaduras comienzan a dividirse y la población aumenta rápidamente, ya que los individuos han comenzado a metabolizar los azúcares y a obtener energía para reproducirse.
- Periodo estacionario: Su duración es de 2 a 10 días, y en ellos la población de levaduras se mantiene prácticamente constante, debido a que la disponibilidad de nutrientes comienza a ser un factor limitante, lo cual provoca que surjan tantos nuevos individuos como los que van muriendo.
- Periodo de declive (o fase de muerte): En este último periodo, la población disminuye drásticamente hasta su práctica desaparición, debido a la falta casi total de nutrientes y a la toxicidad del medio producida por algunos compuestos que se han generado en el proceso, como el etanol a altas concentraciones (Moreno-Arribas & Polo, 2005).

Se considera que la levadura ha sido eficiente en la fermentación cuando una cierta proporción de los individuos ha sobrevivido y perdura activa hasta que se hayan metabolizado todos o el máximo posible de azúcares fermentables.

1.2.5. Criterios de selección de cepas fermentadoras

Se ha comprobado que el metabolismo de *S. cerevisiae* muestra una elevada contribución a las características organolépticas del producto resultante, puesto que del mismo surgen, además de etanol, algunos metabolitos secundarios muy importantes que contribuyen aromáticamente al vino, como el acetato, el glicerol, el piruvato, el succinato y algunos ésteres y compuestos que se detallan más adelante (González-Ramos & González, 2006). Se conoce también que las distintas cepas de esta especie pueden producir vinos con cualidades sensoriales muy diferentes entre sí (Liti, 2015). Por ello, con el propósito de obtener resultados deseados y reproducibles en las cualidades sensoriales de los vinos, las bodegas tienden desde hace décadas a realizar fermentaciones con inóculos de levaduras previamente seleccionadas, traducándose en lo que se conoce como fermentaciones dirigidas. Por otro lado, las fermentaciones no dirigidas son llevadas a cabo por las levaduras presentes de forma natural en la uva y el mosto, sin añadir nuevas, por lo que su presencia podría debilitarse notablemente por la adición de SO₂ y, sobre todo, el resultado final sería mucho menos reproducible de una vez a otra.

Se ha establecido una serie de criterios y parámetros evaluables para seleccionar buenas levaduras iniciadoras de la fermentación o “starters” (Liti, 2015), expuestos en la Tabla 3.

Tabla 2: Propiedades valorables como criterios de selección de cepas de levadura con características enológicas óptimas. Fuente: Elaboración propia a partir de Liti (2015).

Propiedades fermentativas	Propiedades tecnológicas	Propiedades sensoriales
Inicio rápido de fermentación	Estabilidad genética	Baja formación de H ₂ S
Alta eficacia fermentativa	Tolerancia a SO ₂	Baja producción de acidez volátil
Tolerancia al estrés por etanol	Escasa producción de acetaldehído	Baja producción de alcohol
Osmotolerancia	Bajas necesidades de compuestos nitrogenados	Producción de glicerol y precursores
Rendimiento alcohólico moderado	Capacidad de floculación	Consumo de ácido málico
Intervalo óptimo de temperatura	Compactación del sedimento	Producción de ésteres volátiles fermentativos
Producción de biomasa moderada	Factor killer	Rotura de precursores glicosídicos y tiólicos
Resistencia a la acidez	Resistencia a la desecación	Facilidad de autólisis
	Actividad proteolítica	Bajo potencial de carbamato de etilo
	Marcado genético	

Hoy en día no se ha descubierto ni conseguido obtener ninguna especie de levadura que cumpla todos los requisitos mencionados, por ello, se busca que posean el mayor número posible de dichas características.

1.2.6. Levaduras autóctonas y comerciales

Según su procedencia y naturaleza, las levaduras “starters” pueden ser comerciales o autóctonas de la zona vitivinícola en cuestión. Cuando se trata de una levadura comercial, la selección se realiza atendiendo a las características fermentativas de la misma, previamente determinadas y escogidas para según qué tipo de fermentación se desee llevar a cabo. Su uso está extendido por todo el mundo y a gran escala con el

propósito de dotar de una mayor fiabilidad y reproductibilidad a la vinificación (Wang *et al.*, 2022). Actualmente se comercializan más de cien cepas diferentes pertenecientes a seis casas comerciales principalmente. En muchos casos, se busca que estas cepas comerciales posean una fuerte eficiencia fermentativa, elevada cinética de fermentación y resistencia alta a diversas condiciones de estrés. Con ello, es más sencillo solucionar posibles alteraciones químicas y microbiológicas en las primeras fases de la fermentación, así como detenciones espontáneas en cualquier etapa del proceso. Es así como se favorece la homogeneidad de fermentaciones cuando se trata de elaborar una misma variedad de producto (*Acenología*, 2023).

Sin embargo, en vinificación también se busca con mucha frecuencia mantener la originalidad e identidad propia de los productos vínicos, por lo que la principal desventaja que puede suponer el uso de las levaduras comerciales frente a las autóctonas es la limitación de esa identidad organoléptica, condicionada en gran medida por el metabolismo de las levaduras indígenas de cada zona. Por ello, es muy común que se realicen fermentaciones dirigidas con una selección previa de levaduras autóctonas que permitan la obtención de resultados deseados en el producto (Liti, 2015; Lafon-Lafourcade, 1983; Snow, 1975).

1.3. CIENCIAS ÓMICAS EN LA ENOLOGÍA

1.3.1. Concepto y tipos

Desde que la vinificación dejó de considerarse un fortuito proceso de transformación del mosto para llegar a ser comprendida como una ciencia controlable e inmensamente versátil, muchos avances han sido necesariamente introducidos en el terreno científico de la enología. Conocer lo más a fondo posible todos los procesos químicos y biológicos que implican la obtención de vino, así como las reacciones internas de los microorganismos involucrados en su elaboración, se ha convertido en algo esencial y, como tal, abarca un extenso y creciente campo de investigación.

Un conjunto de disciplinas de investigación conocidas como ciencias ómicas surgen con el fin de identificar y cuantificar en masa a una gran cantidad de moléculas

biológicas de muy diversa naturaleza y características presentes en una muestra. Las disciplinas integradas dentro de la categoría de ciencias ómicas primarias son la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica (Figura 10). Aunque todas ellas persiguen un conocimiento profundo y global de las moléculas biológicas que estudian, también existen las ciencias ómicas secundarias, todas ellas derivadas de las primarias, que se enfocan en familias de moléculas concretas como los glicanos, los lípidos, compuestos xenobióticos o productos de su interacción, y se llaman respectivamente glicómica, lipidómica, xenometabolómica e interactómica.

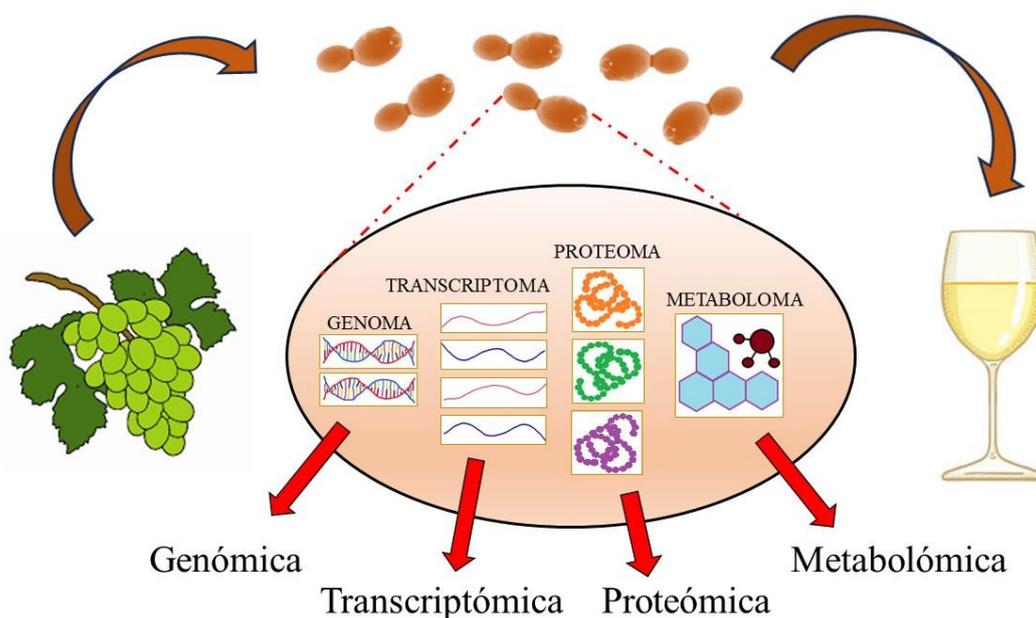


Figura 10. Niveles de investigación ómica relacionados con el proceso fermentativo del vino. Fuente: Elaboración propia a partir de *Fundación Instituto Roche* (2019).

Las ciencias ómicas, asociadas a la enología, introducen numerosas técnicas y tecnologías de alto rendimiento que permiten el análisis global de los metabolitos y macromoléculas biológicas presentes en el vino y en los microorganismos propios de él. Esto permite multitud de estudios cuantitativos, cualitativos y comparativos de diversos parámetros y condiciones asociadas a la fermentación alcohólica. Además del conocimiento que el dominio de estos campos permite alcanzar, las ciencias ómicas también conllevan otros beneficios como el desarrollo de numerosas y avanzadas técnicas de almacenamiento, contrastación, tratamiento y evaluación de la información obtenida. Por ello, estas disciplinas se encuentran íntimamente ligadas a herramientas

bioinformáticas como las bases de datos y o los programas de análisis estadístico, entre otras.

Resulta por otro lado, muy útil e interesante la búsqueda de la integración de todas las técnicas ómicas para proveer de información completa sobre productos y organismos vivos (Zhang *et al.*, 2010), algo que se conoce como biología molecular de sistemas. Numerosos estudios recientes en enología se han dedicado a establecer relaciones entre las respuestas genómicas, transcriptómicas y proteómicas por parte de *S. cerevisiae* con la metabolómica del vino, y más concretamente, con la producción de metabolitos que contribuyen al aroma y al sabor (Porrás-Agüera *et al.*, 2020a, 2020b, 2019; Nadai *et al.*, 2016; Moreno-García *et al.*, 2015; García-Ríos *et al.*, 2014; Rossow *et al.*, 2009, 2010; Rossignol *et al.*, 2009).

1.3.2. Proteómica

Se conoce como proteómica a la ciencia enfocada en la identificación, la cuantificación y el estudio de las funciones de todo un conjunto de proteínas que se expresan a nivel celular, tisular o de organismo completo, en unas condiciones dadas y en un estado de desarrollo concreto del mismo. Se conoce, por tanto, al proteoma como el conjunto de todas esas proteínas, siendo estas macromoléculas esenciales por las funciones que desempeñan: estructural, formando parte física de todos los orgánulos y compartimentos celulares; reactiva, encontrándose involucradas en las vías metabólicas y recibiendo en este caso el nombre de enzimas; y reguladora, comportándose como sustratos desencadenantes o inhibidores de muchas de estas vías.

Para llevar a cabo estudios de proteómica, existen numerosas técnicas analíticas de alta precisión basadas en la separación e identificación de las proteínas de una muestra. De entre estas técnicas, las más utilizadas son las siguientes:

- Electroforesis en geles: Consiste en realizar una separación de proteínas en base a cualidades como su peso molecular, el tamaño de las cadenas aminoacídicas o su forma, realizándose en geles de poliacrilamida. Existen diversas variedades, como la electroforesis capilar en gel (CGE, “Capillary Gel Electrophoresis”), que incluye la cuantificación automática de los picos de proteínas. Sin embargo, la

variedad más utilizada de este tipo es la electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE, “Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis), que además de las cualidades de la anterior, realiza la separación de proteínas en base a sus puntos isoeléctricos (PI, ó IEF, “Isoelectric Focusing”), aplicando un gradiente de pH inmovilizado (IPG, “Immobilized pH Gradient”) y un potencial eléctrico haciendo que un extremo del gel sea más positivo que el otro. Ambas técnicas se complementan con la aplicación posterior de espectrometría de masas (MS, “Mass Spectrometry”), una tecnología de alta resolución en la que las proteínas procedentes tanto de mezclas simples como complejas son identificadas y cuantificadas en base a su ratio masa/carga (m/z). De forma opcional, también es posible la adición de pigmentos fluorescentes que aumentan la sensibilidad del tratamiento (Sonck *et al.*, 2009).

- Procedimiento libre de geles: Permite la detección de millares de proteínas a la vez, así como la identificación de proteínas poco abundantes (Wolff *et al.*, 2006) sin utilizar geles. Se conoce como “shotgun” al estudio de las proteínas de una muestra partiendo de un análisis rápido y directo del complejo de péptidos surgidos de su digestión enzimática (Wu & MacCoss, 2002). Para ello, se utiliza cromatografía líquida (HPLC, “High Performance Liquid Chromatography”) asociada a MS, lo cual proporciona un mayor intervalo dinámico y una cobertura de proteínas más amplia que las técnicas electroforéticas, sobre todo para proteínas hidrofóbicas y poco abundantes (Qi & Li, 2010). También existe la técnica de fraccionamiento OFFGEL, muy empleada para tratar muestras de proteínas extraídas de levaduras vínicas. Utilizando la misma dinámica que el 2D-PAGE, separa las proteínas en base a su PI empleando tiras de IPG, pero en este caso, las proteínas separadas se pueden recuperar en las fracciones líquidas, facilitando su posterior tratamiento con MS (Moreno-García *et al.*, 2017).

Como previamente se comenta, la MS es un complemento esencial del fraccionamiento proteómico (Sailwal *et al.*, 2020). Un espectrómetro de masas presenta una fuente de iones, un analizador de masas y un detector de iones. En MS se ha generalizado el uso de detectores híbridos, como el cuadrupolo de trampa lineal de iones (LTQ, “Linear Trap Quadrupole”) asociado al analizador de masa Orbitrap (LTQ-Orbitrap) o la desorción/ionización láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI-

TOF, “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight”). En el sistema LTQ-Orbitrap, el LTQ sirve para la captura, selección, fragmentación y detección de iones de baja resolución. Estos son atrapados y analizados por el Orbitrap mediante campos electrostáticos mientras se agitan a lo largo de un electrodo central (Eliuk & Makarov, 2015). Por su parte, en la herramienta MALDI-TOF, las células quedan incrustadas en una matriz que posteriormente extrae y cristaliza las proteínas. Estas son expuestas a un rayo láser y son ionizadas sin que la muestra haya sido fragmentada. Los iones van atravesando un campo electrostático y separándose hasta que pasan por el detector de iones, que genera una huella digital específica (Zhang *et al.*, 2022). Esta tecnología también puede acoplarse en tándem para realizar análisis de muestras complejas, conectándose dos o más espectrómetros de masas (MS/MS).

Las técnicas proteómicas, al igual que los diseños experimentales y las estrategias de trabajo, han ido evolucionando mucho con el tiempo, existiendo una metodología común para llevar a cabo cualquier tratamiento y análisis proteómico. Esta consta de los siguientes pasos: diseño del experimento, muestreo, preparación de muestras, extracción de proteínas, separación de los extractos, análisis con MS, identificación de las proteínas observadas, análisis estadístico de los datos y validación (Jorrín-Novo *et al.*, 2009). Sin embargo, es importante considerar que durante un análisis proteómico existen ciertos factores que pueden resultar limitantes o problemáticos, como la cantidad exacerbada o insuficiente de proteínas en una muestra, la degradación o pérdida de éstas durante su manejo y en la aplicación de equipos de fraccionamiento y espectrometría, o el límite de detección de los equipos.

Por otra parte, también van surgiendo nuevas y diferentes bases de datos, además de la actualización de otras existentes como Uniprot, NCBI’s Entrez Protein, Swiss-Prot, RefSeq, TrEMBL, Pfam y, para la selección de levaduras de *S. cerevisiae*, SGD (“Saccharomyces Genome Database”), lo cual contribuye a la eficacia y la precisión de sus estudios proteómicos. Algunas de ellas aportan también herramientas como “Gene Ontology” (GO), con las que poder agrupar proteínas en términos ontológicos (GO terms) como su función molecular, el componente celular al que pertenecen o el proceso biológico en el que intervienen (Cherry *et al.*, 2011).

Desde su integración en el campo de la enología, la proteómica ha sido muy utilizada en el análisis de las proteínas de las levaduras fermentadoras y cómo se expresan durante las etapas del proceso fermentativo. Entre otros, destacan estudios proteómicos sobre la influencia de diversas condiciones de estrés como las fluctuaciones térmicas, las altas concentraciones de etanol o de azúcares iniciales, la falta de oxígeno o la sobrepresión de CO₂ en segundas fermentaciones (González-Jiménez *et al.*, 2020a, 2020b, 2020c; Porrás-Agüera *et al.*, 2020a, 2020b, 2020c, 2021; Moreno-García *et al.*, 2018; Szopinska *et al.*, 2016; Usbeck *et al.*, 2014; Braconi *et al.*, 2011).

1.3.3. Metabolómica

La metabolómica se designa como la ciencia ómica que identifica y cuantifica el conjunto de todos los metabolitos sintetizables, tanto a nivel intracelular como extracelular, de un organismo (Braga & Adamec, 2018), conjunto nombrado por primera vez en por Oliver *et al.* (1998) bajo el término de metaboloma. Esta ciencia aporta numerosas ventajas al estudio de un organismo en complemento con el resto de las ciencias ómicas. Entre ellas, destacan la existencia de plataformas analíticas altamente desarrolladas y precisas para trabajar con grandes cantidades de metabolitos, suponiendo un reducido coste económico y tiempos de análisis generalmente cortos. La principal dificultad a la que se enfrenta es la complejidad que supone trabajar con metabolitos químicamente muy diferentes y que pueden darse en un organismo en concentraciones muy variadas, desde picomoles (pmol) a milimoles (mmol). Por este motivo, se debe hacer uso de diferentes técnicas para la preparación de muestras y para analizar los metabolitos (Bordet *et al.*, 2020; Arbulu *et al.*, 2015). Estas técnicas se emplean dependiendo del tipo de enfoque que se desea llevar a cabo, siendo estos los siguientes:

- Enfoque dirigido: Focaliza su búsqueda en un metabolito determinado, del que previamente se tiene conocimiento, por lo cual también se conoce esta técnica como análisis diana.
- Enfoque no dirigido: Permite obtener una visión global del perfil metabolómico de un sistema biológico en unas condiciones de estudio dadas, persiguiendo para ello la detección, identificación y cuantificación de todos los metabolitos posibles.

Se considera que las técnicas que siguen un enfoque dirigido pueden resultar muy útiles para la detección y el estudio de un metabolito concreto, pero pierden eficacia con respecto a las que conducen el análisis de todo el perfil metabolómico. Las técnicas más utilizadas para este fin son la espectrometría de masas (MS) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR, “Nuclear Magnetic Resonance”), en conjunción con otras como la cromatografía de gases (GC, “Gas Chromatography”), la cromatografía de líquidos (LC, “Liquid Chromatography”), la transformada de Fourier (FT, “Fourier Transform”) o, ya en menor medida, la electroforesis capilar (CE, “Capillary Electrophoresis”).

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (NMR) funciona basándose en las diferencias de contraste que se dan en los espacios vecinos a los núcleos atómicos dentro de un intenso campo magnético. Es una técnica muy rápida ya que no requiere separación previa de los compuestos y todos ellos pueden ser detectados y medidos de forma simultánea (Gougeon *et al.*, 2019). La falta de necesidad de manipulación laboriosa de la muestra antes de su procesado permite que ésta pueda ser recuperada con vistas a posteriores análisis (Diamantidou *et al.*, 2018). En contraposición, se considera que su sensibilidad es reducida en comparación con el resto de las técnicas de análisis metabolómico que se asocian a MS (Rochfort *et al.*, 2010), y el proceso de identificación suele ser más complejo. Esto suele ser debido a la complejidad de los espectros obtenidos por NMR que, por la gran cantidad de señales relacionadas con los metabolitos que se reciben, los picos pueden superponerse. Por ello se desarrolló la NMR en dos dimensiones (NMR-2D), y esta nueva dimensión permite la aportación de datos complementarios para interpretar los espectros más completa y fácilmente (Alañon *et al.*, 2015).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es una de las técnicas más utilizadas para la detección de metabolitos en muestras de vino, debido a su alta sensibilidad, su elevada capacidad de separación de analitos y su reproductibilidad. En ella, la muestra se introduce en un inyector, se volatiliza y pasa a una columna cromatográfica. Un gas inerte constituye la fase móvil en el flujo de los metabolitos, que deben ser suficientemente volátiles y térmicamente estables para atravesar dicha columna hasta llegar al detector (Figura 11).

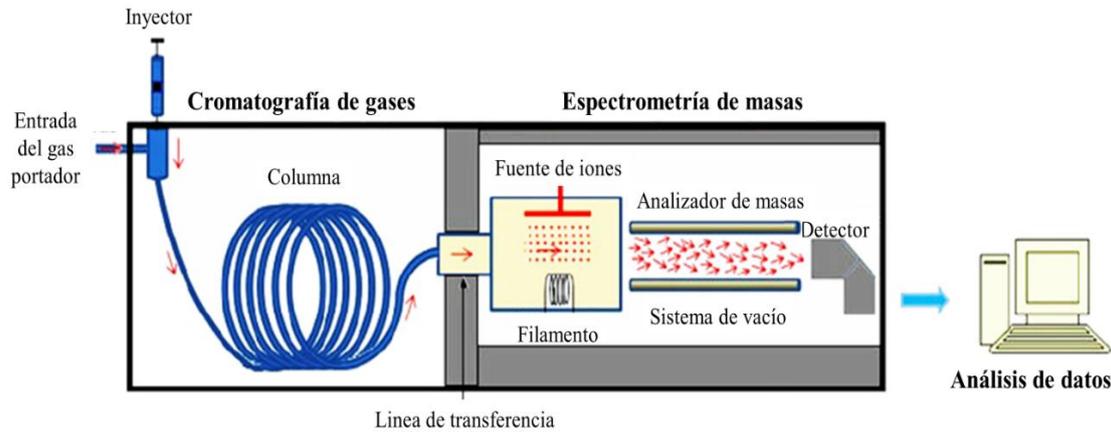


Figura 11. Esquema de funcionamiento de la técnica GC-MS. Fuente: Modificación propia a partir de Emwas *et al.* (2015).

Aunque es una tecnología altamente eficaz, requiere previamente un tratado de las muestras para mejorar su volatilidad y la estabilidad térmica de los metabolitos, e incluso una derivatización química de aquellos que no son volátiles (Schueuermann *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2018). Como alternativa a la MS, la GC puede asociarse también a un detector de ionización de llama (FID, “Flame Ionization Detector”) cuando se busca analizar cantidades mayores de metabolitos en la muestra o como técnica selectiva para determinar compuestos formados por enlaces C-H. En este caso, FID funciona como un quemador de hidrógeno/oxígeno en el que el flujo de metabolitos transportados por el gas inerte se mezcla con el hidrógeno y a continuación es quemado en una cámara con exceso de oxígeno. Los iones que se generan son recogidos por un colector cilíndrico polarizado situado en la zona superior de la cámara. Por su aplicabilidad, posee una gran sensibilidad, estabilidad y manejo sencillo, con el inconveniente de la posible ionización total de la muestra (Holm, 1999).

La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) permite separar los metabolitos de una muestra en base a sus propiedades físicas y/o químicas. En ella, la fase móvil que permite el flujo de compuestos es un líquido, por los cuales los solutos son arrastrados por una columna cromatográfica con una fase estacionaria líquida o sólida. Según la afinidad de esta por cada metabolito, estos fluyen a diferente velocidad presentando un mayor o menor tiempo de retención. De este modo, se separan los metabolitos, siguiendo después una ionización por electropulverización (ESI, “Electrospray Ionization”), que únicamente detecta los compuestos capaces de ser

ionizados mediante la adición o eliminación de un protón (Diamantidou *et al.*, 2018; Alañón *et al.*, 2015; Dunn & Ellis, 2005). A pesar de que la LC posee una menor resolución que la GC, sí que se considera más versátil, puesto que permite medir un intervalo de metabolitos más amplio, y está condicionada, como la GC, por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra (Theodoridis *et al.*, 2012; Capone *et al.*, 2011). Para incrementar la resolución y la eficacia de la LC surgió primero la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, “High-Performance Liquid Chromatography”), y más adelante, apareció el sistema ultra-HPLC (UHPLC) que, además de mejorar aún más dichas características, reduce el tiempo de análisis (Alañón *et al.*, 2015).

Existen dos técnicas que aplican la Transformada de Fourier (FT): la espectroscopía infrarroja por FT (FT-IR, “Fourier Transform Infrared Spectroscopy”) y la espectrometría de masas de resonancia ciclotrónica por FT (FT-ICR-MS, “Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – Mass Spectrometry”). La FT-IR consiste en una técnica de espectroscopía vibratoria muy útil para tomar huellas dactilares y realizar análisis rápidos y simultáneos de un gran número de metabolitos con alta precisión y sensibilidad, además de no ser destructiva. Esta técnica está basada en la vibración producida por la absorción de una longitud de onda específica por parte de los enlaces químicos existentes en la muestra, lo cual permite la identificación de grupos funcionales relacionados (Alañón *et al.*, 2015). Por otra parte, la FT-ICR-MS está basada en el principio del movimiento circular de los iones en un campo magnético. Funciona midiendo valores de masa/carga mediante la detección de la corriente de imagen que se produce en la aceleración de los iones desde un centro común hacia el exterior, que van siguiendo una espiral en un campo magnético creado por un imán superconductor de campo alto (Diamantidou *et al.*, 2018).

Por último, la electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE-MS) es una técnica que, aunque posee una mayor resolución que la HPLC por su rapidez en el análisis de metabolitos con carga polar y su no requerimiento de derivatización de los compuestos, presenta una menor reproductibilidad y sensibilidad, por lo que su empleo no es tan común (Diamantidou *et al.*, 2018; Alañón *et al.*, 2015).

Muchos estudios relacionados con el vino incluyen metabolómica en su metodología, proporcionando resultados muy interesantes en este ámbito (Romano *et al.*,

2022; Bordet *et al.*, 2021; Ogawa *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Minebois *et al.*, 2020a, 2020b; Álvarez-Fernández *et al.*, 2020, 2019; Petitgonnet *et al.*, 2019; Peng *et al.*, 2018).

1.4. ANÁLISIS DEL VINO

1.4.1. Parámetros enológicos

Con la búsqueda del mejor perfil organoléptico del vino y de la regulación óptima de componentes potencialmente perjudiciales para la salud humana, surgieron diversos tipos de análisis enfocados en evaluar algunos parámetros básicos de los vinos. Éstos, con el tiempo, se establecieron como una práctica habitual y esencial en bodegas y laboratorios de investigación enológica. Dichos parámetros son, entre otros:

- El grado alcohólico: Expresa la concentración volumen/volumen (v/v) de etanol que presenta el vino, medido en porcentaje (%). Este depende en gran medida del tipo de uva, su grado de madurez, las condiciones del proceso fermentativo, la levadura empleada para ello y la concentración inicial de azúcares en la uva y en el mosto. Normalmente suele rondar los 9-15 grados, aunque vinos como los de Jerez y otros vinos licorosos, a los que se les añade alcohol, presentan una graduación más alta. En España no se permite a las bodegas añadir azúcares que no son propios del mosto para aumentar la graduación alcohólica, y todas las botellas de productos vínicos están obligadas a incluir en su etiqueta este parámetro.
- El pH: Constituye una unidad de medida de la acidez del vino, midiéndose en una escala de 0 a 14. Los pH adecuados para el vino suelen encontrarse en torno a 2.8, extremadamente ácido; y 4, generalmente plano y sin acidez. Los vinos blancos (pH entre 3 y 3.3) suelen ser más ácidos que los vinos tintos (pH entre 3.3 y 3.8), dependiendo generalmente de los mismos factores que el grado alcohólico y que pueden condicionar la fermentación. Un pH adecuado propicia mejoras en el vino como un mayor frescor, mejor conservación de los aromas varietales, y estabilización del color y de los compuestos químicos que contribuyen al aroma.

- Acidez total: Comprende la suma de todos los ácidos que componen el vino, tanto los que proceden de la uva (mayormente málico, tartárico y cítrico) y los generados durante el proceso de vinificación (destacando acético, láctico y succínico, que se describen más adelante). De entre todos ellos, el tartárico por sí solo puede alcanzar un 50-70% de los ácidos orgánicos del vino. Los valores genéricos de acidez total suelen ser entre 4.5 y 7 gramos por litro (g/L), y su principal función es estabilizar los valores adecuados de pH para la conservación del vino y la prevención de contaminaciones bacterianas. Este parámetro puede ser legalmente modificado mediante la adición de ácido tartárico o ácido cítrico para aumentar sus valores, o la adición de carbonato cálcico o bicarbonato potásico para disminuirlos, aunque muchas bodegas prefieren no recurrir a esta práctica (Entradas, 2022).
- Acidez volátil: Es el parámetro que indica el grado de acetificación o el nivel de ácido acético del vino, debido a que este constituye el ácido mayoritario en el vinagre. Su concentración depende de tipo de levadura, temperaturas elevadas de fermentación (25-30 °C), pH poco aptos para el vino (inferiores a 3.1 o superiores a 4) o la carencia de algunos aminoácidos y vitaminas del medio (Hidalgo, 2011). Durante el proceso fermentativo se suele producir de forma natural una cierta cantidad de este ácido carboxílico y, aunque ésta resulta generalmente imperceptible al olfato, cuando es apreciable, constituye una característica indeseable asociada a una mala conservación del producto o a contaminaciones microbianas. Por ello, se busca que los niveles de ácido acético se encuentren entre 0.2 y 0.7 g/L (Corison *et al.*, 1979). Superando esos niveles, suele aportar un cierto aroma picante, avinagrado o de barniz (Vilela-Moura *et al.*, 2010).
- Sulfitos: Como previamente se describió, el SO₂, que actúa como agente antimicrobiano, se añade previamente a la fermentación y, por tanto, es necesario medir sus niveles en el vino resultante. Estos niveles corresponden al SO₂ libre o combinado con moléculas orgánicas como azúcares, aldehídos u otros compuestos fenólicos, y según la normativa europea (Reglamento 606/2009 de la Comisión de 10 de julio de 2009), los vinos con un contenido en sulfitos mayor a 10 miligramos por litro (mg/L) deben incluir dicho dato en la etiqueta. Se considera

que los niveles máximos permitidos de sulfitos en vino tinto son de 150 mg/L, y en vinos blancos o rosados, de 200 mg/L (*Entradas*, 2022).

- **Ácido málico:** Sus niveles muestran si la fermentación alcohólica se ha completado con éxito o no, y cómo lo ha consumido la levadura. La posible presencia en el medio de bacterias que también lo consumen podría desembocar en el inicio de una fermentación maloláctica no deseada, donde el ácido málico se transformaría en ácido láctico y gas CO₂, por tanto, sus niveles también podrían ofrecer información sobre si este tipo de fermentación está ocurriendo. La presencia de ácido málico es deseable para una mayor suavidad organoléptica del vino, aunque los niveles no deben exceder de 2 g/L (Reglamento UE 2022/68).
- **Azúcares residuales:** El nivel de azúcares metabolizables que permanece en los vinos tras la fermentación da una idea de si la fermentación ha sido completa o no. Generalmente, los vinos tranquilos suelen ser secos (menos de 4 g/L de azúcar residual), pero también pueden catalogarse como semisecos (12-18 g/L), semidulces (18-45 g/L) y dulces (más de 45 g/L). Los vinos espumosos, por su parte, siguen otros criterios de evaluación (*Entradas*, 2022). En el caso de obtenerse un inesperado exceso de azúcares residuales, lo cual se suele corresponder con un menor grado alcohólico del deseado, se afirma que la fermentación ha sido incompleta, y puede tener su origen en diversos problemas con las condiciones ambientales, con posibles contaminaciones o con las levaduras que realizaron el proceso, entre otros.
- **Nitrógeno fácilmente asimilable:** Generalmente, sus niveles pueden oscilar dependiendo de la demanda de cada levadura, para cuyo metabolismo requiere mayor o menor cantidad de este elemento.

1.4.2. Perfil aromático del vino. Compuestos que contribuyen al aroma.

El aroma del vino es resultado de la contribución de un complejo conjunto de compuestos volátiles que pueden ser tanto propios de la uva cultivada como procedentes de las numerosas reacciones químicas y enzimáticas asociadas a la fermentación. Por esta razón, se considera que la actividad metabólica de las levaduras es muy determinante en

las características aromáticas del producto final, y se conoce que los compuestos volátiles derivados de dicho metabolismo son los que más contribuyen al aroma final del vino. En general, estos compuestos volátiles se agrupan dentro del término volatilo, y pueden clasificarse en cuatro categorías dependiendo de su procedencia:

- Aromas primarios o varietales: Los compuestos que contribuyen a ellos proceden de la uva o de las partes sólidas del racimo y son específicos de cada variedad. Generalmente, estos metabolitos aportan notas florales al conjunto aromático final y permanecen prácticamente intactos en el vino. Los terpenos, terpenoides, nor-isoprenoides y tioles polifuncionales son las familias químicas más representativas de compuestos contribuyentes a este tipo de aroma en *V. vinifera* (Romano *et al.*, 2022).
- Aromas pre-fermentativos: Son propiciados por compuestos obtenidos durante la extracción del mosto y su maceración, a partir de procesos de oxidación e hidrólisis (Hidalgo, 2011). Estos metabolitos son mayormente aldehídos y alcoholes con seis carbonos que aportan toques herbáceos al aroma global, aunque su contribución puede resultar desfavorable en el vino, provocando amargor si se dan en concentraciones altas.
- Aromas fermentativos: Como su nombre indica, los compuestos que los producen se obtienen durante la fermentación (Frivik & Ebeler, 2003). Entre otros, destacan aldehídos, alcoholes superiores, ácidos, cetonas y ésteres. Aunque su contribución al aroma global del producto final es muy alta, no siempre resultan agradables, ya que dependen en gran medida del proceso fermentativo, por lo que cualquier problema durante la fermentación o con los microorganismos empleados puede alterar la calidad odorante. Otros factores como la composición del mosto, la temperatura o el pH también pueden influir notablemente en la presencia y concentración de dichos compuestos.
- Aromas terciarios, post-fermentativos o “bouquet”: Durante el envejecimiento del vino suceden numerosas reacciones químicas con enzimas involucradas, como la esterificación entre ácidos y alcoholes u otras reacciones de reducción-oxidación entre compuestos aromáticos y fenólicos, produciéndose los compuestos que

contribuyen a esta categoría (Benítez *et al.*, 2003; Pérez-Prieto *et al.*, 2003). Estos metabolitos, generalmente ésteres de alto peso molecular, suelen dotar al vino final con esencias delicadas y penetrantes que favorecen el equilibrio organoléptico final del producto.

El volatiloma del vino también puede clasificarse en base a la concentración en la que los metabolitos suelen encontrarse presentes en la muestra, considerándose como compuestos mayoritarios aquellos cuya concentración es igual o superior a 10 mg/L, y compuestos minoritarios los que se encuentran en concentraciones inferiores a esta. En cuanto a su contribución al aroma, cada uno de los compuestos involucrados presenta un umbral de percepción específico, y solamente si la concentración del metabolito es igual o superior a dicho umbral, se considera detectable y contribuyente al aroma global.

Las familias químicas que contribuyen en mayor o menor medida al aroma del vino son diversas y variadas, al igual que su origen y las cualidades aromáticas que éstas aportan. Algunas de ellas, como los nor-isoprenoides, los terpenos y terpenoides, y los tioles polifuncionales, son de origen generalmente varietal. Otras familias que muestran una representación elevada en el aroma general del vino son los alcoholes superiores, los ésteres de etilo y de acetato, los ácidos carboxílicos, aldehídos y cetonas, los fenoles volátiles y algunos compuestos derivados del azufre. Estos compuestos, a diferencia de los de origen varietal, pueden surgir en diversos puntos de la fermentación, aportados por la levadura fermentadora, como productos de su metabolismo, liberados en el proceso de maceración del mosto o durante el periodo de envejecimiento del vino resultante.

Terpenos y terpenoides

Sus estructuras químicas, basadas en la repetición de moléculas de isopreno, determinan que estos compuestos se conozcan también como isoprenoides. Su origen es generalmente varietal, llegándose a identificar en la uva y el vino unos 70 compuestos terpénicos, de los cuales, la mayoría corresponde a monoterpenos. Entre los que pueden darse, destacan el limoneno y el mirceno como representantes de los terpenos. Por otra parte, también son abundantes los terpenoides, consistentes en terpenos con modificaciones en su estructura química que resulten en una combinación con otros compuestos. Pueden, por tanto, aparecer combinados como aldehídos, entre los cuales se

encuentran el linalal y el geranial; como alcoholes, representados por el linalol y el geraniol, entre otros; y como ácidos, siendo el linálico y el geránico ejemplos de ello.

La biogénesis de isoprenoides tiene su origen en la ruta del ácido mevalónico (MVA) (Figura 12), donde el geranil pirofosfato es el primer terpenoide que surge y sirve de base para la síntesis de monoterpenos; o en la hidrólisis de enlaces glucosídicos por la vía de la 1-desoxi-D-xilosa-5-fosfato (DOXP) o no del ácido mevalónico (Figura 12). Ambas rutas culminan con la formación de pirofosfato de isopentenilo (IPP) o isopreno activo.

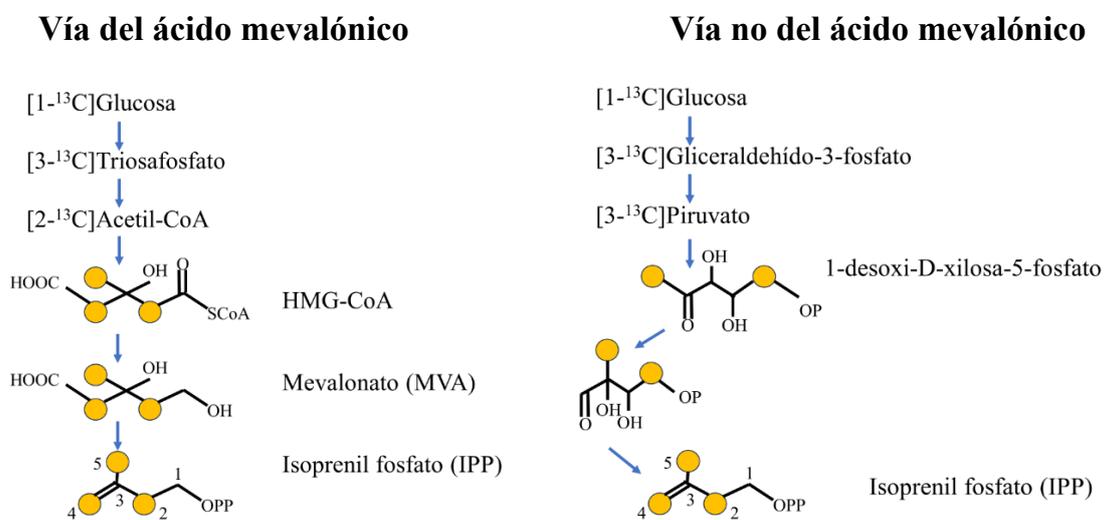


Figura 12. Rutas de biosíntesis de isoprenoides. Fuente: Elaboración propia.

El geranil pirofosfato es el primer compuesto terpenoide que surge y sirve de base para la síntesis de monoterpenos. En general, los terpenos aportan características florales de rosa y geranio al aroma global del vino; sin embargo, otros como el farnesol pueden dotarle con rasgos balsámicos o de resina (Swiegers & Pretorius, 2005).

Nor-isoprenoides

Los C13 nor-isoprenoides, nombrados así por los 13 átomos de carbono que componen su estructura, contribuyen al aroma del vino con atributos florales y frutales (Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2021). Al igual que los isoprenoides, su origen es mayoritariamente varietal, aunque también pueden formarse también durante la

fermentación y durante el envejecimiento del vino en botella o la crianza (*GmbH, 2020*). Su concentración es variable en muchas variedades de uva y depende en buena parte de las condiciones ambientales, ya que normalmente dicha concentración es más alta en los cultivos situados en regiones cálidas con elevada radiación solar. Los nor-isoprenoides C13 más importantes de los que se encuentran presentes en la uva son la *b*-damascenona, el 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN), el vitispirano y la *b*-ionona (*Gutiérrez-Gamboa et al., 2021*). Todos ellos derivan de la biodegradación de carotenoides como la luteína o el β -caroteno tras sufrir reacciones de oxidación enzimática. Las enzimas clave para la degradación oxidativa de un alto rango de carotenoides para la formación de nor-isoprenoides C13 son las carotenoide-dioxigenasas (CCD) (*Mendes-Pinto, 2009*). Inicialmente suelen estar presentes en forma glicosilada y no muestran olor, pero esto cambia tras la escisión catalítica ácida del residuo de azúcar y otras reacciones, contribuyendo de forma decisiva al aroma varietal del vino debido a sus bajos umbrales de olor y percepción (*GmbH, 2020*).

Tioles polifuncionales

Los tioles polifuncionales normalmente se encuentran en muy pequeñas cantidades en las uvas de vino (100 ng/L) y en el mosto, y se forman principalmente durante la fermentación por el metabolismo de la levadura a partir de precursores no volátiles, entre los que se nombran algunos conjugados cisteinilados y glutantionilados y ciertos compuestos carbonílicos insaturados.

Los tioles volátiles poseen bajos umbrales de percepción y, por tanto, su contribución al aroma del vino suele ser notoria. Aunque los tioles de bajo peso molecular como el metilmercaptano se asocian a menudo con aromas desagradables, otros tioles polifuncionales de mayor peso pueden otorgar un carácter varietal deseable en vinos como el Sauvignon blanc (*Musumeci et al., 2015*). En general, los tioles polifuncionales son responsables de los aromas típicos de fruta tropical y cítricos de los vinos. Tres de ellos son de particular relevancia: el 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (4-MMP), el 3-mercaptohexanol (3-MH) y el acetato de 3-mercaptohexilo (3-MHA); cuyos descriptores aromáticos son el boj, el pomelo y el maracuyá, respectivamente (*Musumeci et al., 2015*).

Ácidos carboxílicos

Algunos de los ácidos presentes en el vino presentan origen varietal, procediendo de la uva, mientras que otros se originan durante la fermentación alcohólica (Moreno & Peinado, 2012). Los compuestos volátiles pertenecientes a esta familia química pueden encontrarse en mayor o menor concentración en el vino en virtud de la longitud de su cadena de carbonos. Los que tienen de 4 a 6 generalmente son poco cuantiosos, mientras que los de 6, 8 y 10 pueden encontrarse en mayores cantidades (Drawert *et al.*, 1974; Webb *et al.*, 1967), algo que puede variar en función de la especie o cepa de levadura fermentadora (Usseglio-Tomasset, 1967). Al ser ácidos generalmente débiles, se encuentran parcialmente disociados (Moreno & Peinado, 2012). Los ácidos de cadena corta más representativos de los vinos suelen ser los ácidos acético (90%), hexanoico, isobutírico y propiónico (Abbas, 2006; Swiegers *et al.*, 2005), siendo su concentración aproximada en los vinos de entre 100 y 500 mg/L. El metabolismo del ácido acético por parte de *S. cerevisiae* involucra a la enzima piruvato descarboxilasa para la transformación de piruvato en acetaldehído, que posteriormente es oxidado a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (Pigeau & Inglis, 2007; Remize *et al.*, 2000).

La importancia de los ácidos carboxílicos en vinificación es alta, ya que son utilizados como control en el proceso fermentativo. Esto se explica porque, normalmente, su síntesis aumenta cuando la levadura se encuentra sometida a diversos tipos de estrés, como el osmótico o el térmico, y la mayor presencia de ácidos disminuye la permeabilidad de la pared celular, conllevando su muerte. Además de ello, desempeñan un gran rol en la estabilidad del vino, siendo responsable principal de la acidez volátil, y de ejercer, por tanto, una notable influencia en el perfil organoléptico del mismo (Marcé *et al.*, 1991). Además, el ácido acético es imprescindible en la formación de ácidos grasos junto a la acción de la acetil-CoA sintasa.

Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores o alcoholes de fusel constituyen la familia más representativa de metabolitos con origen fermentativo (Saerens *et al.*, 2010). Esta familia química agrupa alcoholes con tres o más carbonos en su composición molecular, por lo que el peso molecular y el punto de ebullición de estos compuestos superan a los del

etanol. Generalmente, concentraciones superiores a los 400 mg/L son indeseables en el vino, puesto que lo dotan de esencias desagradables y punzantes (Rapp & Versini, 1995), mientras que, si no superan los 300 mg/L, pueden aportar esencias agradables con características florales y frutales. Los compuestos más representativos de esta familia química en los vinos son el propanol, el isobutanol (2-metil-1-propanol), los alcoholes isoamílicos (2 y 3-metil-1-butanol) y el 2-feniletanol. Otros como el 1-butanol, el 3- y el 4-metil-1-pentanol, los alcoholes bencílico y furfurílico, y el tirosol, en menor medida, también son destacables. Cuando superan sus respectivos umbrales de percepción, se sabe que los alcoholes isoamílicos presentan descriptores odorantes que recuerdan al plátano o al mazapán, mientras que el propanol, el butanol y el isobutanol confieren un aroma alcohólico. Por su parte, el 2-feniletanol introduce esencia a miel y el tirosol, a rosa (Lambrechts & Pretorius, 2019). Los alcoholes superiores surgen como producto principal de la desaminación de aminoácidos por parte de las levaduras vínicas, que metabolizan dichos aminoácidos como su fuente principal de nitrógeno asimilable. Su síntesis es llevada a cabo por dos vías (Baumes, 2000) (Figura 13): la ruta catabólica (75% de las ocasiones), partiendo de aminoácidos exógenos por medio de la vía de Ehrlich (Hazelwood *et al.*, 2008; Dickinson *et al.*, 2003); y la ruta anabólica (25%), a partir de azúcares que pasan por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

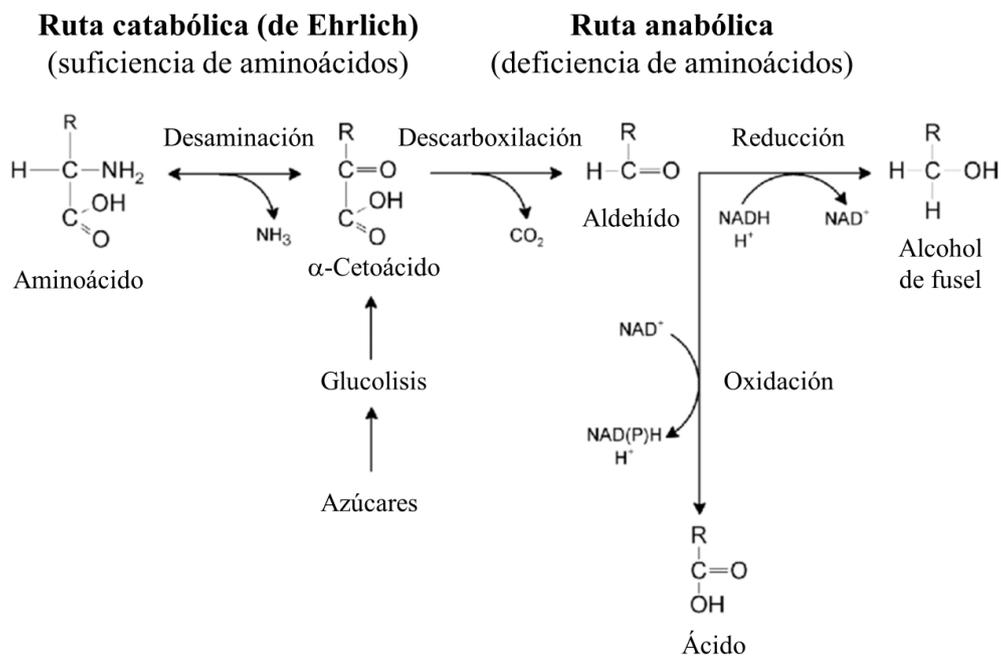


Figura 13. Vías de síntesis de los alcoholes superiores. Fuente: Modificación propia a partir de Kłosowski *et al.* (2015).

En estas vías, numerosas enzimas desempeñan un papel importante para la obtención de alcoholes superiores. Por medio de la vía catabólica intervienen inicialmente, por un lado, Aro8p y Aro9p, aminotransferasas de aminoácidos aromáticos primarios y pre-fermentativos; y por otro, Bat1p y Bat2p, procedentes de la mitocondria y del citosol de la levadura, respectivamente, que son aminotransferasas de aminoácidos ramificados (Hazelwood *et al.*, 2008). Estas enzimas catalizan la transaminación entre un aminoácido y un α -cetoácido, donde glutamato/ α -cetoglutarato actúan como complejo donante/aceptor. Seguidamente, las enzimas Aro10p, Thi3p, y las tres piruvato-descarboxilasas (Pdc1p, Pdc5p, Pdc6p) intervienen en la descarboxilación del α -cetoácido para formar un aldehído, un proceso sin retorno en la vía de Ehrlich (Bolat *et al.*, 2013). El paso final, que determina la formación de los alcoholes de fusel, es catalizado por las alcohol-deshidrogenasas Adh1p, Adh2p, Adh3p, Adh4p y Adh5p, además de la formaldehído-deshidrogenasa Sfa1p (Dickinson *et al.*, 2003). De ellas también se conoce que Adh1p interviene en la reducción de acetaldehído a etanol durante la fermentación (Bennetzen & Hall, 1982); Adh2p, al contrario, oxida el etanol (Picotti *et al.*, 2013), y Adh3p reduce el acetaldehído dentro de las mitocondrias, manteniendo así el equilibrio redox durante el crecimiento de la levadura en condiciones anaeróbicas (Bakker *et al.*, 2000).

Algunos autores defienden que los alcoholes superiores se encuentran involucrados en el equilibrio redox celular de la levadura mediante el mantenimiento de la ratio NADH/NAD⁺ (Van Dijken & Scheffers, 1986; Quain, 1988). No todos están de acuerdo con esto, ya que otros equivalentes redox producidos por la levadura, como el acetato, el acetaldehído, el etanol, el glicerol o el succinato, también pueden realizar dicha función. Pueden, sin embargo, favorecer la depuración de aldehídos tóxicos y servir de fuente de nitrógeno alternativa para la levadura (Boulton *et al.*, 1999; Volbrecht & Radler, 1973).

Ésteres

Esta familia química constituye el grupo de compuestos aromáticos más importante de los que derivan de la levadura, y su aportación al aroma del vino en concentraciones adecuadas (< 200 mg/L) es muy apreciada por las esencias dulces y afrutadas que generalmente suelen conllevar (Saerens *et al.*, 2010). Solo cuando se dan

en niveles superiores pueden propiciar olores desagradables a disolvente, barniz o esmalte de uñas. Los ésteres presentes en el vino, a su vez, se agrupan en dos subfamilias químicas, que son los ésteres etílicos derivados de ácidos grasos y los ésteres de acetato, siendo estos últimos los mayores contribuyentes al perfil aromático del vino. De los ésteres etílicos procedentes de ácidos grasos, destacan el hexanoato de etilo y el octanoato de etilo, que contribuyen con esencia de manzana. De los ésteres de acetato, los principales aportadores al aroma son el acetato de etilo, que confiere aroma afrutado; el acetato de isoamilo, que dota de esencia a plátano; y el acetato de 2-feniletilo, que contribuye con notas florales a rosas y miel.

La síntesis de los ésteres se encuentra muy ligada al metabolismo de lípidos y al desarrollo de la levadura, ocurriendo durante la fermentación del mosto. Por un lado, los ésteres pueden surgir por la esterificación de ácidos grasos, y por otro, ser sintetizados en el citoplasma de la levadura como productos de reacciones catalizadas por éster sintasas (aciltransferasas) y acil-Coenzima A (acil-CoA) actuando de cosustrato (Saerens *et al.*, 2008). En cuanto a la formación de ésteres de acetato, las enzimas responsables del proceso son las alcohol-acetil transferasas Atf1p y Atf2p (Mason & Dufour, 2000; Plata *et al.*, 1998). La primera de ellas cataliza hasta el 80% de la formación de acetato de isoamilo, el 75% de la síntesis de acetato de feniletilo y casi un 40% de la producción de acetato de etilo. Por su parte, los ésteres etílicos se forman gracias a la catálisis de las enzimas aciltransferasas (Acil CoA/etanol) Eht1p y Eeb1p (Lilly *et al.*, 2006; Saerens *et al.*, 2006).

Se considera que la levadura produce los ésteres como mecanismo de desintoxicación, ya que los ésteres son menos tóxicos para ella que sus ácidos y alcoholes precursores respectivos. La presencia de estererasas, sin embargo, puede condicionar el contenido final de los ésteres de acetato, ya que descomponen los ésteres por medio de su actividad hidrolasa o dificultan su formación (Plata *et al.*, 1998). De entre ellas, la Iah1p puede hidrolizar los acetatos de etilo, feniletilo, isoamilo e isobutilo.

Compuestos carbonílicos

En esta familia se agrupan los aldehídos y cetonas, muy importantes también en la caracterización odorante del vino, aunque solo algunos son significativamente

perceptibles en el perfil aromático. Se forman en la fermentación alcohólica durante el metabolismo de azúcares y α -cetoácidos cuando se sintetizan aminoácidos y alcoholes superiores (Lambrechts & Pretorius, 2000). Los más destacados son el acetaldehído (90% del contenido total de aldehídos en el vino) (Nykanen, 1986), el benzaldehído, el 2-furfural, el 5-hidroximetil-2-furfural y la 2,3-butanodiona (diacetilo).

El acetaldehído surge del metabolismo fermentativo de los azúcares por acción de la piruvato Descarboxilasa (PDC) y la alcohol-deshidrogenasa (ADH), aunque también del metabolismo de aminoácidos como la alanina y tras la oxidación post-fermentativa del etanol. Su concentración en vino depende del equilibrio entre esas dos enzimas (Romano *et al.*, 1994), y determina diferencias organolépticas dependiendo de si dicha concentración es mayor o menor. Cuando el contenido es menor de 70 mg/L, este compuesto aporta un agradable aroma frutal; pero cuando supera los 120 mg/L, la esencia que ofrece es de carácter herbáceo (Byrne & Howell, 2017). Es un compuesto altamente reactivo por lo que, además de ser precursor de la formación de acetoína, acetato y etanol, numerosos compuestos pueden surgir de su unión a proteínas y aminoácidos.

La 2,3-butanodiona también se forma a partir del acetaldehído y aporta esencias a mantequilla en los vinos donde es perceptible. Generalmente, su concentración es reducida con respecto a su umbral de percepción (Swiegers *et al.*, 2005).

Lactonas

Los compuestos de esta familia, que presentan un anillo de lactona, se dividen en dos grupos principales: las γ -lactonas, formadas a partir de los 4-hidroxiácidos; y las δ -lactonas, derivadas de los 5-hidroxiácidos. Se producen por esterificación intramolecular entre los grupos carboxilo e hidroxilo de un ácido graso hidroxilado (Abbas, 2006). Estos metabolitos contribuyen al perfil aromático del vino con notas de fruta madura, recordando al coco, al melocotón o a la pera.

Fenoles volátiles

Estos metabolitos son producidos por la levadura durante la fermentación mediante descarboxilación de algunos ácidos, como el p-cumárico y el ferúlico,

obteniéndose en este caso respectivamente 4-vinilguaiacol y 4-vinilfenol (Swiegers *et al.*, 2005). De forma general, los fenoles volátiles pueden ser fácilmente perceptibles en el vino, porque sus umbrales de percepción son bajos, aunque su contribución no es positiva en la mayoría de los casos. Como ejemplos, destacan el 4-etilfenol y el 4-etilguaiacol, que a concentraciones elevadas hacen apreciable un aroma a establo o cuero; y, por otro lado, el 4-vinilguaiacol y el 4-vinilfenol, que dotan de esencias químicas o farmacéuticas (Swiegers *et al.*, 2005).

Compuestos azufrados

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es el principal metabolito del vino que corresponde a esta categoría, y es obtenido durante la fermentación cuando se reduce el sulfato. Por medio de las permeasas de sulfato Sul1p y Sul2p, la levadura lo incorpora y, posteriormente, es reducido a sulfito y convertido después por las subunidades Met5p y Met10p de la sulfito-reductasa en sulfuro (Spiropoulos & Bisson, 2000). Al ser un compuesto tan reactivo, puede contribuir en concentraciones elevadas con un aroma a huevo podrido muy característico.

Otros compuestos azufrados que pueden contribuir negativamente al aroma del vino son el dimetilsulfuro, el dimetildisulfuro y el dimetiltrisulfuro, que aportan olor a coliflor, ajo y col; el metilmercaptano y el metanetiol, cuya esencia recuerda a la col cocida; y algunos metilitioésteres, que le dotan de olor a cebollino, coliflor y queso fuerte. Sin embargo, otros compuestos sulfurados, como el benzotiazol o los tioles volátiles, sí que contribuyen de forma agradable al aroma del vino, con notas de fruta tropical (Swiegers & Pretorius, 2005; Swiegers *et al.*, 2005). Estos compuestos, entre los que destacan la 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, el 3-mercaptohexan-1-ol y el acetato de 3-mercaptohexilo, provienen de la uva y son liberados durante la fermentación alcohólica por mediación de las enzimas Irc7p y Str3p.

1.5. CAMBIO CLIMÁTICO EN LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

1.5.1. Cambio climático: concepto y repercusión a nivel global

El conjunto de influencias climáticas de la Tierra, entre otros muchos factores intrínsecos y extrínsecos del planeta, ha permitido el desarrollo y la evolución de infinidad de formas de vida. El clima y el tiempo han sido determinantes a lo largo de la historia de la humanidad, durante la cual se han producido notables variaciones climáticas que han conllevado alternancias de periodos más fríos y húmedos con otros más cálidos y secos (Aupí, 2014). En los últimos siglos, el aumento exponencial de la polución atmosférica desde la época de la Revolución Industrial, la creciente dependencia de combustibles fósiles, la elevada demanda de energía, la deforestación y el uso cada vez mayor de productos agroquímicos; las temperaturas atmosféricas y oceánicas promedio de la Tierra se han comenzado a ver incrementadas de forma lenta pero constante en un fenómeno conocido como “calentamiento global” (Burney *et al.*, 2013; Hannah *et al.*, 2013; Jones & Webb, 2010).

Ser conscientes de este calentamiento terrestre y de sus ya considerables impactos en la naturaleza y en la humanidad se ha convertido en algo crucial a medida que dichos efectos se vuelven más evidentes y acusados. Por ello, gran parte de la comunidad científica sustenta la teoría de que el ser humano está ejerciendo una influencia muy representativa en el cambio climático (Hannah *et al.*, 2013), y esto se va haciendo eco a nivel mundial, por lo que, desde comienzos de siglo, multitud de instituciones en muchos países piden compromiso contra el empeoramiento de la crisis climática (Mozell & Thach, 2014).

Se considera que la principal causa del calentamiento global actual es el efecto invernadero que sufre el planeta (Mozell & Thach, 2014). Los principales gases que contribuyen a su empeoramiento son el vapor de agua, el CO₂, el metano y el ozono (IPCC, 2023); y en menor medida, el hollín, el hexafluoruro de azufre, el óxido nitroso y los clorofluorocarbonos procedentes de los aerosoles (Venkataramanan *et al.*, 2020). Son diversos los factores que pueden producir un incremento en las concentraciones de estos gases. Por una parte, destacan algunos fenómenos naturales como los gases liberados directamente del centro de la Tierra por acción de los volcanes, los géiseres y las

fumarolas (Alcalde, 2022). Por otra, el factor humano también contribuye, de forma artificial, con la quema de combustibles fósiles, la deforestación generalizada, el agotamiento de fuentes naturales de carbono, la acidificación oceánica, la proliferación de vertederos y la cría de ganado vacuno y ovino a gran escala (Burney *et al.*, 2013; Hannah *et al.*, 2013).

El incremento anteriormente mencionado en la concentración de los gases de efecto invernadero, así como otras modificaciones naturales y artificiales de las características de la superficie terrestre, provocan un aumento del espesor de la atmósfera e intensifican la captura de calor reirradiado, produciendo importantes desbalances de la radiación de la Tierra (Hannah *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2005). A causa de ello, la temperatura global del planeta, cada vez más elevada, incide sobre la superficie terrestre y afecta a los casquetes polares, que van derritiéndose progresivamente y elevan poco a poco el nivel de los océanos, pudiendo éstos alcanzar subidas de nivel de hasta cinco metros (Hannah *et al.*, 2013). Este efecto no solo tiene un importante impacto en las zonas terrestres susceptibles de ser sumergidas bajo el mar, sino también en las corrientes oceánicas, grandes responsables de los patrones meteorológicos y climáticos globales (Hannah *et al.*, 2013; Tate, 2001). Estos desajustes conllevan irremediablemente alteraciones en el régimen hidrológico mundial, destacando la reducción de las precipitaciones sobre todo en áreas terrestres subtropicales y su aumento en latitudes más septentrionales y en el ecuador (Hannah *et al.*, 2013).

Este panorama presenta un efecto grave en las zonas de influencia del clima mediterráneo, entre ellas, en España, cuyos registros de la última temporada (Garrido-Pérez *et al.*, 2023; Sánchez-Benítez *et al.*, 2020) demuestran, entre otros fenómenos, temperaturas medias cada vez más elevadas con picos térmicos estivales más altos cada año y un periodo cálido anual más duradero (*World Weather Attribution*, s. f.; Sánchez-Benítez *et al.*, 2018; Peña-Ortiz, 2015). Otra de las grandes consecuencias del cambio climático en nuestro país es la disminución progresiva de las precipitaciones anuales, la cual se traduce en periodos de sequía cada vez más frecuentes y en una menor disponibilidad general de agua dulce. Este hecho es debido también al aumento en las tasas de evaporación favorecidos por el incremento de temperaturas y a la sobreexplotación humana, ganadera y agrícola de las aguas disponibles.

Numerosos estudios hablan de la alta susceptibilidad de la industria vitivinícola a los efectos del cambio climático en los ecosistemas mediterráneos (Mozell & Thach, 2014; Hannah *et al.*, 2013). En Europa, los registros históricos de cosecha y rendimiento de la viticultura europea demuestran períodos temporales con temperaturas más beneficiosas y otros con condiciones menos favorables durante la temporada de crecimiento de los cultivos. Como ejemplo, se conoce que, durante la época medieval, Europa vivió un periodo óptimo para la producción de uva y vino que duró aproximadamente desde el 900 al 1300 d.C., en el cual se plantaron viñedos hasta en las costas bálticas. Por el contrario, durante un periodo frío que abarca desde los siglos XIV al XIX, el norte de Europa vivió una extinción masiva de viñedos mientras que, en el sur, las temporadas de crecimiento se acortaban tanto que la cosecha de las uvas fue muy difícil (Jones *et al.*, 2005). Las perspectivas que ofrece el cambio climático actual de no resolverse a tiempo son poco alentadoras. Algunos estudios sugieren que para el año 2100, Estados Unidos podría perder hasta el 81% de sus viñedos de calidad (Kay, 2006). Numerosas zonas de la Europa mediterránea, especialmente Italia, Grecia, Francia y España podrían volverse bastante inhóspitas para la producción de uva hacia mediados de este siglo (Lallanilla, 2011). Algunos incluso afirman que, en nuestro país, concretamente, se podría llegar a conservar el crecimiento apto de la vid únicamente en las estrechas franjas costeras y en Sierra Nevada (Furer, 2006; Kay, 2006).

Muchos son los indicios que demuestran que España se encuentra en una zona terrestre muy susceptible al calentamiento global (Sánchez-Benítez *et al.*, 2020, 2018). En la actualidad y a corto plazo, muchas tierras de vinos, que generalmente siempre se han considerado privilegiadas para el cultivo de la vid en base a la climática vigente, pueden ver perjudicada la salud de sus viñedos tanto por las variaciones térmicas extremas como por la irregularidad del régimen hidrológico (Mira de Orduña, 2010). Esto, con el tiempo, además de cuantiosos daños en la piel de la planta y el fruto (Hannah *et al.*, 2013), puede llegar a suponer grandes pérdidas económicas y desmejoras importantes en la calidad de sus productos vínicos (Jones & Webb, 2010; Jones *et al.*, 2005).

1.5.2. Efectos del cambio climático en la vid y el vino de España

En las zonas vitivinícolas de nuestro país se ha demostrado que los efectos del aumento de la temperatura en la vid y la uva pueden tener graves consecuencias (Figura 14).

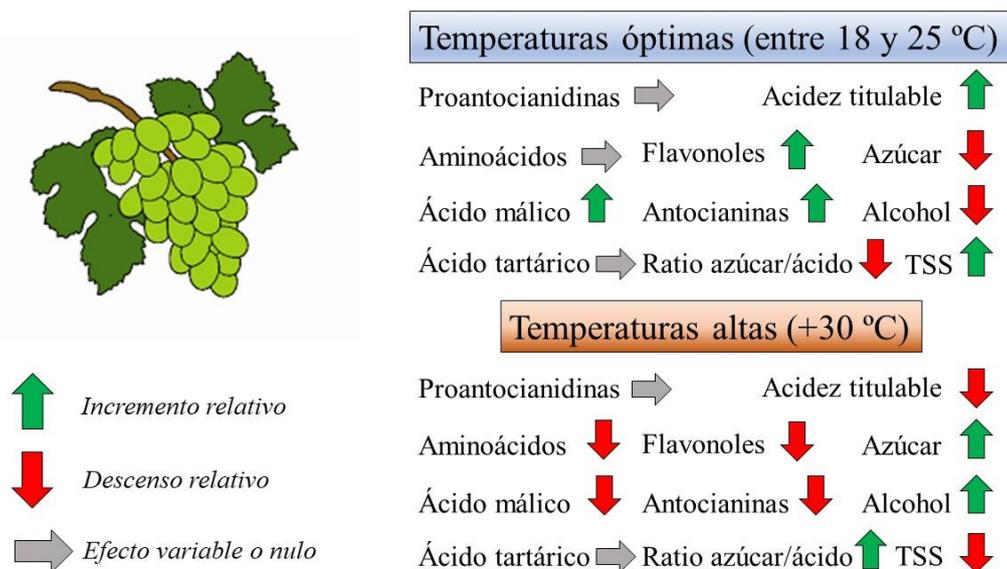


Figura 14. Sumario de los efectos del estrés por altas temperaturas en el metabolismo de la uva. Fuente: Modificación propia a partir de Venios *et al.* (2020).

La principal secuela de la mayor exposición del cultivo a temperaturas altas es una temporada de crecimiento prematura y más prolongada en el tiempo, con un aumento consecuente de la tasa metabólica de las uvas (Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2021; Venios *et al.*, 2020; García de Cortázar-Atauri *et al.*, 2017; Keller, 2011; Mira de Orduña, 2010). Esta alteración en el balance térmico anual del cultivo puede, por tanto, afectar a la maduración de la uva y a la calidad y la tipificación de la vinificación posterior (Sgubin *et al.*, 2022; Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2021; Venios *et al.*, 2020; Compés & Sotés, 2018), obteniéndose una menor cantidad de los ácidos orgánicos málico y tartárico, tan esenciales en el metabolismo de las levaduras y en la síntesis de aminoácidos (Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2021).

También resultan significativos los mayores niveles de pH por efecto del potasio, y el alto contenido en azúcares que conlleva irremediablemente un elevado grado

alcohólico en el vino (Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2021; Martínez *et al.*, 2016; Santisi, 2011; Sweetman *et al.*, 2014; Ruffner, 1982). Se ha estudiado que el sometimiento a niveles exacerbados de etanol induce la expresión de proteínas similares a las encontradas en casos de choque térmico, aumenta la tasa de mutación y desnaturalización proteica, e incrementa la fluidez de la membrana por una mayor formación de ácidos grasos insaturados y ergosterol (García-Ríos & Guillamón, 2019a, 2019b; Teixeira *et al.*, 2011).

En segundo lugar, durante la floración de la vid y el crecimiento de la uva, la incidencia excesiva de temperaturas por encima de los 30 °C puede provocar, sobre todo en el caso de las uvas tintas, un desfase entre la madurez fenólica y la acumulación de azúcares. Este desfase se explica por la necesidad de realizar la vendimia cuando ya se ha alcanzado la concentración de azúcares máxima deseada, pero resulta demasiado temprana como para que la síntesis de sustancias polifenólicas, entre ellas los flavonoides, sea suficiente para que la uva adquiera el color adecuado (Martínez *et al.*, 2016). De este modo, sustancias polifenólicas y aromáticas como las antocianinas y metoxipiracinas ven disminuida su presencia en la uva (Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2021; Venios *et al.*, 2020; Torregrosa *et al.*, 2017; Hannah *et al.*, 2013; Mira de Orduña, 2010). Por su parte, en algunos vinos blancos, el potencial aromático únicamente se expresa de forma óptima en climas templados, tras una maduración lenta y prolongada, por lo que climas excesivamente cálidos pueden conllevar características astringentes y olores desagradables en los vinos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008).

El calor fuerte también puede ser responsable de una mayor mortalidad de la uva por abscisión y la inactivación de enzimas importantes (Jones *et al.*, 2005), así como de una reducción de la tasa fotosintética a temperaturas superiores a 35 °C muy prolongadas, siendo potencialmente inhibida si éstas superan los 40 °C durante mucho tiempo (Venios *et al.*, 2020; Mira de Orduña, 2010). También se ha descrito que todos estos problemas derivados del cambio climático provocan en la vid una mayor susceptibilidad a la parasitación (Camps & Ramos, 2011).

La acción de las altas temperaturas se ve irremediablemente agravada por la consecuente irregularidad del régimen hidrológico. La falta de disponibilidad de agua en periodos importantes del crecimiento de la vid desemboca en estrés hídrico y osmótico, ya que las sales se concentran en el suelo aportando niveles de salinidad perjudiciales

para los cultivos y desagradables para el sabor del vino (Mozell *et al.*, 2014; Chaves *et al.*, 2010; Mira de Orduña *et al.*, 2010; Grimplet *et al.*, 2009; Moutinho-Pereira *et al.*, 2004). Por otra parte, se afirma que la alternancia de largos periodos de sequía con cortos periodos de lluvia más intensa (Sgubin *et al.*, 2022; Di Carlo *et al.*, 2019), tampoco favorece la absorción de agua por parte del suelo, sino las escorrentías, por lo que la vid tampoco puede aprovechar el recurso, sobre todo en viñedos sembrados en pendiente (*Climate change and wine overview – Thirty Fifty*, 2023). Con ello, el crecimiento del cultivo se ve perjudicado en tronco, ramas y hojas, al igual que la producción de uvas, cuyo peso y volumen son notablemente menores y su maduración, defectuosa, con problemas también en la multiplicación celular (Van Leeuwen & Roby, 2013; Moreno & Peinado, 2012; Van Leeuwen *et al.*, 2009; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2005).

Según autores como Schultz y Jones (2010), además de contribuir al efecto invernadero, un incremento de la concentración de CO₂ en la atmósfera, combinado con las altas temperaturas y los desajustes en la humedad relativa, también puede producir aumentos en la concentración de azúcares en la baya, favoreciendo un mayor grado alcohólico de los vinos resultantes. Los niveles de taninos de la uva también se pueden ver incrementados por un desarrollo más grueso de la piel del fruto (Tate, 2001). Por otro lado, tantas variaciones de temperatura y humedad pueden mermar la capacidad de supervivencia de los microorganismos propios de la uva y la vid por su sometimiento a condiciones de estrés, favoreciendo en su perjuicio la presencia de organismos parásitos, como hongos, bacterias o insectos. Por este motivo, la contracción de enfermedades por parte de la planta, la vulnerabilidad a plagas y otros deterioros irreversibles en la calidad de la uva pueden afectar enormemente a la industria vitivinícola (Sgubin *et al.*, 2021; Hannah *et al.*, 2013).

1.5.3. Estrategias de lucha del sector vitivinícola frente al calentamiento global

De acuerdo con el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, 2021) la temperatura media global de la superficie terrestre continuará creciendo al menos hasta mediados de este siglo si el efecto invernadero sigue el curso actual. A finales de siglo, algunos autores consideran que se alcanzará un incremento de entre 1.2 – 5.8 °C por encima de la temperatura media global vigente en la era pre-

industrial, a no ser que las emisiones de gas de efecto invernadero disminuyan de forma considerable en las próximas décadas (Sgubin *et al.*, 2021; Venios *et al.*, 2020).

Desde hace años, el sector vitivinícola mundial es consciente de dichos datos y de la importancia de combatir los efectos del cambio climático para mantener la producción de vinos de calidad. Numerosas investigaciones enfocadas en la búsqueda de estrategias abordables y respetuosas con el medio ambiente han dado como resultado diversos enfoques prácticos, tanto a nivel de cultivo como de elaboración de vino; y científicos, entre los que se encuentra la búsqueda de especies de vid y levaduras fermentadoras resistentes, y la mejora genética focalizada en ambas.

Algunas revisiones, como las llevadas a cabo por Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2021, Mirabelli-Montan *et al.*, 2021, y Hannah *et al.*, 2013, propusieron varios métodos de mitigar de forma parcial los efectos del cambio climático en la vid. A nivel de cultivo de viñedos, se describen las siguientes recomendaciones:

- Para compensar el aumento de temperaturas: Proporcionar sombra adicional, aunque de forma controlada, puesto que esto podría desmejorar la madurez cromática de la uva (Keller, 2010); y la plantación de vides con una orientación estratégica que la proteja de la radiación solar excesiva.
- Para compensar el desbalance hídrico: La reutilización, el tratamiento y el reciclaje del agua puede ayudar a reducir sus costes y su pérdida. También se propone el riego de goteo para mejorar el equilibrio de intercambio de nutrientes entre el suelo y la planta (Teixeira *et al.*, 2013). El uso de micronebulizadores puede suponer un menor derroche de recursos hídricos, y el uso de cultivos de cobertura permite disminuir la erosión y aumentar el almacenamiento de nutrientes. Regular la frecuencia de labranza es un recurso para reducir la evapotranspiración (Lereboullet *et al.*, 2013), y asumir técnicas de riego deficitario, como el secado parcial de raíces, también permite aprovechar mejor la cantidad de agua disponible (Fraga *et al.*, 2012).
- Para intentar retrasar el inicio prematuro de la etapa de maduración de la fruta y extenderlo hasta el final de la temporada de crecimiento en un periodo

térmico más fresco: tratar de aumentar la carga de cultivo de la vid y hacer un uso moderado de nutrientes nitrogenados en el viñedo.

- Para el control de plagas y enfermedades en el viñedo: Implementar un sistema de Manejo Integrado de Plagas (MIP) que integra herramientas biológicas, físicas, químicas y culturales. Esto puede adicionalmente reducir la dependencia de los agroquímicos y las emisiones nocivas. Butt & Copping, 2000, sugieren el uso de agentes de control biológico para reducir otros impactos ambientales colaterales.
- Tratar de reducir el uso general de carbono (Jones & Webb, 2010).
- Injerto o siembra completa de variedades de uva más adaptables a las nuevas condiciones climáticas y que presenten una mayor resistencia a plagas y enfermedades (Fraga *et al.*, 2012; Kirkpatrick, 2011); o cambiar de territorio los viñedos por localizaciones menos cálidas (Fraga *et al.*, 2012).

En cuanto al proceso de vinificación, se describen diversas estrategias:

- Para compensar temperaturas más altas en la bodega: Uso de equipos de enfriamiento para asegurar que se completen de forma adecuada las fermentaciones primarias y malolácticas (Mira de Orduña, 2010).
- Para reajustar los niveles altos de azúcares y etanol en vino: Técnicas reductoras de azúcar, de ultrafiltración y de ósmosis inversa. Röcker *et al.* (2016) propone en su estudio la reducción enzimática del contenido potencial de etanol en el vino.
- Para regular la acidez: Adición artificial de ácido tartárico para evitar que un pH demasiado alto provoque cambios significativos en la ecología microbiana de mostos y vinos (Mira de Orduña, 2010) y asegurar una mejor sensación en boca (Keller, 2010). Si se trata de vino blanco, dejarlo más tiempo en contacto con las lías para conservar los compuestos aromáticos, protegerlos de la oxidación y aumentar la liberación de manoproteínas.

- Para reducir el riesgo de contaminaciones microbianas: Uso de antimicrobianos y antioxidantes. La adición regulada de SO₂ es buena aliada, pero exlimitarse puede provocar un aumento considerable en la concentración de acetaldehído, desembocando en consecuencias organolépticas y sanitarias no deseables.
- Para mitigar el efecto de la quema de combustibles fósiles en la producción de electricidad: Integración de una instalación de energía solar que podría suponer un ahorro del 18% con respecto a la energía utilizada convencionalmente (Smyth & Russell, 2009); así como la instauración de un plan de seguimiento del consumo energético para optimizar recursos.
- Uso de cepas de levadura con mayor tolerancia a las concentraciones de azúcar, etanol y agentes antimicrobianos, puesto que el estrés osmótico de la levadura con respecto al azúcar puede conducir a niveles altos de acidez volátil (Mira de Orduña, 2010; Vink *et al.*, 2009).

1.5.4. Líneas de investigación en el ámbito biológico

Desde el punto de vista biológico, son numerosos los estudios científicos que revisan los mecanismos de respuesta a estrés hídrico, térmico y osmótico por parte de la vid y las levaduras fermentadoras, haciendo uso de las ya descritas ciencias ómicas (Lage *et al.*, 2019; Noti *et al.*, 2018; Picazo *et al.*, 2018; Moreno-García *et al.*, 2014; Gómez-Pastor *et al.*, 2012, 2010; O'Rourke & Herskowitz, 2004; Brosnan *et al.*, 2000). Muchos de ellos se encuentran enfocados en la problemática de los efectos del cambio climático en la vid y el vino. Por otra parte, otras vías de investigación al respecto se centran en las estrategias biológicas abordables en un escenario de calentamiento global irreversible, aunque la temática, quizás por su complejidad o por encontrarse en proceso de investigación actualmente, no se trata de forma muy amplia. Destacan mayoritariamente los siguientes campos de investigación centrados en la biología de los organismos implicados en la fermentación:

- Mejora genética de la vid y las levaduras: Demirer *et al.*, 2021; Gomès *et al.*, 2021; y Querol *et al.*, 2018, entre otros, destacan el enorme potencial de la ingeniería genética para combatir el estrés biótico y abiótico de los cultivos causado por el cambio climático, así como para la remediación y la sostenibilidad ambiental. La edición del genoma de las plantas y las levaduras aún presenta desafíos a pesar del progreso científico, por lo que se proponen opciones como el uso del genotipado de ADN de alta densidad para seleccionar genotipos con alelos específicos interesantes, la selección genómica, la inducción de mutaciones o, sobre todo, el manejo de la herramienta de edición CRISPR-Cas (CRISPR, “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” – Cas “CRISPR Associated Protein”). Todo ello busca transformar la línea germinal y mejorar genéticamente la resistencia genética al cambio climático, y con ella, la expresión proteica.
- Empleo de levaduras resistentes a los efectos del cambio climático: Por una parte, autores como Querol *et al.*, 2018, proponen en su trabajo el uso de especies de levaduras del género *Saccharomyces* diferentes a *S. cerevisiae*, como *Saccharomyces uvarum* N.-G.-B. o híbridos de *S. cerevisiae* con esa especie y también con *Saccharomyces kudriavzevii* N., que igualmente intervienen en las fermentaciones vínicas y pueden ser predominantes en determinadas regiones vitivinícolas. Algunas cepas de estas levaduras pueden presentar buenas capacidades fermentativas a bajas temperaturas, obteniéndose vinos con menor grado alcohólico y mayor contenido en glicerol, además de un buen perfil aromático en los mismos. Previamente, autores como García *et al.*, 2016, llevaron a cabo un screening de levaduras resistentes al estrés osmótico y al alto nivel de etanol en zonas de D.O. Vinos de Madrid, buscando propiedades fermentativas y cualidades organolépticas deseables en los vinos. En dicho screening, destacaron varias cepas de *S. cerevisiae* y otras especies de géneros no *Saccharomyces*, como *Lanchacea thermotolerans* K., *Torulaspora delbrueckii* L., *Schizosaccharomyces pombe* L., y *M. pulcherrima*. Posteriormente, el estudio de Benito *et al.*, 2019 también defiende la posibilidad de usar géneros diferentes a *Saccharomyces* en vinificación. En ambos estudios se aborda la preferencia de utilización de levaduras autóctonas frente a alternativas comerciales.

Sección II



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

En su gran mayoría, la comunidad científica coincide en afirmar la existencia de un calentamiento global que está comenzando a afectar a la naturaleza y a la sociedad de forma alarmante en numerosos ámbitos. La península Ibérica, y dentro de ella, España, es una de las zonas del planeta con mayor riesgo de sufrir sequías recurrentes y desertización de su superficie terrestre. Las perspectivas de progresión futura del cambio climático vigente amenazan con un grave impacto en la viticultura, conllevando notables efectos en la calidad de la uva y sus vinos. Entre otras consecuencias derivadas del estrés hídrico, térmico y osmótico, ya comienzan a ser patentes los desajustes entre la madurez tecnológica y la fenólica, algo que tiene el potencial de provocar que mostos y vinos lleguen a presentar con más frecuencia características cualitativas no deseables. Dichas características pueden ser numerosas: desde un elevado contenido de azúcares en la uva y, como consecuencia, un elevado grado alcohólico en los vinos; hasta una disminución de la acidez, fundamentalmente representada por un menor contenido en ácido málico. Los resultados de tales efectos pueden traducirse en vinos planos y frágiles, con cualidades organolépticas poco intensas o, incluso, desagradables.

Desde el punto de vista de la microbiología enológica, las variaciones debidas al cambio climático (aumento de la temperatura media, falta de recursos hídricos, etc.) pueden afectar a la composición del sustrato, a la fisiología de la uva y a las técnicas de cultivo, incrementando también la probabilidad de que se modifiquen la ecología, la biodiversidad y el metabolismo de los microorganismos presentes en la viña, la uva, el mosto y el vino. Ante tales circunstancias, es necesaria la búsqueda de soluciones para mitigar los efectos del calentamiento global. Entre ellas, la selección de levaduras fermentadoras con buena capacidad enológica en condiciones de estrés puede constituir una estrategia útil para enfrentar las condiciones adversas derivadas del cambio climático en la viticultura. Cada vez más estudios centran su investigación en el análisis ómico de diversas especies de levaduras fermentadoras, entre las que se cuentan diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, organismo modelo y convencionalmente el más empleado en fermentaciones alcohólicas de productos agroalimentarios; y otras especies de dicho

género y de géneros diferentes a *Saccharomyces*, las llamadas no-*Saccharomyces*. Un buen número de estos estudios también se enfoca en el potencial de dichas levaduras para combatir los inminentes problemas derivados al calentamiento global en la viticultura.

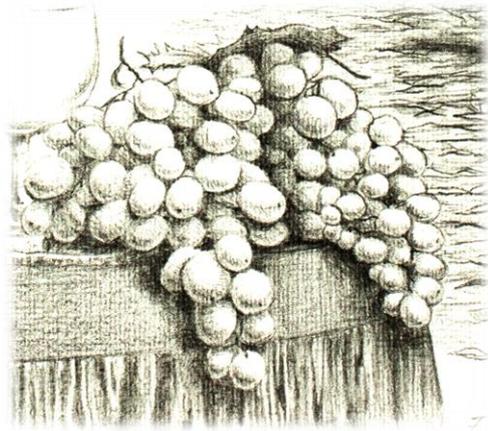
España se caracteriza por su enorme diversidad y calidad de productos vínicos. Las bodegas se enfrentan al reto de sobrellevar los efectos del cambio climático sin que ello afecte no solo a la calidad, sino a la autenticidad y a la diversidad de sus vinos, muchos de ellos sujetos a una larga tradición artesanal. Por ello, es interesante determinar la existencia de levaduras resistentes y con buena capacidad fermentativa dentro de la variedad autóctona de cada zona vitivinícola, ya que esto favorecería la preservación de las características organolépticas propias de sus productos vínicos frente a los fermentados con levaduras comerciales.

2.2. OBJETIVOS

Este proyecto de tesis surge con el objetivo de realizar un estudio proteómico de cepas de levadura silvestres con mejor capacidad enológica, que puedan aportar nuevas características e información necesarias para la adaptación de la enología al cambio climático. Asimismo, se pretende la búsqueda de potenciales parámetros indicadores basados en el estudio de los exo-metabolitos de dichas levaduras relacionados con el volatiloma y con las características organolépticas del vino. Los resultados se comparan con los obtenidos tras el análisis proteómico y metabolómico de una cepa comercial con aptitud enológica contrastada. Se pretende orientar este trabajo a la obtención de un pool de levaduras silvestres con las mejores capacidades enológicas en cada bodega y ponerlo a disposición de la industria vitivinícola en un escenario de cambio climático. Para alcanzar el objetivo general de esta tesis doctoral se han realizado las siguientes tareas:

- Analizar las variables enológicas más habituales de los vinos producidos por las cepas de levadura de estudio;
- Analizar el volatiloma de las levaduras que presenten un mejor potencial enológico y determinar el perfil odorante de los vinos fermentados por ellas;
- Analizar el proteoma de las levaduras silvestres con mejor potencial enológico en condiciones de estrés y compararlo con el de una levadura comercial.

Sección III



MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMOS

Las levaduras de estudio son cepas fermentadoras de *Saccharomyces* de la Denominación de Origen Protegida (D.O.P.) Penedès, y seleccionadas por el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias y del Instituto Catalán de la Viña y el Vino (IRTA-INCAVI) (Barcelona, España). Dichas cepas fueron escogidas mediante un proceso previo de selección, consistente en la evaluación de sus capacidades fermentativas en condiciones que se describen en el apartado 3 de esta sección. Las levaduras se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Nomenclatura de las levaduras silvestres de estudio, indicándose entre paréntesis su nombre, su especie biológica y su código de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

CEPA	ESPECIE	CECT
B1 (7F23)	<i>S. cerevisiae</i>	13179
B5 (10F1)	<i>S. paradoxus</i>	13180
B6 (10F3)	<i>S. cerevisiae</i>	13181
B8 (12F14)	<i>S. cerevisiae</i>	13182
B29 (17F10)	<i>S. cerevisiae</i>	13183

La levadura usada como control de estudio es una cepa comercial de *S. cerevisiae* denominada Lalvin Clos® (LC), de la empresa distribuidora Lallemand, y fue propuesta para este proyecto desde IRTA-INCAVI. Esta cepa presenta las siguientes características:

- Velocidad de fermentación rápida.
- Fase de latencia muy corta.
- Baja necesidad de nitrógeno.
- Buena tolerancia a la alta graduación alcohólica, tolerando hasta el 16% (v/v).
- Contribución muy baja a la acidez volátil del vino.
- Baja producción de SO₂ y alta tolerancia a este compuesto.
- Intervalo térmico de actividad entre 15 y 35 °C.

- Producción moderada de acetaldehído.

3.2. PROCEDIMIENTO GENERAL Y DISEÑO DE LA EXPERIMENTACIÓN

Desde IRTA-INCAVI se recibieron, además de las levaduras de estudio, muestras por triplicado de los resultados de las fermentaciones alcohólicas conducidas por ellas y la cepa comercial LC, así como los resultados de los análisis de algunos parámetros enológicos de dichas microvinificaciones. En ellas, se testaron dos temperaturas (18 y 25 °C) y dos concentraciones de SO₂ (0 y 75 mg/L) en mosto. La concentración de azúcar de partida fue de 250 g/L, una concentración alta en comparación con la que normalmente presentan los mostos y que se estableció como factor condicionante en todo el proyecto de tesis. Estas fermentaciones sirvieron como método de evaluación de las aptitudes de las levaduras autóctonas de la D.O.P. Penedès para fermentar a temperaturas más altas, resistir concentraciones moderadas de SO₂ y elevadas de azúcar, en un escenario similar al que acontecería por efecto del cambio climático.

En el Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología (UCO) se analizó el perfil metabolómico de las muestras. El conjunto de estas primeras experimentaciones corresponde a la obtención de los resultados expuestos en los Capítulos 1 y 2 de la Sección IV del presente trabajo.

A raíz de los resultados observados en los Capítulos 1 y 2 de dicha sección, se evaluaron la cinética de fermentación, los parámetros enológicos y el perfil odorante de nuevas microvinificaciones realizadas con mayor volumen de mosto, lo cual se llevó a cabo también en el Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología (UCO). Para ello, se seleccionaron dos de las levaduras silvestres con el objetivo de comparar sus aptitudes fermentativas con las de la levadura comercial. Esta fase de la experimentación favoreció, junto a los análisis metabolómicos y de parámetros enológicos previos, la criba de levaduras destinadas al análisis proteómico; y permitió la publicación de un artículo científico (Martín-García *et al.*, 2023), incluido en el Capítulo 3 de la Sección IV de este proyecto.

Para el estudio del proteoma se llevó a cabo, bajo criterios de eficiencia fermentativa y calidad organoléptica, una criba de levaduras potencialmente interesantes de analizar, escogiéndose una de las levaduras silvestres junto a la comercial. Se realizaron, por tanto, nuevas fermentaciones con dichas levaduras para la posterior extracción de sus fracciones proteicas en puntos estratégicos de la fermentación. Este conjunto de experimentaciones, análisis proteómicos y tratamientos bioinformáticos, contribuyentes a obtener el perfil proteómico de las levaduras escogidas, determinaron los resultados expuestos en el Capítulo 4 de la Sección IV de la presente tesis doctoral.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO Y FERMENTACIÓN

Los medios de cultivo elaborados para el desarrollo experimental de este proyecto (crecimiento, viabilidad y fermentación alcohólica) se describen en la Tabla 4:

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo utilizados en el proyecto.

Medio de cultivo	Composición	Descripción
YPD	1% (p/v) de extracto de levadura; 2% (p/v) de peptona; 2% (p/v) de glucosa.	Crecimiento de levaduras en medio líquido
YPD-agar	1% (p/v) de extracto de levadura; 2% (p/v) de peptona; 2% (p/v) de glucosa; 2% (p/v) de agar.	Aislamiento de levaduras, viabilidad
Mosto blanco pasteurizado	Contenido en azúcar: 220 y 250 g/L (empleados según el estudio); Contenido en SO ₂ : 0, 70 y 75 mg/L (empleados según el estudio); pH: 3.4 ± 0.1; AT (g ácido tartárico/L): 6.6 ± 0.1; AV (g ácido acético/L): 0.08 ± 0.01; NFA: 140 mg/L.	Fermentación alcohólica

(p/v): relación peso/volumen; AT: acidez titulable; AV: acidez volátil; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable.

Los medios para preinóculo y crecimiento de levaduras, al igual que el material de laboratorio requerido, fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 120 °C de temperatura y 1 atmósfera (atm) de presión. El preinóculo de levaduras se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 150 mL de medio YPD, y fueron incubados a 28 °C durante 48 horas a 165 revoluciones por minuto (rpm) en un agitador-incubador Infors AG (Bottmingen, Suiza).

Los mostos pasteurizados empleados en este estudio fueron suplementados por Baixas Lehnberg (Tarragona, España). La concentración inicial de azúcar del mosto (aproximadamente 192 g/L), se incrementó a partir de una solución madre altamente concentrada (750 g/L de glucosa y fructosa en concentración equimolecular previamente esterilizada en autoclave) hasta conseguir las concentraciones necesarias (220 o 250 g/L según el estudio). El resultado final se comprobó con un refractómetro Portable Meters (Hanna Instruments, San Sebastián, España), mediante los grados Brix de las muestras. Los valores obtenidos se asociaron a la concentración de azúcar correspondiente mediante una tabla de equivalencia (CEE, 1990). El SO₂ se añadió en forma de bisulfito potásico (K₂S₂O₅) y se testaron varias concentraciones, 0, 70 y 75 mg/L, según el estudio.

3.4. CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

Las poblaciones celulares obtenidas de los preinóculos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga J2-HS (Beckman Coulter, EEUU), para separarlas del medio de preinóculo. Posteriormente se resuspendieron en agua fría destilada y estéril y se volvieron a centrifugar, para realizar un lavado más depurado. Después se repitió la resuspensión y se llevó a cabo un conteo de células totales en un contador electrónico de partículas Z2 (Beckman Coulter, EE. UU.) para determinar la concentración celular. Para ello, siguiendo el protocolo de recomendaciones del fabricante, se tomó 0.1 mL de la resuspensión y se añadió a otros 39.9 mL de isotón para realizar la cuantificación por triplicado, agitando en vórtex Yellowline TTS2 (Ika Works Inc., Wilmington, Carolina del Norte, EE. UU.) durante 8 segundos antes de cada medida. Se estableció que la media de los tres resultados indicados por la pantalla del contador fuese una concentración similar. También se realizó un conteo de viables mediante diluciones decimales seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁵), se sembró 0.1 mL de la dilución adecuada en

cajas de Petri. En base a ello, se realizaron los inóculos de las levaduras en los mostos por triplicado (3 matraces por condición para cada levadura).

Para las fermentaciones correspondientes a la experimentación publicada en Martín-García *et al.*, 2023 se consideraron las siguientes condiciones experimentales, modificando la composición del mosto de partida:

- 220 g/L de azúcar inicial;
- 250 g/L de azúcar inicial;
- 250 g/L de azúcar inicial + 70 mg/L de SO₂.

Se considera que 220 g/L de azúcar inicial en el mosto equivalen a un grado alcohólico final de 12,9% (v/v) a 13% (v/v), la cual constituye una concentración normal en las condiciones climáticas típicas vigentes durante la maduración de la uva. Sin embargo, en los últimos años el aumento de las temperaturas tiende a provocar un desfase entre la maduración industrial y la maduración fenólica y aromática. Para conseguir una maduración fenólica y aromática adecuada, los enólogos suelen retrasar la vendimia, lo que da lugar a un aumento del contenido de azúcar de la uva (alrededor de 250 g/L). Esta elevada concentración de azúcar, junto con el uso de SO₂ principalmente como agente antimicrobiano, dificulta asegurar una correcta finalización de la fermentación alcohólica, hecho que determinó la selección de estos parámetros como condiciones experimentales para este proyecto.

Para las fermentaciones necesarias para llevar a cabo la experimentación correspondiente a los resultados expuestos en el Capítulo 4 de la Sección de Resultados y Discusión (IV), se redujo el número de condiciones experimentales en el mosto de partida, determinándose que fueran:

- 250 g/L de azúcar;
- 250 g/L de azúcar + 75 mg/L de SO₂.

Los inóculos en mosto se realizaron a razón de 1×10^6 células/mL, y en todos los estudios se añadió un matraz control conteniendo únicamente 150 mL de mosto sin levaduras. Antes de iniciar la fermentación, se cerraron las bocas de los matraces con

taponos de caucho perforados con una punta de pipeta P1000, para permitir la liberación de CO₂ durante la fermentación y evitar contaminaciones microbianas.

Las fermentaciones del trabajo experimental publicado en Martín-García *et al.*, 2023 (Sección IV, Capítulo 3), se llevaron a cabo a una temperatura de 22 °C y sin agitación. En las realizadas para la posterior obtención de extractos proteicos (Sección IV, Capítulo 4), la temperatura de fermentación fue de 18 ± 0.2 °C con agitación suave (16 ± 1 U/min) para favorecer una fermentación óptima y rápida de los vinos blancos, y se realizó en un baño termostatzado Unitronic 320 OR (Selecta, Barcelona, España) con dedo frío acoplado Refriger-Frigedor -20 °C (Selecta) (Figuras 15a y 15b). En ambas etapas de estudio, se seleccionaron únicamente para evaluación las condiciones de estrés por alto contenido en azúcar y presencia de SO₂.



Figura 15. 15a: Sistema de baño termostatzado con dedo frío acoplado; **15b:** Mostos en fermentación.

Para la extracción de fracciones proteicas, fueron tres los tiempos de muestreo escogidos para detener la fermentación:

- Tiempo 0 (T0): Consistente en tomar las células de levadura recién inoculadas en mosto, implicando un 0% (v/v) de etanol, como condición control para el análisis proteómico. En los matraces destinados a este punto de control no se añadió SO₂ a los matraces, ya que no iba a resultar necesario al no dar lugar al comienzo de la fermentación.
- Tiempo 1 (T1): Tomando las levaduras pasadas 12 horas desde el inicio de la fermentación. Se ha descrito que, aproximadamente, en este tiempo, se

produce una expresión de proteínas elevada coincidente con el punto álgido de la fase exponencial (Ghaemmaghami *et al.*, 2013; Salvadó *et al.*, 2008).

- Tiempo 2 (T2): Presentándose aproximadamente un 7% (v/v) de etanol. En este tiempo se considera que la fermentación ya alcanza la mitad del proceso.

Una vez alcanzado el grado alcohólico determinado de cada punto de muestreo, se vertió el volumen total de cada matraz de fermentación en 3 tubos Falcon de 50 mL de capacidad, seleccionándose así tres réplicas analíticas, y se centrifugaron en una centrífuga Rotina 38R (Kirchlengern, Alemania) durante 10 minutos a 4 °C y a 4600 rpm para separar las levaduras del medio, realizar un conteo de células viables y totales, y comenzar la extracción de proteínas.

Todo el procedimiento se realizó en esterilidad usando una cabina de flujo laminar MH-100 (TelStar, Terrasa, Barcelona). La preservación y mantenimiento de pellets de células de levadura se realizó en congeladores a -80 °C (con glicerol al 20%) y muestras de vinificaciones previo su procesamiento en congeladores a -20 °C.

3.5. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN Y ESTIMACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO

La cinética de fermentación se realizó midiendo la pérdida de peso en gramos (g) de los matraces debida a la liberación de CO₂ durante el proceso fermentativo, siguiendo el procedimiento de Bely *et al.* (1990) y Sablayrolles *et al.* (1987), y comparando el balance de masa del matraz control. En el proceso fermentativo realizado para la experiencia descrita en Martín-García *et al.*, 2023, los puntos de muestreo se realizaron cada 24 horas, y la fermentación se consideró finalizada cuando dejaron de observarse pérdidas en el peso de los matraces durante 48 horas seguidas, contando también con el dato de peso diario del matraz control. Los valores de cinética de fermentación se obtuvieron por representación de la pérdida de peso por unidad de tiempo durante el tiempo total transcurrido.

Para determinar una estimación aproximada del grado alcohólico alcanzado en cada matraz durante las fermentaciones destinadas al estudio proteómico, se emplearon

las mismas medidas de pérdida de peso de los matraces reflejando la formación de CO₂ gas (Figuras 16a y 16b), usando la siguiente fórmula para relacionar ambos parámetros (Ansanay *et al.*, 2001; El Haloui *et al.*, 1988):

$$\% \text{ EtOH (v/v)} = (0,94 * \text{g/L CO}_2 \text{ desprendido} + 2,7) / 7,89$$

Las medidas en este caso se realizaron cada hora durante 12 horas diarias en el tiempo transcurrido hasta alcanzar el T2 de muestreo.



Figura 16. 16a: Mosto al inicio del proceso fermentativo; **16b:** Mosto con burbujas y turbidez por crecimiento de levaduras fermentadoras, indicativo de la transformación de azúcar en etanol y gas CO₂.

3.6. ANÁLISIS DE PARÁMETROS ENOLÓGICOS

Los valores de pH, acidez titulable, acidez volátil, grado alcohólico, nitrógeno fácilmente asimilable, ácido málico y azúcares residuales se determinaron siguiendo los métodos oficiales de la CEE (OIV, 2022). Los valores de pH y de acidez titulable se determinaron utilizando un pHmetro GLP 21+ (Crison, Barcelona, España). Para obtener los datos de acidez volátil y grado alcohólico se empleó un destilador DE-1626 (P Selecta). El kit enzimático con L-malato deshidrogenasa (L-MDH) y glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT) Enzytec (R-Biopharm AG, Alemania) se utilizó para determinar los valores de ácido málico. Los niveles de nitrógeno fácilmente asimilable se

obtuvieron empleando el método de ensayo espectrofotométrico de oftaldialdehído/N-acetil-L-cisteína (NOPA) ya descrito en Shively & Henick-Kling (2001). En todos estos análisis se procesaron tres réplicas biológicas.

3.7. ANÁLISIS METABOLÓMICO

Los compuestos volátiles o aromáticos del vino se clasifican en: mayoritarios, si su concentración en la muestra es generalmente mayor o igual a 10 mg/L; y minoritarios, si es inferior a esta concentración. La identificación y cuantificación de los compuestos del aroma fueron desarrolladas con ayuda de soluciones estándar de compuestos puro de grado analítico, adquiridos de Sigma-Aldrich, Merck y Fluka. El agua pura fue obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore). Para la determinación del nivel medio de dichos compuestos en cada muestra se evaluaron tres réplicas biológicas.

3.7.1. Determinación de compuestos volátiles mayoritarios

El equipo empleado para este fin fue un cromatógrafo de gases HP 6890 Series II (Palo Alto, California, EE. UU.) equipado con una columna capilar de sílice fundida CP-WAX 57 CB (50 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.4 μm de espesor de película) de Varian (Palo Alto, California, EE. UU.) y un detector FID (Figura 17).



Figura 17. Equipo GC-FID empleado para la detección de compuestos mayoritarios.

Las muestras se procesaron por el método de inyección directa de la muestra empleando las condiciones cromatográficas descritas por Peinado *et al.* (2004), utilizando una disolución de 1 g/L de 4-metil-2-pentanol en etanol puro como patrón interno de medida. El análisis se llevó a cabo estableciendo un programa de procesamiento de dos etapas: la primera, a 50 °C durante 15 minutos; la segunda, elevando la temperatura hasta 190 °C a 4 °C/min durante 35 minutos. La cinética de flujo del gas portador (helio) se mantuvo durante 16 minutos a 0.7 mL/min y posteriormente se elevó a 1.1 mL/min durante 52 minutos. La temperatura del FID fue de 300 °C. Posteriormente se estableció un programa de purga durante 35 minutos a 200 °C y una velocidad de flujo del gas portador de 1.5 mL/min. Para proceder a la identificación y cuantificación de metabolitos mayoritarios se emplearon las rectas de calibrado obtenidas con disoluciones patrón de concentración conocida analizadas previamente en condiciones iguales a la muestra.

3.7.2. Determinación de compuestos volátiles minoritarios

Estos compuestos fueron identificados y cuantificados en un proceso denominado SBSE-TD-GC-MS (“Stir Bar Sorptive Extraction – Thermal Desorption – Gas Chromatography – Mass Spectrometry”) que consta de dos fases, tal y como describen López de Lerma *et al.* (2018). La primera fase se caracteriza por una extracción de los compuestos volátiles de las muestras diluidas al 10% con etanol al 12% (v/v) en una solución de 10 mL de volumen total tamponada a pH 3.5. En dicha solución se incluyeron 0.1 mL de patrón interno, consistente en nonanoato de etilo concentrado al 0.4464 mg/L. La extracción se llevó a cabo en viales, mediante el uso de imanes Twister (0.5 mm de ancho de película, 10 mm de longitud, de Gerstel-GmbH, Mülheim an der Ruhr, Alemania) recubiertos con polidimetilsiloxano (PDMS). Después de 100 minutos de agitación a 1500 rpm en un equipo Variomag Multipoint 15, de Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, Massachusetts, EE. UU.); los Twister se retiraron, se limpiaron con agua destilada, se secaron y se insertaron en un tubo de desorción térmica (TDU, “Thermal desorption unit”) para su análisis cromatográfico.



Figura 18. Equipo GC-MS empleado para la detección de compuestos volátiles minoritarios.

La segunda fase consiste en la determinación de compuestos volátiles en un equipo GC-MS (GC: Agilent-7890A, Agilent Technologies, EE. UU.; MS: MSD 5975, Agilent Technologies) con acople de sistema de termodesorción Gerstel TDS 2 (Figura 18). Los tubos de desorción conteniendo los Twister siguieron el programa que se detalla a continuación: La desorción inicial fue a 35 °C con un incremento térmico de 120 °C/min hasta los 280 °C. Esta temperatura se mantuvo durante 10 minutos. Durante el proceso, el flujo de helio como gas portador fue de 3 mL/min. El adsorbente permaneció a 25 °C durante la desorción y, posteriormente, se sometió a una rampa de incremento térmico de 12 °C/seg hasta los 280 °C. Esta temperatura se alcanzó para liberar los compuestos volátiles en un sistema de enfriamiento CIS 4 PTV (Agilent Technologies) programado a 25 °C, el cuál contenía un tubo de adsorción Tenax. Por último, el CIS fue calentado para liberar los compuestos volátiles minoritarios en el GC-MS equipado con una columna capilar Agilent-19091S (30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 μ m de ancho de película). El detector de masas trabaja en modo escaneo a 1850 eV y evalúa la masa desde 39 a 300 m/z.

3.7.3. Cálculo de series aromáticas

Los valores de actividad odorante (VAO) de los compuestos aromáticos fueron obtenidos como resultado de la ratio entre concentración de compuesto y el umbral de percepción odorante. Una serie aromática comprende los compuestos volátiles con descriptores aromáticos similares, y su valor total es representado por la suma total de los VAOs de los compuestos volátiles que la integran. La Tabla 5 muestra las series que describen las cualidades aromáticas de los vinos obtenidos, así como los compuestos que contribuyen, interaccionando entre ellos, a cada serie y sus concentraciones umbral de percepción odorante. En este proyecto se establecen 13 series aromáticas: Químico, Cítrico, Cremoso, Floral, Frutal, Verde, Fruta verde, Herbáceo, Dulce, Ahumado, Especiado, Meloso (miel) y Ceroso (aroma dulzón similar al de la cera de abeja). Un compuesto aromático puede pertenecer a más de una serie en función de sus descriptores.

Tabla 5. Series aromáticas establecidas para describir el perfil odorante de los vinos de estudio, compuestos que contribuyen a ellas y sus umbrales de percepción ($\mu\text{g/L}$).

Serie aromática / compuesto contribuyente	UP ($\mu\text{g/L}$)	Serie aromática / compuesto contribuyente	UP ($\mu\text{g/L}$)
Frutal		Cítrico	
Benzaldehído	350	2-etil-1-hexanol	8*
4-metilbenzaldehído	350	6-metil-5-hepten-2-ona	50
Benzotiazol	80	Limoneno	10
Propanoato de etilo	10	Linalool	6
Butanoato de etilo	20	Octanal	2.5
2-metilbutanoato de etilo	18	Nonanal	2.5
3-metilbutanoato de etilo	3	Decanal	1.25
Hexanoato de etilo	14	Ceroso	
Heptanoato de etilo	2.2	1-octanol	800
Octanoato de etilo	5	Octanoato de etilo	5
3-hidroxi octanoato de etilo	200	Decanal	1.25
Decanoato de etilo	200	1-decanol	400
3-hidroxidodecanoato de etilo	200	Dodecanol	1*
Succinato de dietilo	200*	Decanoato de etilo	200
Acetato de hexilo	670	Dodecanoato de etilo	500
Acetato de isoamilo	30	Feniletihexanoato de etilo	250
γ -nonalactona	30	Hexadecanoato de etilo	2*
δ -undecalactona	12		

UP: umbral de percepción; *: unidades en mg/L.

Tabla 5. (Continuación). Series aromáticas establecidas para describir el perfil odorante de los vinos de estudio, compuestos que contribuyen a ellas y sus umbrales de percepción ($\mu\text{g/L}$).

Serie aromática / compuesto contribuyente	UP ($\mu\text{g/L}$)	Serie aromática / compuesto contribuyente	UP ($\mu\text{g/L}$)
Fruta verde		Graso	
2-metilbutanoato de etilo	18	2-etil-1-hexanol	8000
3-metilbutanoato de etilo	3	Ácido octanoico	500
Hexanoato de etilo	14	1-decanol	400
Feniletihexanoato de etilo	250	Ácido decanoico	1000
Heptanoato de etilo	2.2	Especiado	
Acetato de hexilo	670	γ -valerolactona	10
Acetato de Z-3-hexenol	400	4-metilbenzaldehído	350
Verde		Meloso	
Acetaldehído	110*	Acetato de 2-feniletanol	250
Fenilacetaldehído	4	Fenilacetaldehído	4
Hexanol	8000*	Fenilacetato de etilo	250
Heptanal	3	Herbáceo	
6-metil-5-hepten-2-ona	50	β -damascenona	7
Acetato de Z-3-hexenol	400	β -farneseno	20
β -farneseno	20	β -ionona	0.07
E-nerolidol	700	γ -valerolactona	10
Cremoso		Floral	
Acetofina	150*	Linalool	6
2,3-butanodiol (levo)	668*	Fenilacetato de etilo	250
2,3-butanodiol (meso)	668*	Acetato de 2-feniletanol	250
γ -butirolactona	35*	Vitispirano	800
γ -crotonolactona	35*	β -damascenona	7
γ -nonalactona	30	Geranil acetona	60
δ -undecalactona	12	β -ionona	0.07
Químico		E-nerolidol	700
Acetaldehído	110*	Feniletihexanoato de etilo	250
Acetato de etilo	7.5*	E-metil dihidrojasmonato	70
Isobutanol	40*	Z-dihidrofarnesol	20
Metanol	668*	Farnesol 3	20
Propanol	830*	2-feniletanol	10*
Alcoholes isoamílicos	30*	Benzotiazol	80
Limoneno	10	Ahumado	
Guaiacol	75	4-hidroxi-butanoato de etilo	1*
4-vinilfenol	180	2-metoxi-4-vinilfenol	40
		Isopentilsuccinato de etilo	200*
		Guaiacol	75

UP: umbral de percepción; *: unidades en mg/L.

3.8. ANÁLISIS PROTEÓMICO

3.8.1. Lisis celular, solubilización de proteínas y limpieza de extractos proteicos

Tras la obtención de pellets de levaduras, se realizó un proceso de lisis celular y solubilización de proteínas, siguiendo el procedimiento optimizado por el área de Microbiología (Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología de la UCO). Inicialmente se resuspendieron los pellets en tampón de extracción (TE) hasta un volumen final de 1 mL. La composición del TE es: 100 mM Tris-HCl a pH 8.0, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 2 mM ditiotreitól (DTT), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), y 1 pastilla de cóctel de proteasas (Roche, Suiza); todo ello en agua milli-Q ultrapura. Los tubos eppendorf con las muestras en TE se mantuvieron en hielo para evitar la degradación biológica, y las células fueron lisadas con perlas de vidrio (Sigma, 500 μm de diámetro) añadidas en igual proporción al volumen de las muestras. Para cada una se llevaron a cabo 10 ciclos de 1 minuto de agitación en Vibrogen Cell Mill V6 (Edmund Bühler, Alemania) (Figura 19a) y 1 minuto en hielo.



Figura 19. 19a: Agitador Vibrogen; 19b: Secador de vacío SpeedVac.

El siguiente paso fue centrifugar a 7000 rpm durante 10 min a 4 °C en centrífuga de tubos eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para recoger el sobrenadante y desechar el debris y las perlas de vidrio. Los sobrenadantes se centrifugaron a 16000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. De este proceso se extrajeron de nuevo los sobrenadantes, donde se encontraba la fracción de proteínas solubles.

Para realizar la limpieza de extractos proteicos, se llevó a cabo una sonicación de los sobrenadantes en baño sonicador Ultrasons (Selecta) y, posteriormente, se les añadió mezcla de ácido tricloroacético (TCA, trichloroacetic acid) al 10% con acetona y DTT al 0.07% en proporción 1:4 con los sobrenadantes. Este proceso permitió precipitar y concentrar las proteínas durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se procedió a su descongelación y un centrifugado a 16000 rpm durante 40 minutos a 4 °C. Tras esto, los pellets se lavaron con mezcla de acetona-DTT (0.07%) agitando suavemente y enfriando 30 minutos a -20 °C. Después se realizó una centrifugación a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C para separar los pellets de la mezcla de acetona-DTT, y se repitió todo el proceso de lavado. El siguiente paso fue secar los pellets durante 10 minutos en un secador de vacío SpeedVac Concentrator 5301 (Eppendorf) (Figura 19b) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los pellets secos se mezclaron con 500 µL de tampón de solubilización (TS), cuya composición es la que se detalla: Urea 8M, tiourea 2M y detergente CHAPS [(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato al 2%. Este procedimiento se sometió a 4 ciclos de 1 minuto en agitación con vórtex y 1 minuto en hielo, y a continuación se dejaron los tubos eppendorf con las muestras en un agitador Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Alemania) a 4 °C para disolver totalmente los pellets en el tampón. Finalmente, se realizó una última centrifugación de 16000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se retiró el pellet y se procedió a cuantificar la proteína de los sobrenadantes.

3.8.2. Determinación de la cantidad de proteínas en los extractos

Para cuantificar la concentración de proteínas se usó el Método de Bradford (Bradford, 1976). El reactivo Bradford (Sigma) se diluyó en TS. La recta patrón se conformó con diluciones estándares (SD, “standard dilution”) de seroalbúmina bovina (BSA, “bovine serum albumin”) al 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 µg/µL. El procesado de las muestras se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro de 1 mL de volumen total, usando como blanco la mezcla de 25 µL de TS y 750 µL de reactivo Bradford. Las muestras se trataron realizando una combinación similar, siendo ésta de 25 µL de muestra y 750 µL del reactivo, y se determinó un tiempo de reacción de 10 minutos en oscuridad. Para la medición de absorbancias se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS DU 640 (Beckman Coulter) (Figura 20), aplicando longitud de onda (λ) de 595 nm y luz visible.



Figura 20. Espectrofotómetro UV-VIS.

3.8.3. Separación y determinación de proteínas

Las muestras de proteínas fueron enviadas a las instalaciones de proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, y su procesamiento se llevó a cabo siguiendo la metodología de Izquierdo-González *et al.* (2019). Los extractos de proteínas se limpiaron en SDS-PAGE 1D al 10% de poliacrilamida. Posteriormente, las muestras se cargaron en gel de apilamiento y se aplicaron 100 V hasta que el frente de electroforesis alcanzó el gel de resolución. Después de que el extracto de proteína se separase 1 cm en gel de resolución, se dio por finalizada la electroforesis y el gel se tiñó con Commasie Blue. Las bandas de proteína se cortaron en cubitos y se mantuvieron en agua hasta comenzar el proceso de digestión. En este proceder, las bandas de proteínas se tiñeron primero en bicarbonato de amonio (AB) 200 mM/acetoneitrilo al 50% durante 15 min y 5 min en acetoneitrilo al 100 %. La proteína se redujo mediante la adición de ditiotreitól 20 mM en AB 25 mM y se incubó durante 20 minutos a 55 °C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, seguido de la alquilación de los tioles libres mediante la adición de yodoacetamida 40 mM en BA 25 mM en oscuridad durante 20 minutos. Después, las bandas de proteínas se lavaron dos veces en AB 25 mM. La digestión proteolítica se realizó mediante la adición de tripsina (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU), 12,5 ng/uL de enzima en AB 25 mM y se procedió a una incubación a 37 °C durante la noche. La digestión de proteínas se detuvo mediante la

adición de ácido trifluoroacético a una concentración final del 1%. Las muestras de digestión se secaron en SpeedVac.

La nano LC se realizó en Dionex Ultimate 3000 nano UPLC (Thermo Scientific, Alemania) con una columna Acclaim Pepmap C18 de 75 μm x 50 (Thermo Scientific). Anteriormente, la mezcla de péptidos se cargó en una precolumna Acclaim Pepmap de 300 μm x 5 mm (Thermo Scientific) en acetonitrilo al 2%/TFA al 0.05% durante 5 min a 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. La separación de péptidos se realizó a 40°C para todos los ensayos. El tampón de fase móvil A estaba compuesto de agua y ácido fórmico al 0,1%. La fase móvil B estaba compuesta por 20% de acetonitrilo y 0,1% de ácido fórmico. Las muestras se separaron a 300 nl/min . La fase móvil B aumenta a 4-45 % B durante 60 minutos; 45-90% B durante 1 minuto, seguido de un lavado de 5 minutos al 90% B y un reequilibrio de 15 min al 4 % B. El tiempo total de cromatografía fue de 85 minutos.

Los cationes peptídicos eluidos se convirtieron en iones en estado gaseoso mediante ionización por nanoelectropulverización y se analizaron en un Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific). El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo positivo. Se realizaron exploraciones de estudio de precursores de péptidos de 400 a 1500 m/z con una resolución de 120 K (a 200 m/z) con un objetivo de recuento de iones de 5×10^5 . La MS en tándem se realizó mediante aislamiento a 1 Th con el cuadrupolo, fragmentación CID con energía de colisión normalizada de 35 y análisis de MS de barrido rápido en la trampa de iones. El objetivo del recuento de iones de AGC se estableció en 102 y el tiempo máximo de inyección fue de 75 milisegundos. Solo se tomaron muestras para MS2 de aquellos precursores con estados de carga 2 a 5. La duración de la exclusión dinámica se estableció en 15 segundos con una tolerancia de 10 partes por millón (ppm) alrededor del precursor seleccionado y sus isótopos. Se activó la selección de precursores monoisotópicos. El instrumento se ejecutó en modo de velocidad máxima con ciclos de 3 segundos, por lo que implicaría el instrumento realizase continuamente eventos MS2 hasta que la lista de precursores no excluidos disminuyese a cero o 3 segundos, lo que fuese más corto.

3.9. BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS

Para identificar los metabolitos volátiles, se compararon sus espectros de masas y sus tiempos de retención con los de compuestos puros de la colección de patrones del grupo de investigación Vitenol (AGR-146) de la Universidad de Córdoba. Estos patrones fueron inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras tratadas, y sus tiempos de retención sirvieron como comparativa para los de las muestras, usándose la biblioteca de espectros de masas Wiley 7N. La cuantificación fue posible gracias al uso de curvas de calibración de los patrones con concentraciones conocidas en las mismas condiciones de estudio. Todo ello se realizó utilizando Chemstation (Agilent Technologies) y Maestro (Gerstel) como *software*.

Los datos brutos de proteómica fueron procesados a través del *software* Proteome Discoverer (versión 2.1.0.81, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) y la búsqueda de los espectros MS/MS se realizó con el motor de búsqueda Sequest en la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Con el objetivo de un enfoque mayor dentro del proteoma, se llevó a cabo una selección de las proteínas involucradas en la respuesta celular a estrés osmótico y oxidativo. Para ello, de acuerdo con los términos de ontología de genes (GO, “Gene ontology” – Terms), se hizo uso de la sección de ontología genética de la base de datos del genoma de *Saccharomyces* (SGD, “*Saccharomyces* genome database”) (<http://www.yeastgenome.org>) y Uniprot.

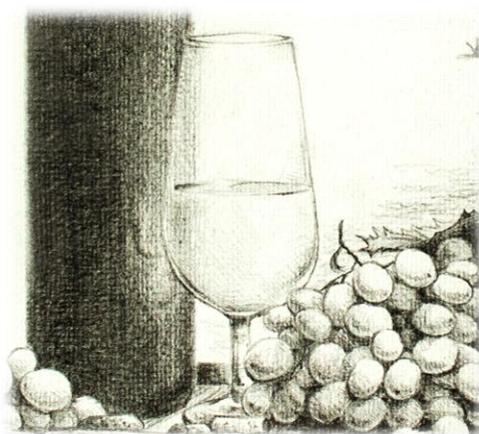
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos relacionados con el metaboloma y los parámetros enológicos consistieron en análisis multivariantes de la varianza (MANOVA) para evaluar las diferencias en dichos parámetros, los compuestos volátiles y las series aromáticas de los vinos obtenidos por cada levadura y cada condición. Los grupos homogéneos (HG) se establecieron mediante prueba de Fisher a un nivel de significación $p\text{-value} \leq 0.05$. Se representaron también huellas dactilares de los vinos obtenidas por análisis multivariante usando las series aromáticas, para comparar diferencias organolépticas entre los vinos obtenidos. Estas huellas se utilizaron también para desarrollar un análisis cluster y un análisis de componentes principales (PCA, “Principal

Component Analysis”) que contribuyeran a una mayor diferenciación de los vinos según las levaduras y las condiciones de estudio. Para tales fines, se empleó el programa de software estadístico Statgraphics Centurion XVI versión 16.2.04 (versión 2, Scientific Time Sharing Corporation (STSC), Rockville, Maryland, EEUU).

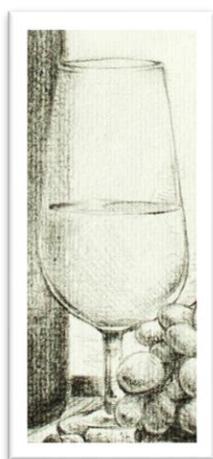
En cuanto a los análisis estadísticos del perfil proteómico, se solicitó la colaboración de la Unidad de Bioinformática (SCAI-UCO). Inicialmente se realizó una normalización de los valores obtenidos de las proteínas, dividiendo cada uno por la intensidad global de la muestra y luego multiplicando por el valor medio de intensidades globales de todas las muestras. Posteriormente, se realizó un filtrado de proteínas válidas para estudio, es decir, por un lado, de aquellas presentes al menos en dos replicados de tres muestras; y por otro, en al menos dos replicados en una muestra. Esto se realizó a partir de los datos crudos de identificación y cuantificación de proteínas, llevando a cabo un filtrado de contaminantes y proteínas de baja confianza (Raw 2017, al menos un péptido único; q -value <0.01 , al menos un valor de cuantificación válido). A continuación, para ambos ficheros se calculó el valor medio de intensidad dentro de cada muestra. La evaluación cualitativa del estudio proteómico se llevó a cabo mediante la biblioteca “UpsetR” de R®, y se representaron las proteínas encontradas en, al menos, 2 de los 3 replicados de, al menos, una muestra en plots de intersección. Para la evaluación cuantitativa, se elaboró un mapa de calor (heatmap) para representar las proteínas más comunes (presentes en todas las muestras o al menos en 2 de los 3 replicados de todas las muestras), así como un análisis de agrupamientos jerárquicos (clusters) por patrones de intensidad para aquellas proteínas presentes en todas las muestras. Para este análisis, las proteínas identificadas solo en una réplica biológica y los artefactos se eliminaron del recuento general. Se procedió también a realizar un análisis ANOVA con corrección de testeo múltiple del q -value, con un post-hoc Tukey y su correspondiente filtro por q -value (q -value <0.05 y <0.01), usando Statgraphics Centurion XVI como herramienta de software. Con las proteínas filtradas, se elaboró un análisis de correlación (datos estandarizados y tipificados), representado en huellas dactilares, para valorar las diferencias significativas en la expresión proteica de las levaduras de respuesta a estrés, las cuales fueron sesgadas por GO-terms referentes a estrés osmótico y oxidativo.

Sección IV



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS



CAPÍTULO I

ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS ENOLÓGICOS Y DEL PERFIL AROMÁTICO DE LOS VINOS DE CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SILVESTRES Y UNA CEPA COMERCIAL CON BUENA APTITUD ENOLÓGICA FRENTE A LOS EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO

4.1. RESULTADOS. CAPÍTULO 1.

4.1.1. Parámetros enológicos

Diversos parámetros enológicos fueron analizados en las muestras de vino resultantes de las fermentaciones llevadas a cabo con las levaduras de estudio en IRTA-INCAVI. Los resultados de dichos análisis, presentados en las Tablas A1-A4 (Sección VII, Anexo I) y comparados mediante un estudio MANOVA (Tabla A5, Anexo I), fueron considerados como parte de los criterios de selección de levaduras para el presente proyecto.

Con la excepción del pH, en niveles de normalidad y muy similares en todas las muestras y condiciones (3.3 ± 0.2), los parámetros enológicos evaluados reflejaron diferencias significativas debidas a la levadura y, en menor medida, a la temperatura de fermentación. No se observó, sin embargo, un efecto significativo de la presencia del SO_2 en ninguno de los parámetros evaluados.

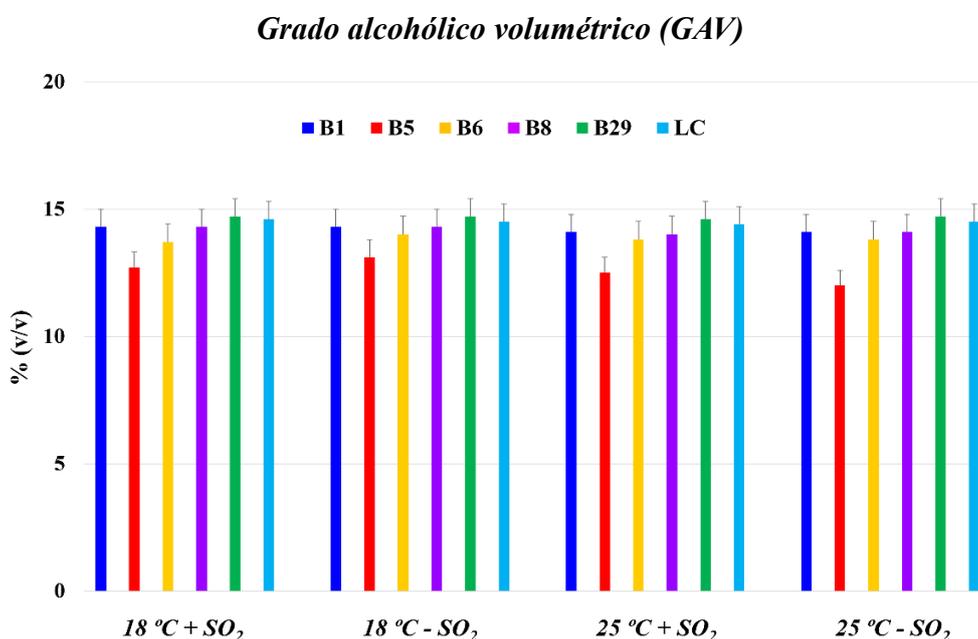


Figura 21. Niveles (% v/v) de etanol cuantificados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO_2 ”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO_2 ; “- SO_2 ”: vinos obtenidos de mostos sin SO_2 .

El grado alcohólico volumétrico (GAV) de los vinos (Figura 21) fue el único parámetro, junto con el pH, que no mostró dependencia de la temperatura, y fue la cepa

B5 la que presentó vinos con menor porcentaje (v/v) de etanol. Es importante considerar la variabilidad en las tasas de conversión de azúcares en etanol de cada cepa, aunque generalmente se afirma que por cada 17 g/L de azúcar se produce un 1% (v/v) de etanol (Moreno & Peinado, 2012).

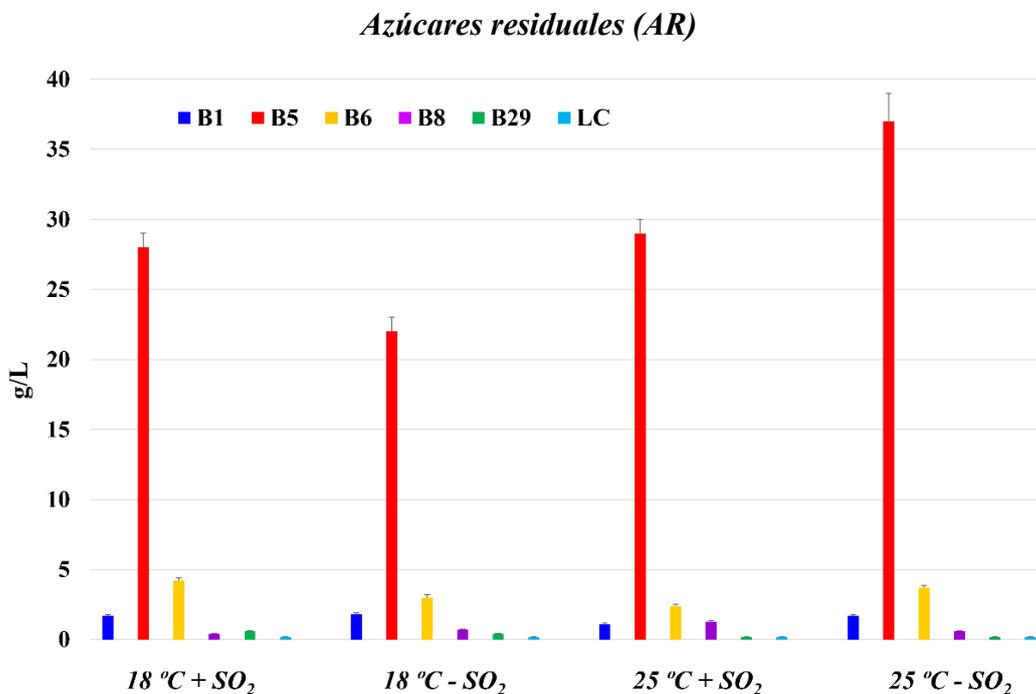


Figura 22. Niveles (g/L) de azúcares residuales de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

Una de las diferencias más apreciables dentro de los datos apreciables en la Figura 22 es el alto nivel de azúcares residuales (AR) en las muestras de vino fermentado por la cepa B5 (Tablas A1-A4, Anexo I), lo cual indica una fermentación incompleta por parte de esta levadura. Este hecho se corresponde directamente con el menor GAV obtenido en sus vinos (Figura 21). En el resto de los mostos fermentados por otras cepas, los niveles de AR fueron inferiores a 4 g/L, considerándose, por tanto, vinos secos. Cabe destacar que la cepa B29 y la levadura comercial LC presentaron los vinos con menor contenido en AR y un mayor grado alcohólico. La temperatura también afectó, de forma irregular, a estos niveles, vislumbrándose mayores en los vinos de B5 a 25 °C.

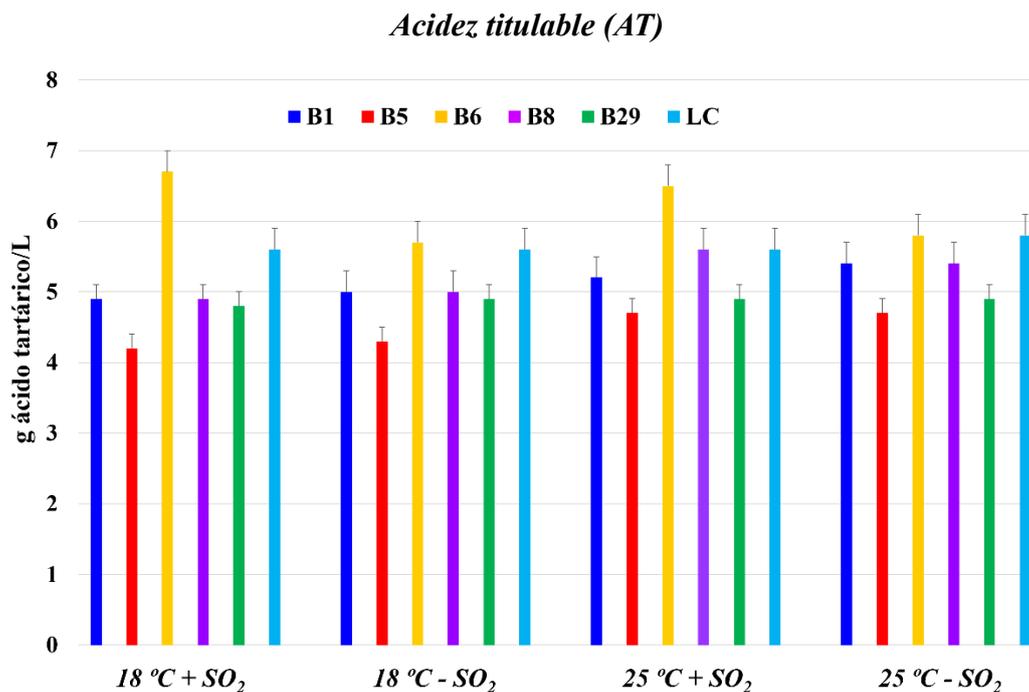


Figura 23. Niveles (g ácido tartárico/L) de acidez titulable de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

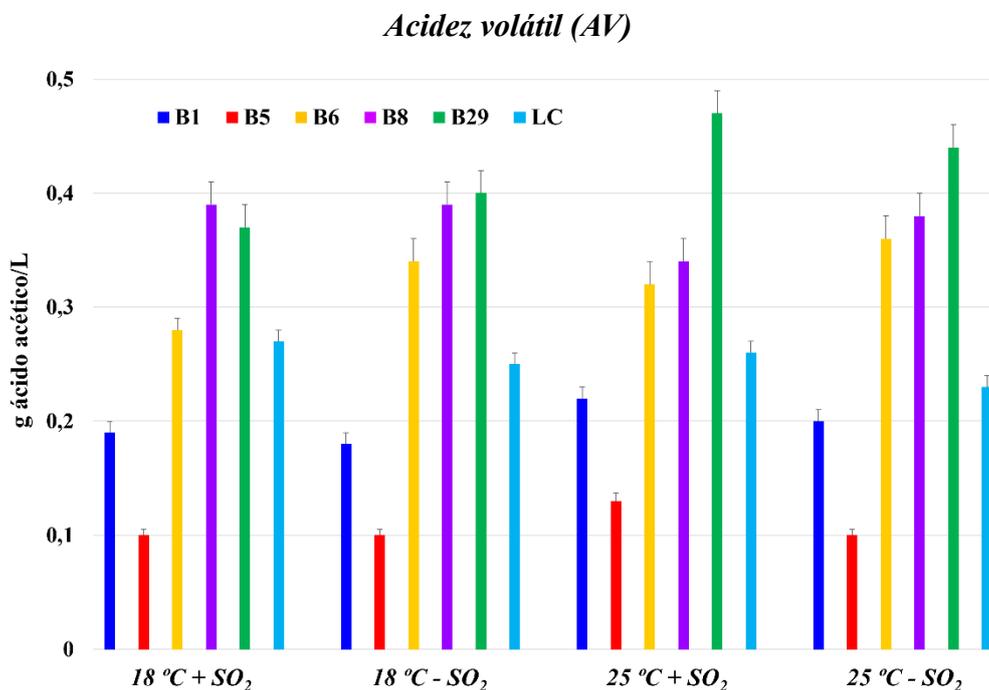


Figura 24. Niveles (g ácido acético/L) de acidez volátil de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

Ácido málico

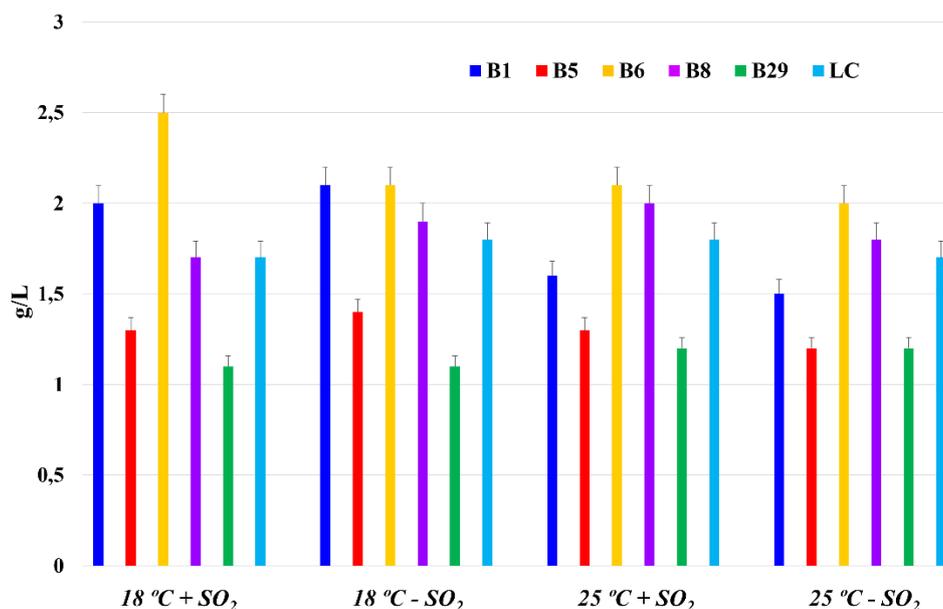


Figura 25. Niveles (g/L) de ácido málico de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA)

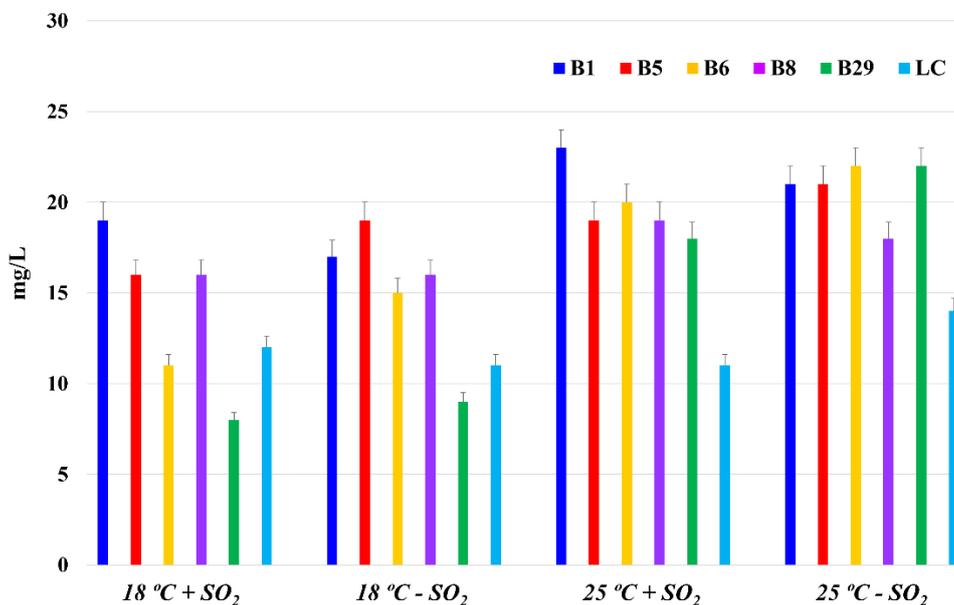


Figura 26. Niveles (mg/L) de nitrógeno fácilmente asimilable de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

Los valores de acidez titulable (AT), correspondientes a g de ácido tartárico/L

(Figura 23); y de acidez volátil, cuantificados como g de ácido acético/L (Figura 24), al igual que en el caso del pH, resultaron normales en todas las muestras fermentadas, aunque son apreciables las diferencias debidas a la cepa de levadura. Los vinos fermentados con B6 reflejaron los los niveles más altos de AT, y los obtenidos con B29 mostraron los valores más elevados de AV, mientras que la cepa B5 presentó los vinos con los niveles más bajos de ambos tipos de acidez. La temperatura también influyó en los valores de AT y AV, incrementándose éstos, de forma leve pero general, a 25 °C. Du *et al.* (2022), en su trabajo, destacan también los aumentos en los niveles de ácido acético a mayor temperatura. Con respecto a los contenidos en ácido málico (Figura 25), la levadura B6 fue la que determinó vinos con los niveles más altos, y B29, los de valores más reducidos. La temperatura, aunque resultó influyente, no presentó un patrón de influencia común a todas las cepas. Por último, la cantidad de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) (Figura 26) en las muestras fue el parámetro que mayor influencia mostró de la temperatura, observándose niveles generalmente más altos al haber sido fermentadas a 25 °C, y siendo los vinos de la levadura B29 los que presentaron una diferencia mayor debida a este factor.

4.1.2. Compuestos volátiles

Un total de 66 compuestos volátiles fueron detectados en las muestras de vino y agrupados en 9 familias químicas, siendo los alcoholes, los compuestos carbonílicos, las lactonas y los ésteres los que presentaban los mayores contenidos en las muestras (Tablas A6-A25, Anexo I). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en trabajos de otros autores como Dumitriu *et al.* (2020). La influencia de la temperatura de fermentación, de la presencia o ausencia de SO₂ en el mosto de partida, y de la cepa de levadura empleada para llevar a cabo el proceso fueron evaluadas mediante un análisis multivariante de la varianza (MANOVA) de los contenidos de los compuestos volátiles detectados, y los resultados se representan en las Tablas A26 y A27 (Anexo I).

Los datos ofrecidos por dicho análisis ponen de manifiesto la influencia de la cepa de levadura en el perfil metabolómico de los vinos resultantes, determinándose diferencias significativas en la práctica totalidad de compuestos volátiles. De este modo, el contenido total de todas las familias químicas establecidas se vio fuertemente condicionado por la cepa empleada. El efecto de la temperatura de fermentación también

resultó significativo para la mayoría de compuestos evaluados. Por último, aunque la presencia o la ausencia de SO₂ en mosto determinó diferencias más leves en las familias químicas, no afectando al contenido total de terpenoides, ácidos grasos y compuestos sulfurados, resultó llamativo su efecto en varios de los compuestos mayoritarios analizados. Este efecto, así como los de la levadura y la temperatura sobre los niveles detectados de los compuestos mayoritarios se comentan en mayor extensión en el Capítulo 2 de la Sección de Resultados (IV).

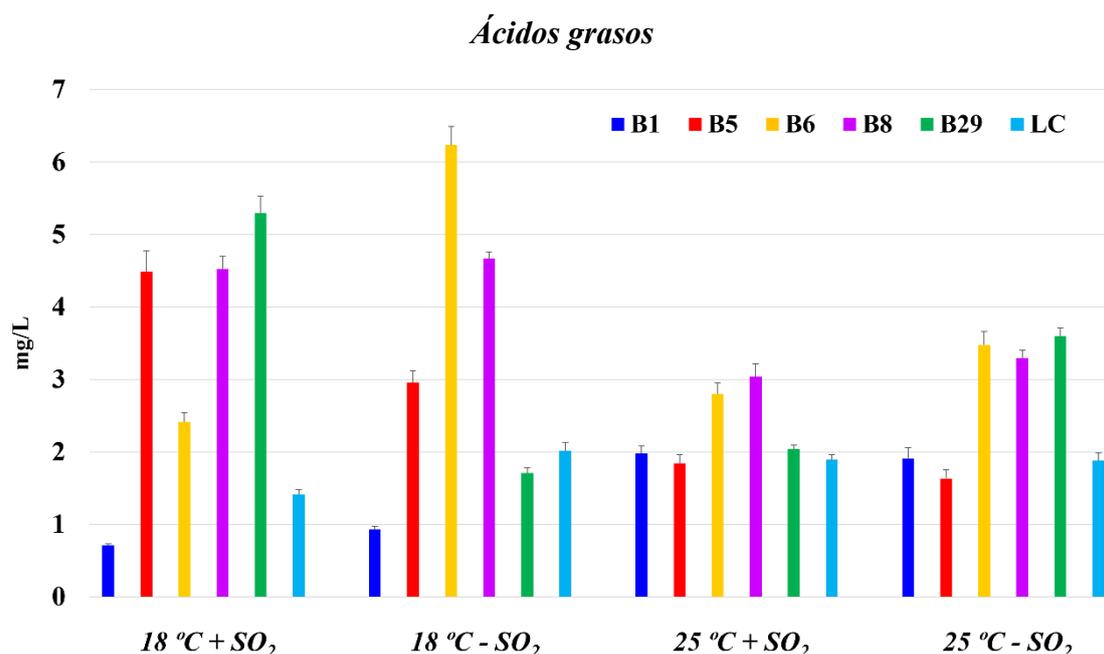


Figura 27. Niveles (mg/L) de ácidos grasos detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

La Figura 27 representa el contenido promedio de ácidos grasos obtenido en las diferentes muestras de vino para cada condición de fermentación. Por los niveles en los que fue detectado (Tablas A6-A9, Anexo I), el ácido octanoico resultó ser el mayor contribuyente al contenido total de ácidos grasos en las muestras. Como previamente se describe, estos niveles dependieron en buena parte de las levaduras (Tabla A26, Anexo I), de cuyo metabolismo de ácidos siendo B6, B8 y B29, generalmente, las que mostraron un mayor contenido promedio, y las cepas B1 y LC, las que presentaron cantidades menores. Con respecto a la temperatura de fermentación, se observaron tanto incrementos (B1) como descensos (B5, B6, B8 y B29) en la concentración media de ácidos grasos a mayor temperatura (25 °C), aunque, de forma general, el contenido de ácidos grasos fue

mayor a 18 °C. Autores como Deed *et al.* (2017) obtuvieron en sus estudios resultados similares en cuanto a la influencia de la temperatura en el contenido de ácidos grasos, siendo estos mayores a temperatura de fermentación más baja. Finalmente, la presencia de SO₂ no influyó en los niveles de esta familia química.

El contenido en alcoholes (Figura 28), incluyendo el de los dos isómeros del 2,3-butanodiol (poliol), mostró dependencia de la cepa utilizada, la temperatura de fermentación y el empleo de SO₂, aunque, como puede observarse en la Tabla A26, Anexo I, esta dependencia del SO₂ está favorecida por la influencia de este compuesto en los niveles de la mayoría de alcoholes mayoritarios.

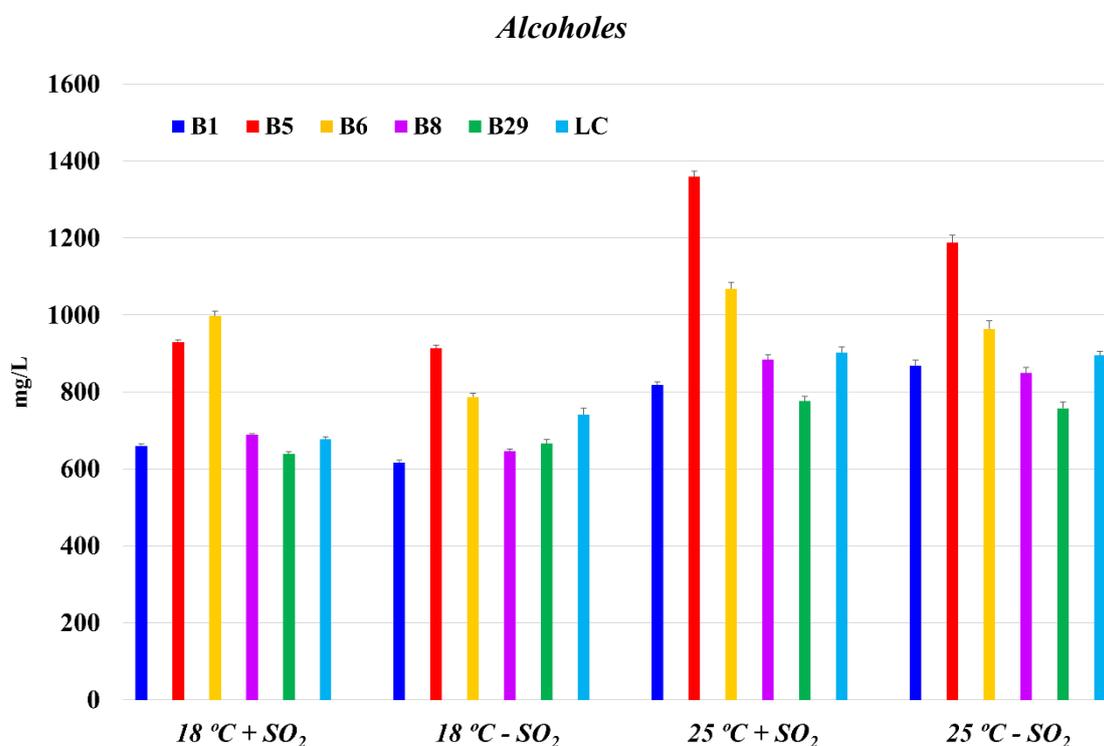


Figura 28. Niveles (mg/L) de alcoholes detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

Así, en la Figura 28 se muestra que el mayor contenido general en alcoholes fue detectado en los vinos fermentados por B5 y B6, además de un incremento claro de la concentración total de alcoholes a mayor temperatura (25 °C). Autores como Du *et al.*, (2022) y Molina *et al.* (2007) hacen referencia en sus estudios a la relación de una temperatura de fermentación alta con la mayor formación de alcoholes. Por otra parte, el

efecto del SO₂ no mostró una tendencia clara, salvo en los vinos de algunas cepas (B5, B6 y B8), donde se observa un incremento de los niveles de alcoholes en presencia de este compuesto.

Entre los 15 tipos de alcoholes detectados en las muestras, el contenido del isómero *levo* del 2,3-butanodiol resultó, en todos los casos, el más elevado, no presentando influencia del SO₂ pero sí reflejándose diferencias significativas influidas por la temperatura de fermentación y por la cepa de levadura. La cuantificación de los niveles del isómero *meso* del 2,3-butanodiol también mostró las mismas tendencias que en el caso de su isómero *levo*.

Los alcoholes isoamílicos, por su parte, presentaron el contenido más elevado de los alcoholes superiores, resultando sus niveles dependientes de la cepa de levadura, de la temperatura y del SO₂, al igual que los del 2-feniletanol.

Las concentraciones de 2-metoxi-4-vinilfenol mostraron un descenso notable a temperatura más alta, y fue la LC la que determinó niveles de este compuesto diferencialmente más elevados que el resto de las cepas, seguida de la B29. Los niveles de 4-vinilfenol resultaron no dependientes de otros factores distintos a la cepa de levadura.

En total, 22 ésteres fueron detectados en las muestras de vino, de los cuales, 5 son acetatos y 17, ésteres etílicos. De forma general, solo la subfamilia de los acetatos mostró dependencia de las tres condiciones testadas (Tabla A27, Anexo I).

Los niveles promedios de acetatos, representados en la Figura 29, mostraron influencia de las tres condiciones experimentales. La levadura B5 determinó los contenidos más bajos en todos los casos, y la cepa B6 fue la que fermentó los vinos más ricos en acetatos.

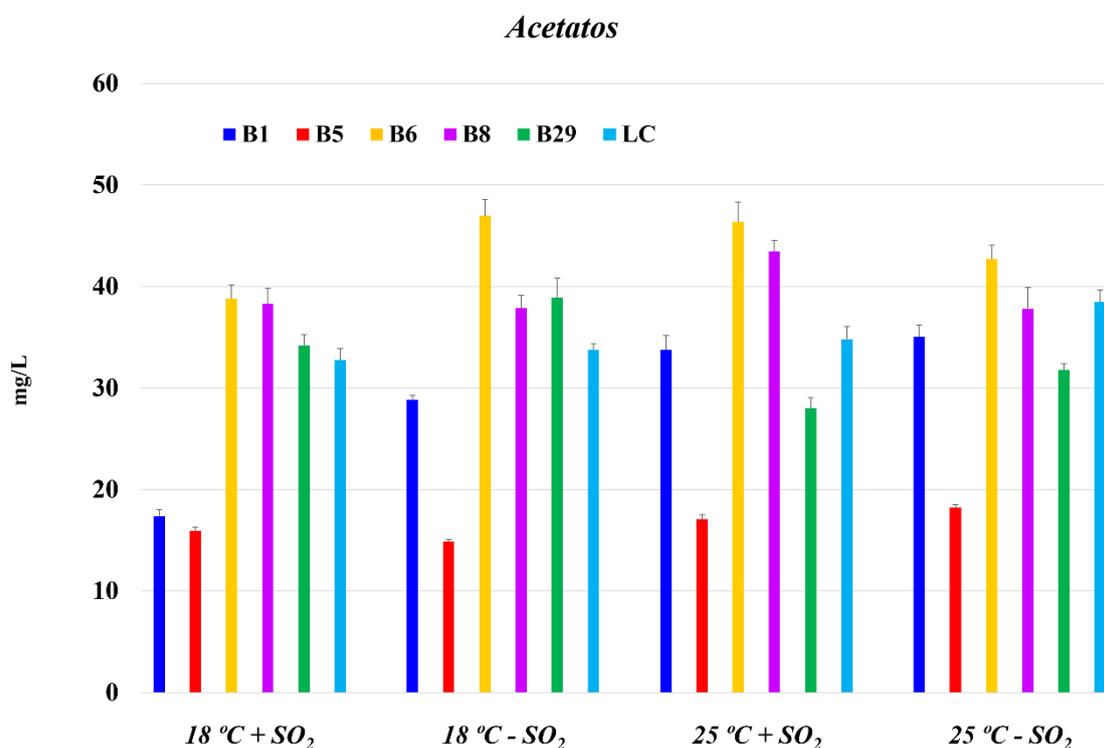


Figura 29. Niveles (mg/L) de acetatos detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

La temperatura de fermentación más alta (25 °C) supuso, de forma general pero poco específica, un incremento en los contenidos de esta familia química, algo que se manifestó mayormente en los vinos fermentados por B1. Esta tendencia poco clara también está descrita por autores como Deed *et al.* (2017) en los resultados de sus estudios. El efecto del SO₂, sin embargo, no ofreció una tendencia clara, aunque en los vinos fermentados por B1 y B29 sí que se vislumbra un ligero descenso de los niveles de acetatos en presencia de este compuesto. De entre los 5 acetatos detectados, el de etilo fue el que presentó los contenidos más elevados, seguido de los acetatos de isoamilo y de 2-feniletanol (Tablas A14-A17, Anexo I). El acetato de etilo, además de mostrar dependencia de la levadura y la temperatura, presentó también, junto al acetato de 2-feniletanol, influencia de la presencia de SO₂ (Tabla A27, Anexo I), aunque, en ambos casos, con tendencias dispares dependiendo de la levadura fermentadora. En cuanto al acetato de 2-feniletanol, se observó un aumento de sus niveles condicionado por la temperatura de fermentación de 25 °C, al igual que en el caso del contenido general de acetatos. La cepa B29 fue la que obtuvo niveles más bajos de este compuesto, en contraposición con B8, que obtuvo los más bajos. La influencia de la levadura en el

acetato de isoamilo resultó igualmente significativa, siendo los vinos de la cepa B8 los que presentaron el mayor contenido en este compuesto, y los fermentados por B5 determinaron las concentraciones más bajas.

De los ésteres etílicos obtenidos (Tablas A10-A13, Anexo I), cuyos niveles promedios se representan en la Figura 30, destacó con diferencia por su contenido el succinato de dietilo, compuesto mayoritario, mostrando diferencias debidas a la levadura, algo común a todos los ésteres; y al SO₂. Debido al elevado contenido de succinato de dietilo con respecto a otros ésteres etílicos, el nulo efecto de la temperatura sobre este compuesto conllevó que, en el estudio estadístico, no se reflejaran diferencias debidas a este factor en las concentraciones totales de esta familia química (Tabla A26, Anexo I). Sin embargo, salvo en el caso del succinato de dietilo, los niveles de los ésteres detectados sí mostraron el efecto de la temperatura. Lo contrario sucede con el SO₂, ya que, aparte de al succinato de dietilo, este afectó al contenido de pocos ésteres etílicos (butanoato, decanoato, 3-hidroxidodecanoato y fenilacetato de etilo), pero sí resultó influyente en el contenido total de la familia química.

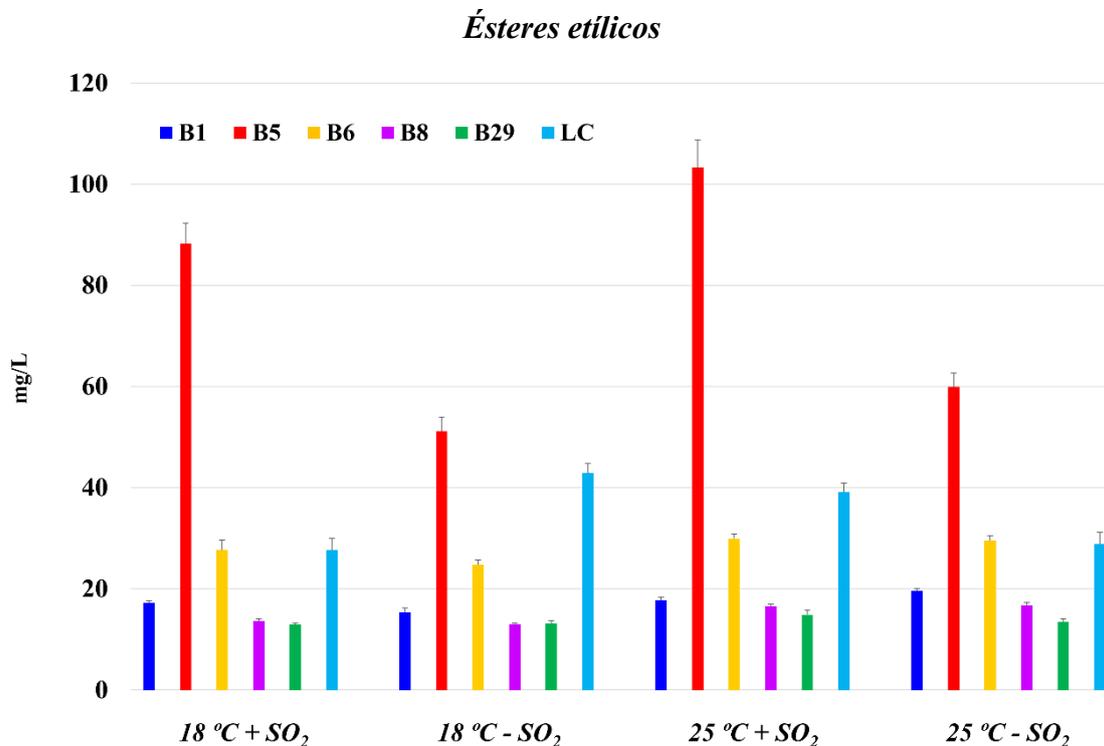


Figura 30. Niveles (mg/L) de ésteres etílicos detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

Como se observa en la Figura 30, las levaduras B8 y B29 fueron las que conllevaron menor cantidad total de ésteres etílicos en sus vinos, mientras la cepa B5 reflejó los mayores niveles, incrementando en presencia de SO₂.

En cuanto a otros ésteres etílicos, como el butanoato y el hexanoato, la cepa B1 influyó en la obtención de las concentraciones de butanoato y hexanoato más bajas. Por otro lado, las cepas B29 y LC fermentaron los vinos con las mayores concentraciones promedias. Salvo en el caso de las obtenidas con la cepa B1, el resto de las muestras fermentadas a 25 °C pareció mostrar un descenso en los niveles de butanoato y hexanoato debido a la temperatura, un hecho descrito en los resultados de otros estudios como Du *et al.* (2022). Con respecto al octanoato de etilo, las concentraciones más altas se obtuvieron en los vinos de la cepa LC. De nuevo, B1 determinó los contenidos medios más reducidos, y en sus vinos se observó, una vez más, un resultado contrario al resto de muestras, siendo menores los niveles de octanoato en las fermentaciones a 25 °C. Esta reducción en la producción de ésteres etílicos a temperatura alta ha sido también descrita previamente por autores como Lu *et al.* (2017).

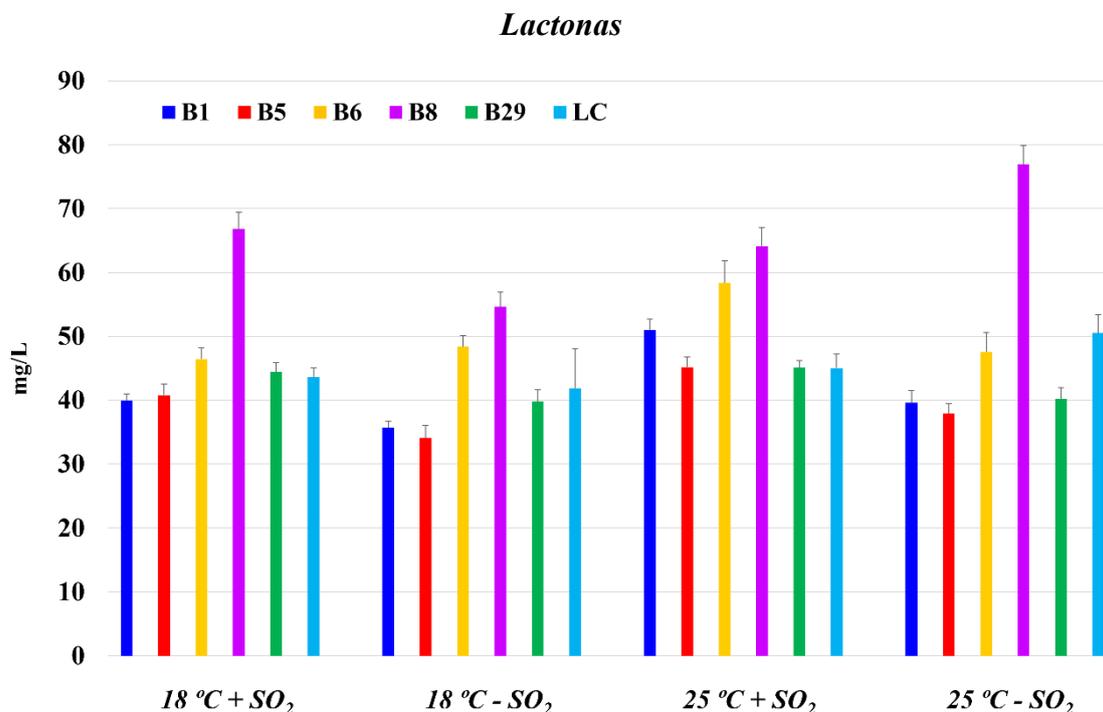


Figura 31. Niveles (mg/L) de lactonas detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

Las lactonas, representadas en la Figura 31, se encontraron, casi en su totalidad, representadas por los altos niveles hallados de γ -crotonolactona y γ -butirolactona (Tablas A14-A17, Anexo I). En general, los niveles de las lactonas mostraron dependencia de la presencia de SO_2 , de la temperatura de fermentación y de la levadura empleada (Tabla A27, Anexo I). En este caso, la cepa B5 determinó los niveles más bajos de lactonas y la B8, los más altos. Precisamente, los altos niveles obtenidos por esta cepa a 25 °C favorecieron la existencia de diferencias significativas debidas a la temperatura en el contenido total de lactonas. La γ -crotonolactona, que suele detectarse en abundancia con respecto a otros compuestos volátiles, presenta un umbral de percepción elevado (Tabla 5, Sección III), por lo que no siempre se asegura su contribución al aroma final de los vinos. El patrón de influencia del SO_2 en los niveles de γ -crotonolactona resultó irregular, viéndose solo en algunos casos aumentados (vinos obtenidos con B1, B5 y B29) en su presencia. Atendiendo a la γ -valerolactona, la mayor concentración media se observó en las muestras fermentadas por B8, con tendencia a aumentar a mayor temperatura y en ausencia de SO_2 , salvo en las muestras obtenidas con B1.

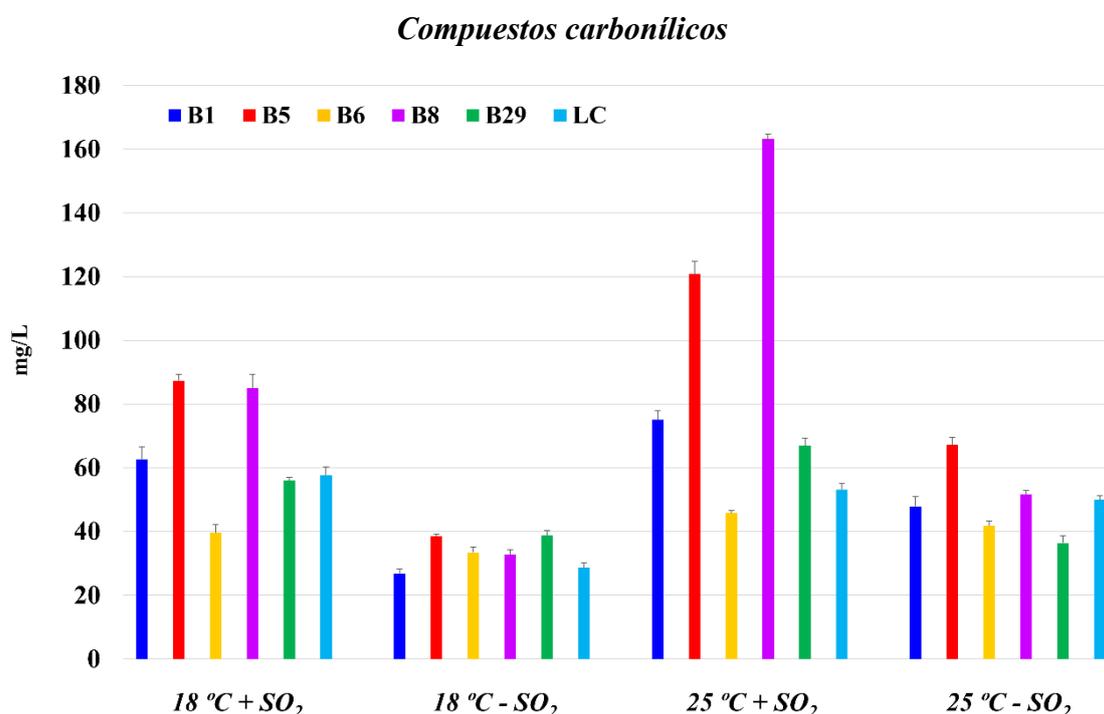


Figura 32. Niveles (mg/L) de compuestos carbonílicos detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO_2 ”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO_2 ; “- SO_2 ”: vinos obtenidos de mostos sin SO_2 .

Los niveles totales de compuestos carbonílicos (Figura 32), donde se agrupan aldehídos y cetonas, mostraron dependencia de la levadura, la temperatura y la presencia de SO₂ (Tabla A27, Anexo I). De entre los compuestos carbonílicos, el acetaldehído y la acetoína, al ser compuestos mayoritarios, fueron los que se detectaron en mayores cantidades, seguidos del benzaldehído y del 4-metilbenzaldehído (Tablas A18-A21, Anexo I). El acetaldehído, el fenilacetaldehído y la acetoína mostraron dependencia de los tres factores de estudio, condicionando así los niveles generales observados de compuestos carbonílicos, ya que ni la temperatura ni el SO₂ afectaron a buena parte del resto de componentes de esta familia química. En la Figura 32, se aprecia como las cepas B5 y B8 mostraron los niveles más altos de compuestos carbonílicos, sobre todo en presencia de SO₂. También es visible un ligero aumento de sus niveles a mayor temperatura (25 °C).

Los nor-isoprenoides (Figura 33) tampoco ofrecieron diferencias significativas debidas a la temperatura, pero sí con respecto a la levadura y al empleo del SO₂ (Tabla A27, Anexo I).

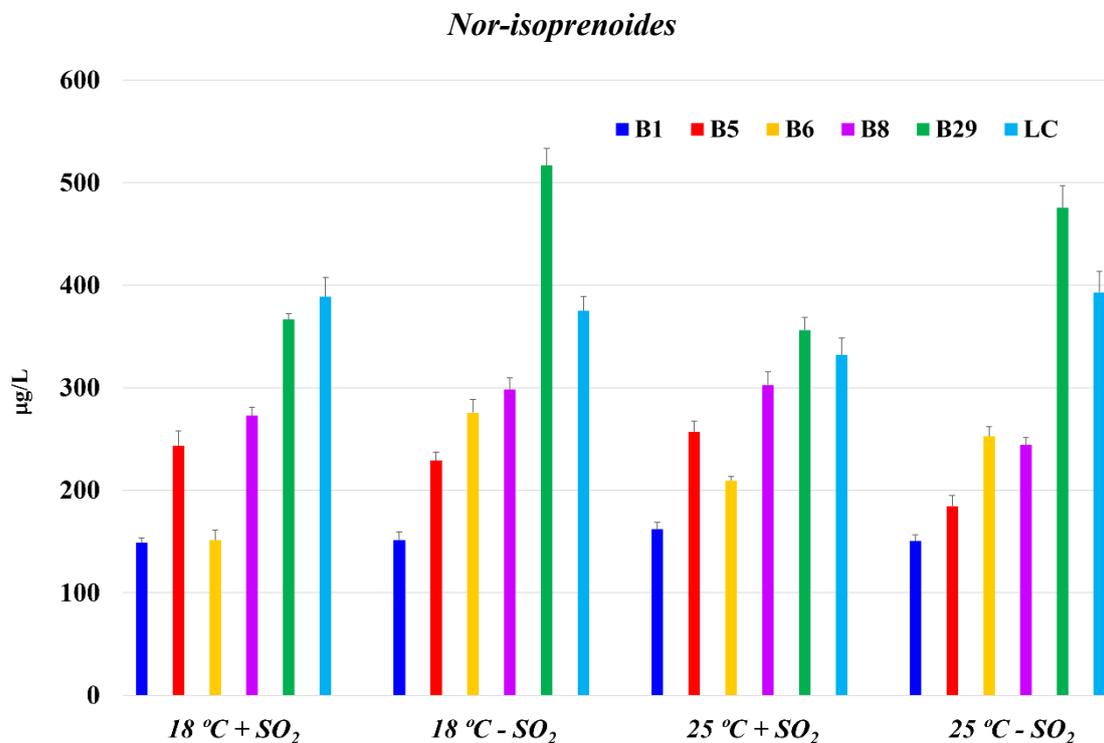


Figura 33. Niveles (µg/L) de nor-isoprenoides detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

La β -damascenona resultó ser el mayor representante de estos compuestos debido a los altos niveles detectados (Tablas A22-A25, Anexo I), y fue la cepa B29 la que fermentó las muestras con mayor contenido en este compuesto, mientras que en las de B1 se detectaron los niveles más reducidos, lo que condicionó directamente el nivel total de nor-isoprenoides. Las diferencias debidas a la presencia de SO_2 , sin embargo, no ofrecieron ningún patrón común a todas las experiencias, aunque se vislumbra un descenso del nivel de nor-isoprenoides en los vinos obtenidos con las cepas B6 y B29. En cuanto a la β -ionona, el segundo compuesto detectado en mayor cantidad de esta familia, fue nuevamente la levadura B29 la que determinó los niveles medios más altos. El vitispirano fue el único compuesto de esta familia afectado por los tres factores de estudio.

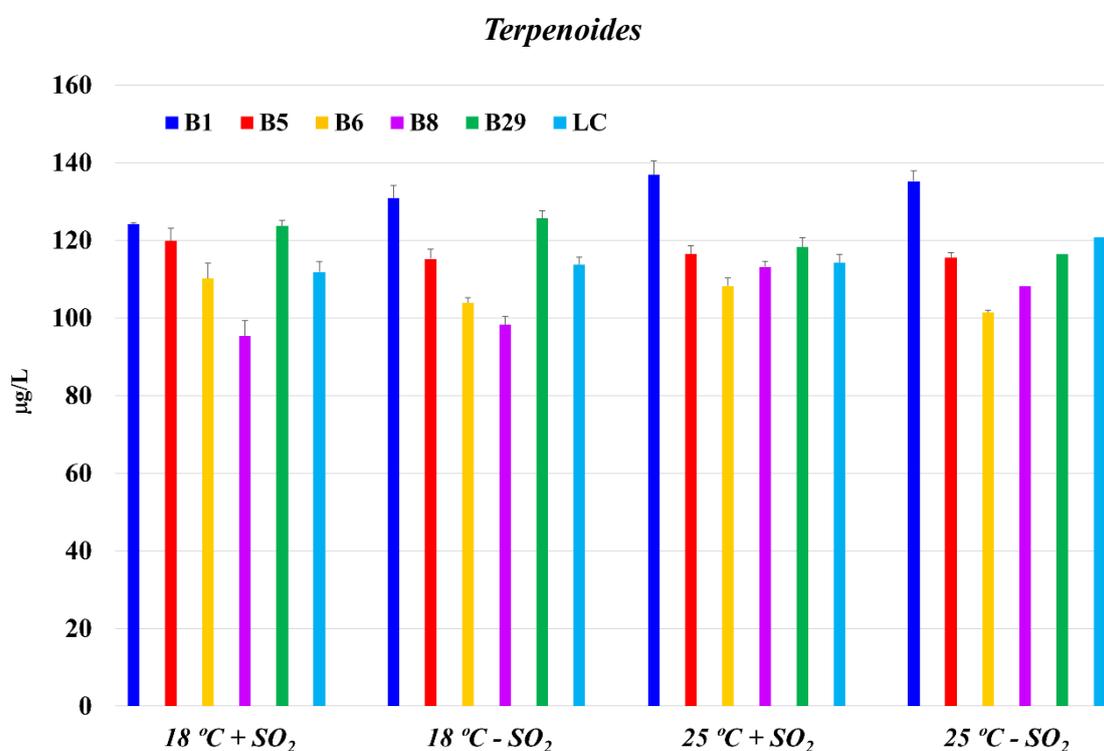


Figura 34. Niveles ($\mu\text{g/L}$) de terpenoides detectados en los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO_2 ”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO_2 ; “- SO_2 ”: vinos obtenidos de mostos sin SO_2 .

El contenido total de terpenoides (Figura 34) en las muestras reflejó la influencia de la levadura utilizada, con diferencias sin un patrón específico debidas a la temperatura de fermentación y un nulo efecto del SO_2 (Tabla A27, Anexo I). La cepa B1 fue, generalmente, la que fermentó vinos más ricos en terpenoides, y la B8, la que obtuvo

vinos con un contenido más reducido. El limoneno resultó ser el compuesto más representativo, presentando los mayores niveles en los vinos fermentados por la cepa B1, pero ninguna diferencia debida a la temperatura o al SO₂.

Por último, los niveles de benzotiazol, el único compuesto sulfurado detectado en las muestras, reflejaron diferencias debidas a la levadura, siendo más elevados en las muestras de B6; y a la temperatura de fermentación, aumentando generalmente a 25 °C sin ser una tendencia común a todas las cepas.

4.1.3. Perfil aromático

Como se describió en el apartado de Material y Métodos, los compuestos volátiles detectados en las muestras fueron agrupados en series aromáticas atendiendo a los descriptores odorantes de cada uno, con el objetivo de establecer relaciones entre el perfil odorante de los vinos y las condiciones de estudio testadas. Las Tablas A28-A31 (Anexo I) recogen los resultados de los valores de actividad odorante (VAOs) medios de todas las series aromáticas en las muestras de vino testadas. Del mismo modo, en esta tabla se incluye un estudio MANOVA que evalúa las diferencias entre los VAOs de cada serie debidas a la temperatura de fermentación, la cepa de levadura utilizada, la presencia o ausencia de SO₂, o varias de estas condiciones experimentales (Tabla A32, Anexo I).

El análisis estadístico reveló la gran influencia de la cepa de levadura en las diferencias halladas en los VAOs de todas las series aromáticas. Este efecto ya ha sido descrito previamente por varios autores, como Guittin *et al.* (2022), y Tang *et al.* (2021), quienes informan del gran efecto diferenciador de la cepa de levadura utilizada con respecto al perfil aromático de los vinos. Si bien los VAOs de todas las series aromáticas se vieron afectados por la levadura empleada, no todas las series fueron influidas por la temperatura de fermentación, y aún menos series reflejaron el efecto de la presencia de SO₂ en los mostos. La serie frutal es la que más destacó de entre todas, con valores dependientes de la levadura y la temperatura, sin influjo notable del SO₂. Otras series con VAOs medios representativos en los vinos fueron la serie floral y herbácea que, a diferencia de los valores de la serie frutal, no mostraron dependencia de la temperatura de fermentación, pero sí una leve influencia del SO₂, aunque mostrando tendencias irregulares. La serie especiada resultó ser la que presentó diferencias más acusadas

debidas al SO₂, aunque su representación fue reducida en el aroma final de los vinos. Esta serie aromática, junto a las series química y ahumada, constituyeron las únicas dependientes de los tres factores condicionantes.

Los vinos obtenidos con la cepa comercial LC fueron los que más destacaron por su huella odorante frutal en el aroma, algo favorecido por los altos contenidos de octanoato, hexanoato y butanoato de etilo, así como por los de acetato de isoamilo, de esta cepa en comparación con el resto. Los tres primeros poseen bajos umbrales de percepción (Tabla 5, Sección III), lo que permitió en este estudio que, en las concentraciones obtenidas, estos compuestos aportasen esencias frutales apreciables en el aroma final de los vinos. Los niveles de acetato de isoamilo superaron igualmente el umbral de percepción, por lo que el aroma a plátano o fruta tropical típico de este compuesto contribuyó también al perfil aromático de los vinos (Jagatić-Korenika *et al.*, 2020). Tal como ocurrió en las muestras obtenidas con la cepa LC, la alta temperatura de fermentación (25 °C) conllevó un descenso significativo de los VAOs de la serie frutal en los vinos fermentados por B5, B6, B8 y B29, siendo en el caso de B5 donde este efecto resultó más acusado. Sin embargo, las muestras fermentadas por B1 ofrecieron una tendencia contraria, aumentándose los VAOs de esta serie aromática en las fermentaciones a 25 °C.

Con respecto a la serie floral, la segunda más representativa de las muestras, salvo en las obtenidas con LC, que fue la serie cerosa (aroma dulzón similar a la cera de abeja), los vinos fermentados por B29 y por LC fueron los que mostraron los VAOs más altos. Esto se debe a la contribución de compuestos nor-isoprenoides como la β -damascenona y la β -ionona, ambos con bajos umbrales de percepción (Tabla 5, Sección III) y alto contenido en los vinos analizados. La serie herbácea también destacó en los vinos obtenidos con B29, debido a la aportación de la β -damascenona. Por otra parte, las cepas LC, B5, B6 y B29 reflejaron altos VAOs de la serie cerosa en muchas de sus muestras, algo claramente determinado por la contribución del octanoato de etilo. Se observó igualmente que las muestras fermentadas por B5 presentaron un descenso notorio en los VAOs de la serie cerosa a 25 °C de fermentación. La serie de fruta verde resultó ser también representativa en varias muestras, especialmente en las obtenidas con B29 y LC, siendo el hexanoato de etilo el principal responsable. Sin embargo, los vinos fermentados

por estas cepas a 25 °C también reflejaron una reducción en los VAOs de esta serie.

Tras el cálculo de los VAOs de cada compuesto, se observó que 29 de ellos mostraron valores de actividad odorante superiores a la unidad. Las familias químicas más representativas de entre estos metabolitos fueron los compuestos carbonílicos y los ésteres. 7 de estos últimos (5 ésteres de etilo y 2 de acetato) contribuyen a la serie aromática frutal, y los compuestos carbonílicos aportan sus características odorantes a diversas series, como la frutal, la verde, la cítrica, la melosa y la cerosa. Por otro lado, la β -damascenona y la β -ionona, pertenecientes a la familia de los nor-isoprenoides, fueron los principales compuestos influyentes en las series floral y herbácea. Finalmente, se determinó que, dados sus altos VAOs, los compuestos que, en general, más aportaron al aroma de las muestras fueron el acetato de isoamilo, el octanoato de etilo y la β -damascenona. Las concentraciones de los dos primeros resultaron fuertemente dependientes de la temperatura y la levadura (Tablas A26-A27, Anexo I), viéndose generalmente aumentadas en las muestras de B1 a 25 °C y disminuidas en las del resto de cepas a dicha temperatura. Los niveles de β -damascenona no mostraron influencia de la temperatura, pero sí del SO₂ (Tabla A27, Anexo I), aumentando en las muestras de B6 y B29 en presencia de este compuesto.

4.1.4. Análisis multivariante

Las Figuras 35a-35d muestran los resultados de los diagramas radiales obtenidos con un análisis multivariante de los VAOs de las series aromáticas evaluadas en los vinos de estudio. Para construir estos diagramas, se estandarizan los VAOs de las series aromáticas, de modo que cada variable recibe el mismo peso en la impresión visual. La unidad representa el valor promedio de cada serie aromática concreta, por lo que valores por encima o por debajo de la unidad indican que, para una condición dada, los vinos presentan, respectivamente, valores mayores o menores que la media. Por medio de este procedimiento, ya descritos en trabajos como los de Dumitriu *et al.* (2020) y Martín-García *et al.* (2023), es posible conocer cuáles son las series predominantes en una situación determinada.

Figura 35a $18\text{ }^{\circ}\text{C} + \text{SO}_2$
 $^{\circ}\text{C} - \text{SO}_2$

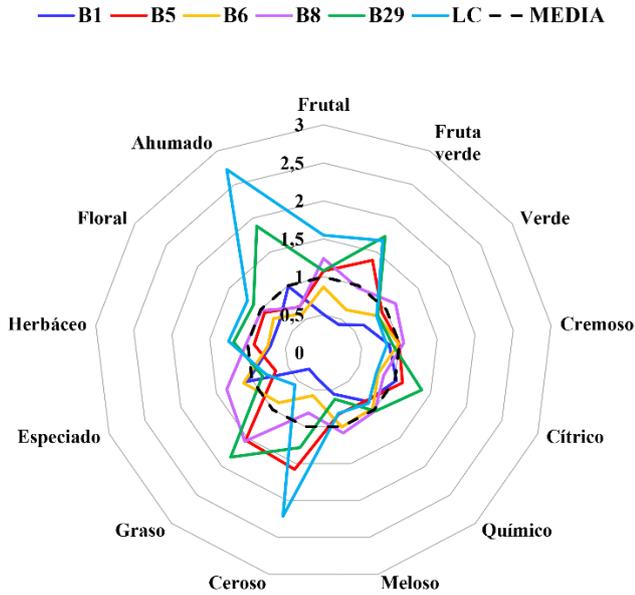


Figura 35b $18\text{ }^{\circ}\text{C}$

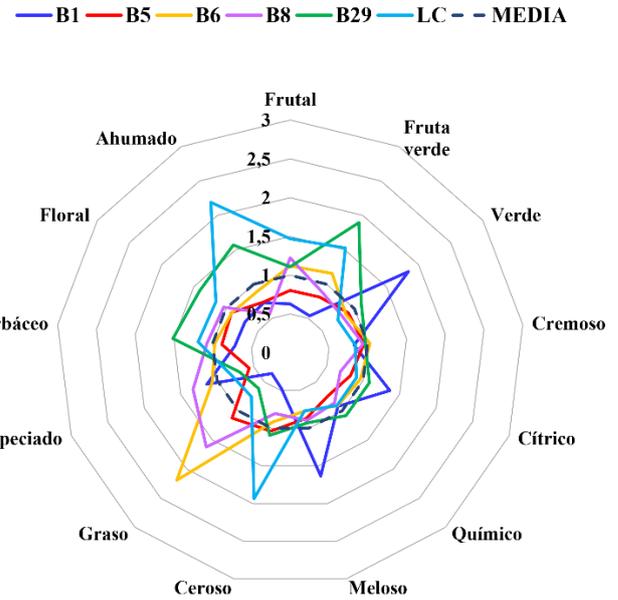


Figura 35c $25\text{ }^{\circ}\text{C} + \text{SO}_2$

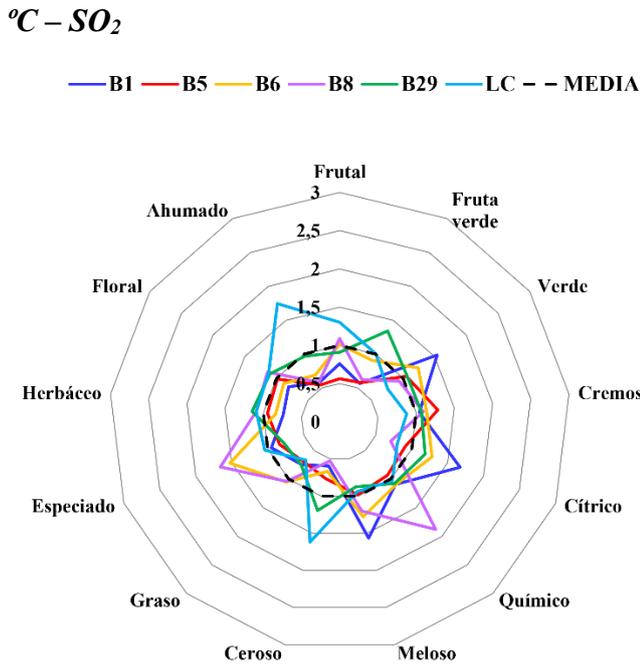


Figura 35d $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

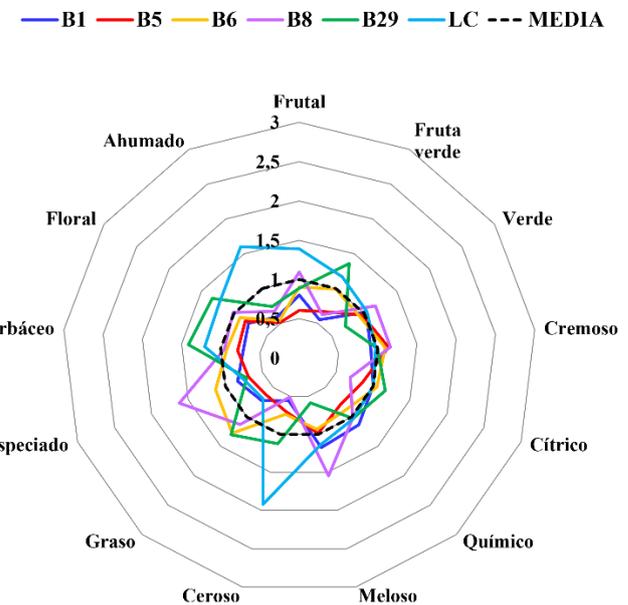


Figura 35. Diagramas radiales construidos por análisis multivariantes de los VAOs de las series aromáticas en las diferentes condiciones de estudio, obtenidos de vinos fermentados a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ con SO_2 (a), a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin SO_2 ; (b), a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ con SO_2 ; (c) y a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin SO_2 (d).

Como puede apreciarse en los diagramas radiales (Figuras 35a-35d), los niveles

de las series ahumada, cerosa y de fruta verde sobrepasan la media en los vinos fermentados por la levadura comercial LC en las cuatro condiciones de estudio. Por su parte, la cepa B1 ofreció, en algunos casos, resultados por encima de la media para las series melosa, verde y cítrica, aunque este hecho no pareció relacionarse con la temperatura ni la presencia de SO₂. Las series grasa, cerosa y de fruta verde también se mostraron sobre el promedio en las vinificaciones llevadas a cabo por la cepa B5 a 18 °C con SO₂ (Figura 35a), algo que no se contempló en las fermentaciones a 25 °C. Por otro lado, la levadura B6 reflejó, salvo en la serie grasa, que fue muy destacada en sus vinos fermentados a 18 °C sin SO₂ (Figura 35b), valores cercanos a la media de todas las series en las condiciones testadas. La serie especiada resultó, en las muestras de la levadura B8, superior a la media en todas las condiciones, y resultó notable, en las fermentaciones a 25 °C con SO₂ (Figura 35c) llevadas a cabo por esta cepa, que los VAOs de la serie química duplicaran la media. Por último, las series ahumada y fruta verde fueron, en el caso de las muestras fermentadas por la cepa B29, mucho más destacadas a 18 °C que a 25 °C. También se observó que, en los vinos obtenidos con esta cepa, la presencia de SO₂ disminuyó los valores de las series floral y herbácea, y aumentó los de la serie cítrica.

4.1.5. Análisis de conglomerados

Siguiendo la metodología empleada por autores como Budziak-Wieczorek *et al.* (2023), se realizó un análisis de conglomerados con los vinos obtenidos. El análisis de conglomerados es una técnica estadística multivariante cuyo objetivo es establecer grupos de muestras de acuerdo con sus similitudes que, en este caso, corresponden a las existentes entre el perfil aromático de cada vino. Se considera que cuanto menor sea la distancia entre dos grupos, mayor es la similitud entre las muestras contenidas en ellos. El análisis de conglomerados se llevó a cabo empleando el método de Ward, seleccionándose como variables dependientes las series aromáticas.

Cuatro análisis de conglomerados fueron realizados para las cuatro condiciones de estudio. Las Figuras 36a y 36b reflejan los grupos establecidos al comparar los vinos fermentados a 18 °C (a) y los fermentados a 25 °C (b). Por otro lado, las Figuras 36c y 36d indican las agrupaciones de muestras que surgen al comparar los vinos obtenidos a partir de mostos con SO₂ (c) y los procedentes de mostos sin SO₂ (d).

Figura 36a

18 °C

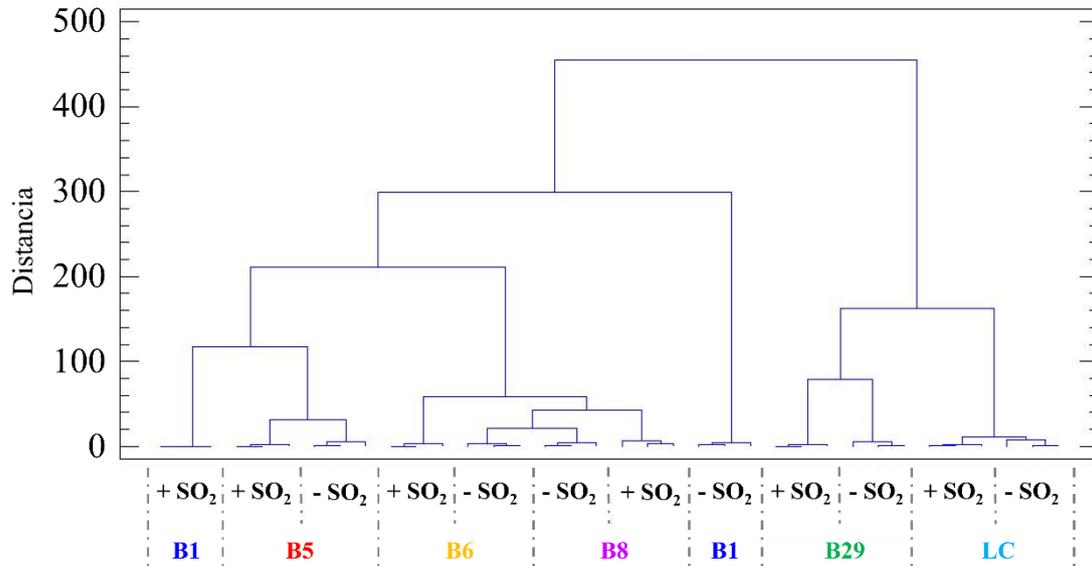
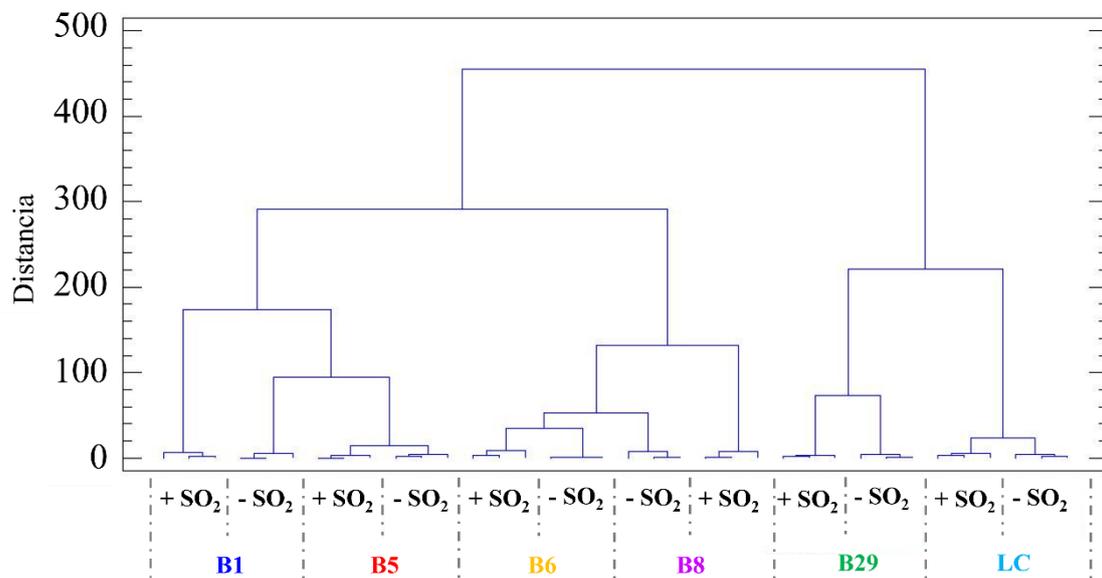


Figura 36b

25 °C



Figuras 36. Análisis de conglomerados de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio que comparan las muestras fermentadas a 18 °C (36a) y a 25 °C (36b).

Figura 36c

75 mg/L SO₂

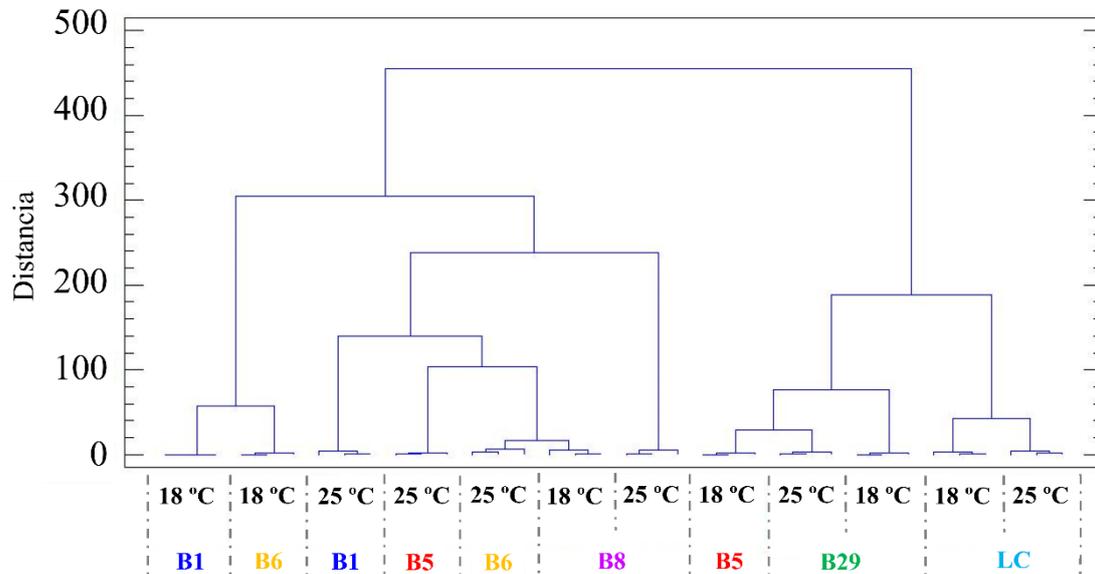


Figura 36d

0 mg/L SO₂

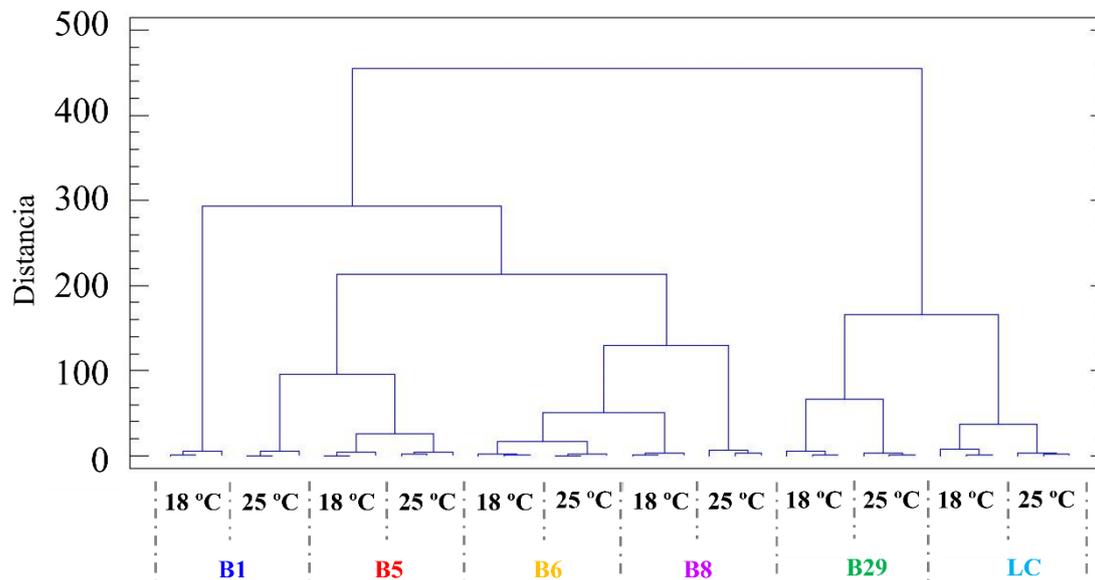


Figura 36 (Continuación). Análisis de conglomerados de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio que comparan las muestras fermentadas a partir de mostos con SO₂ (c) y sin SO₂ (d).

A primera vista se pueden apreciar dos grandes grupos bien diferenciados en los cuatro análisis de conglomerados, donde un gran grupo que contiene los vinos

fermentados por B29 y por LC demostró, a nivel general, mayores similitudes entre estos vinos que con el resto, situados en el otro gran grupo de muestras. Resulta también destacable la corta distancia existente entre las muestras obtenidas con la cepa LC en las cuatro condiciones, reflejándose la escasa influencia de los factores temperatura y SO₂ en sus fermentaciones. Las vinificaciones donde se empleó la cepa B29 mostraron resultados similares.

En el otro gran grupo se incluyen las muestras fermentadas por el resto de levaduras: B1, B5, B6 y B8. El análisis de conglomerados que refleja las similitudes entre los vinos obtenidos con estas cepas a partir de mostos con SO₂ (Figura 36c) es donde se aprecian más diferencias debidas a la temperatura. Por otra parte, según muestran las Figuras 36a y 36b, las fermentaciones llevadas a cabo por la cepa B1 fueron, en apariencia, las más influidas por la presencia de SO₂, aunque este efecto pareció mitigarse cuando la temperatura de fermentación fue de 25 °C. También se observaron diferencias en los vinos de B1 sin SO₂ debidas a la temperatura (Figura 36d).

4.1.6. Análisis de Componentes Principales

Un Análisis de Componentes Principales (PCA) consiste en una técnica estadística que se utiliza para reducir al máximo el número de variables preservando toda la información posible. Las nuevas componentes surgen de la combinación lineal de las variables introducidas, y su interpretación se considera responsabilidad del analista. Para cada PCA se seleccionaron tres componentes (PC1, PC2 y PC3) que, en su conjunto, explicasen el mayor porcentaje posible de la varianza observada. Los PCAs también permiten identificar qué variables presentan una mayor contribución a las diferencias observadas en cada caso. El peso de cada serie aromática en cada componente se recoge en las Tablas A33 y A34 (Anexo I). Para este estudio se han realizado diversos PCAs, usando los valores de las series aromáticas como variables de clasificación y comparando las muestras en base a las condiciones de estudio (Figuras 37-40).

18 °C

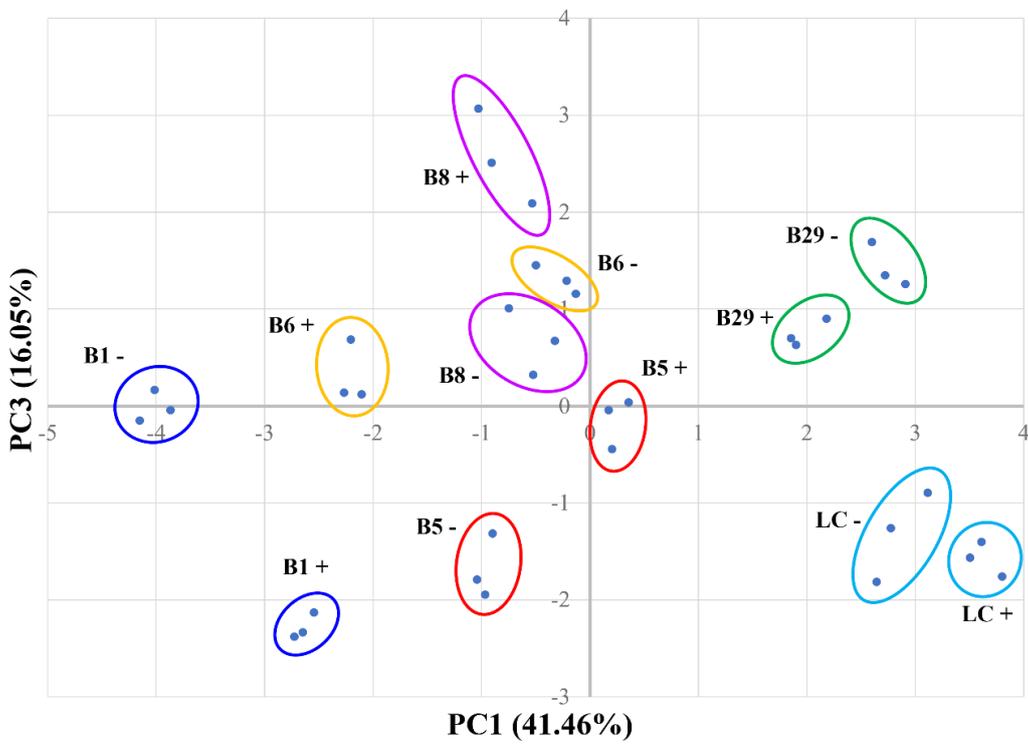
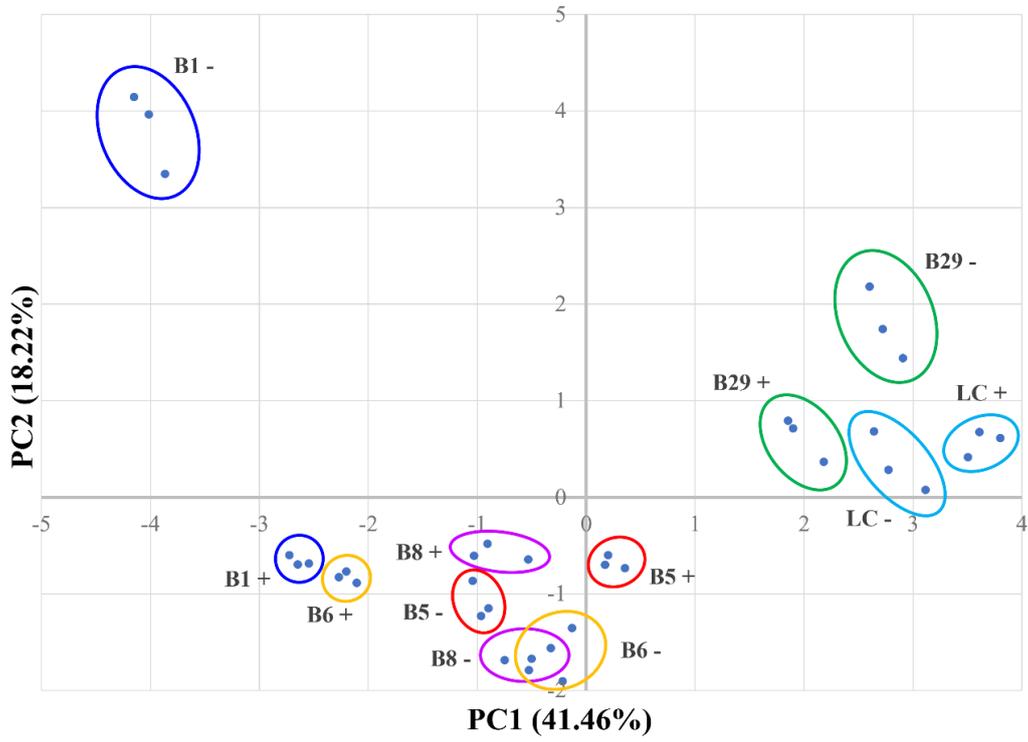


Figura 37. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio a 18 °C, usando las series aromáticas como variables de clasificación. “+”: 75 mg/L de SO₂ en mostos; “-“: 0 mg/L de SO₂ en mostos.

25 °C

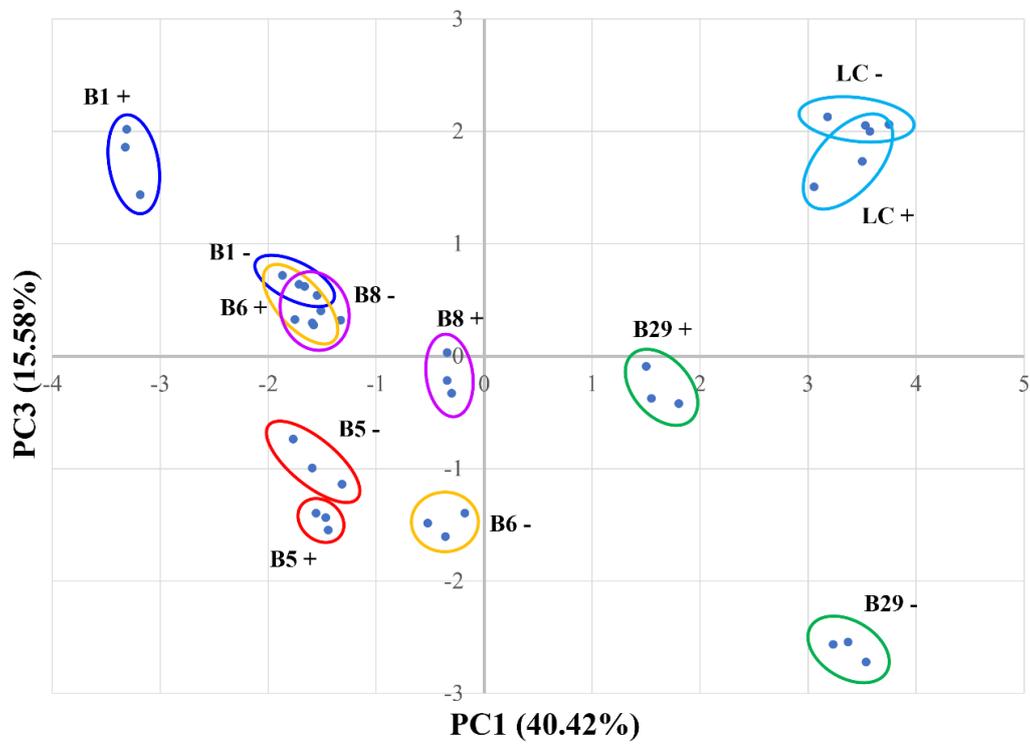
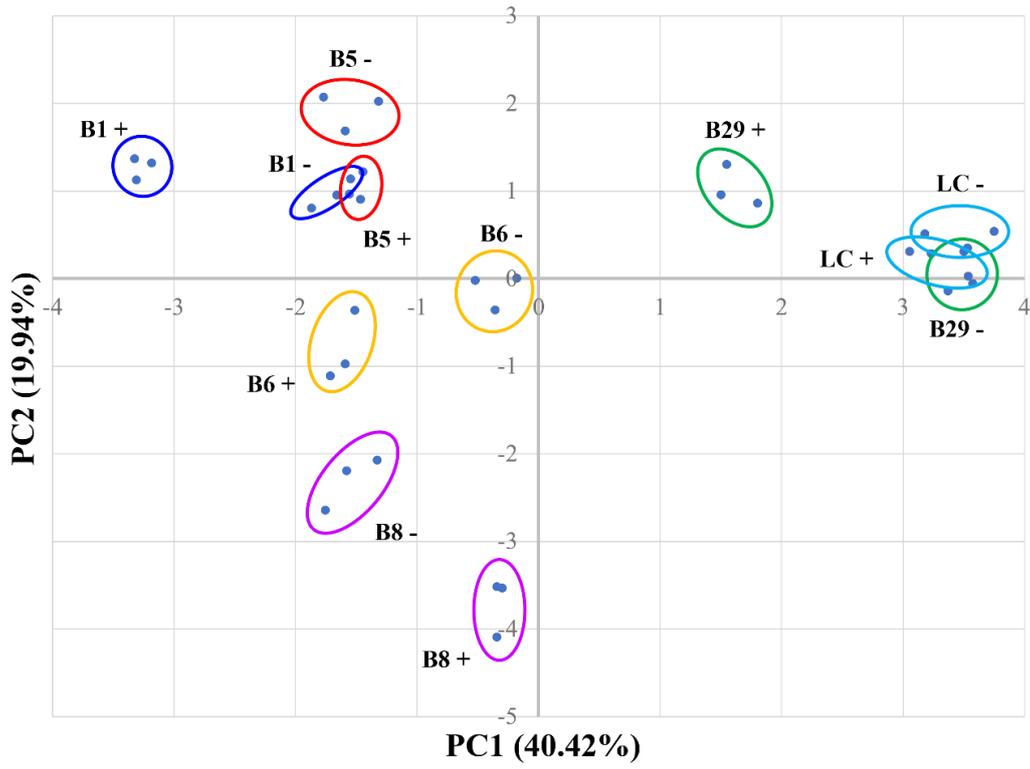


Figura 38. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio a 25 °C, usando las series aromáticas como variables de clasificación. “+”: 75 mg/L de SO₂ en mostos; “-“: 0 mg/L de SO₂ en mostos.

Las tres componentes del primer PCA (Figura 37), que muestra los vinos fermentados por todas las cepas a 18 °C con y sin SO₂, explican, en conjunto, el 75.73% de la varianza total. La primera componente (PC1) explica un 41.46% y distingue claramente las muestras obtenidas con las cepas B29 y LC del resto. Esta componente se encuentra influida principalmente por las series aromáticas de fruta verde, floral, herbácea y cerosa (Tabla A33, Anexo I). La segunda componente (PC2) explica un 18.22% de la varianza total y diferencia los vinos fermentados por B1 del resto, un efecto que ya resultó apreciable en el análisis de conglomerados (Figura 36a). Esta componente presenta un influjo principal de las series verde, cítrica y grasa (Tabla A33, Anexo I). La tercera componente (PC3) explica un 16.05% de la varianza y parece estar relacionada con la presencia de SO₂, ya que existe separación entre los vinos obtenidos con y sin este compuesto. La principal contribución a esta componente viene dada por las series aromáticas cremosa, química y grasa (Tabla A33, Anexo I).

En el segundo PCA (Figura 38), las tres componentes explican conjuntamente el 75.94% de la varianza total, y reflejan las diferencias entre los vinos fermentados a 25 °C, con y sin SO₂, por todas las cepas. La primera componente (PC1), que explica el 40.42% de la varianza, indica también que las muestras fermentadas por B29 y LC a 25 °C se diferencian notablemente del resto, siendo las series aromáticas cerosa, herbácea y floral las mayores responsables (Tabla A33, Anexo I). Por otro lado, la segunda componente (PC2), que explica el 19.96% de la varianza, distingue los vinos obtenidos con B6 y B8 de los demás en estas condiciones. Esta serie también parece tener relación con la presencia de SO₂, ya que para una misma cepa, los vinos que no lo contienen suelen situarse por encima de los que sí tienen este compuesto. Las series odorantes que más contribuyen a la PC2 son la especiada, la química y la grasa (Tabla A33, Anexo I). La tercera componente (PC3) (15.58% de la varianza) no muestra una tendencia clara a la separación de condiciones. Las series aromáticas con mayor peso en esta componente son la melosa, la ahumada y la frutal (Tabla A33, Anexo I).

75 mg/L SO₂

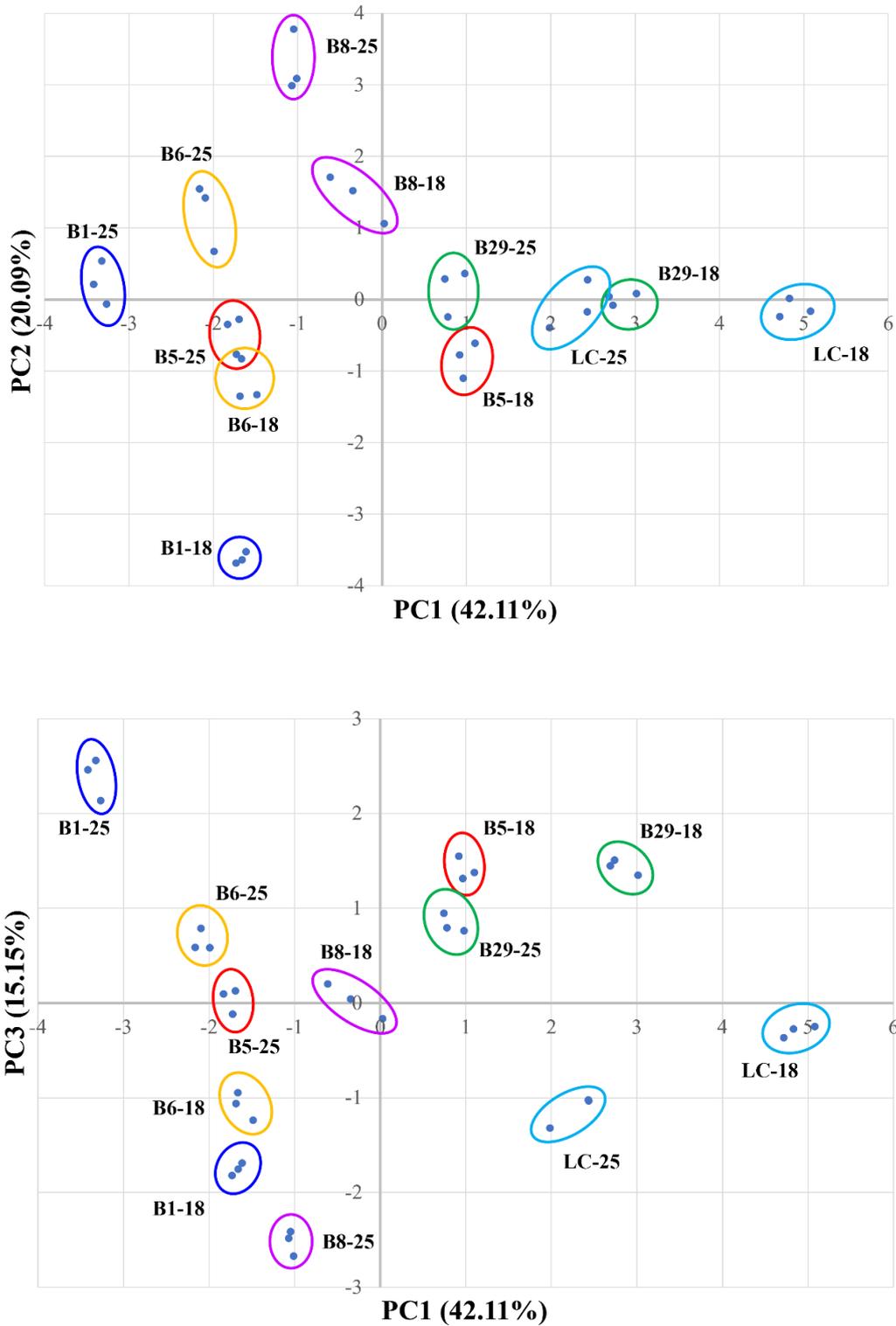


Figura 39. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio con SO₂ en mostos, usando las series aromáticas como variables de clasificación “18”: Fermentación a 18 °C; “25”: Fermentación a 25 °C.

0 mg/L SO₂

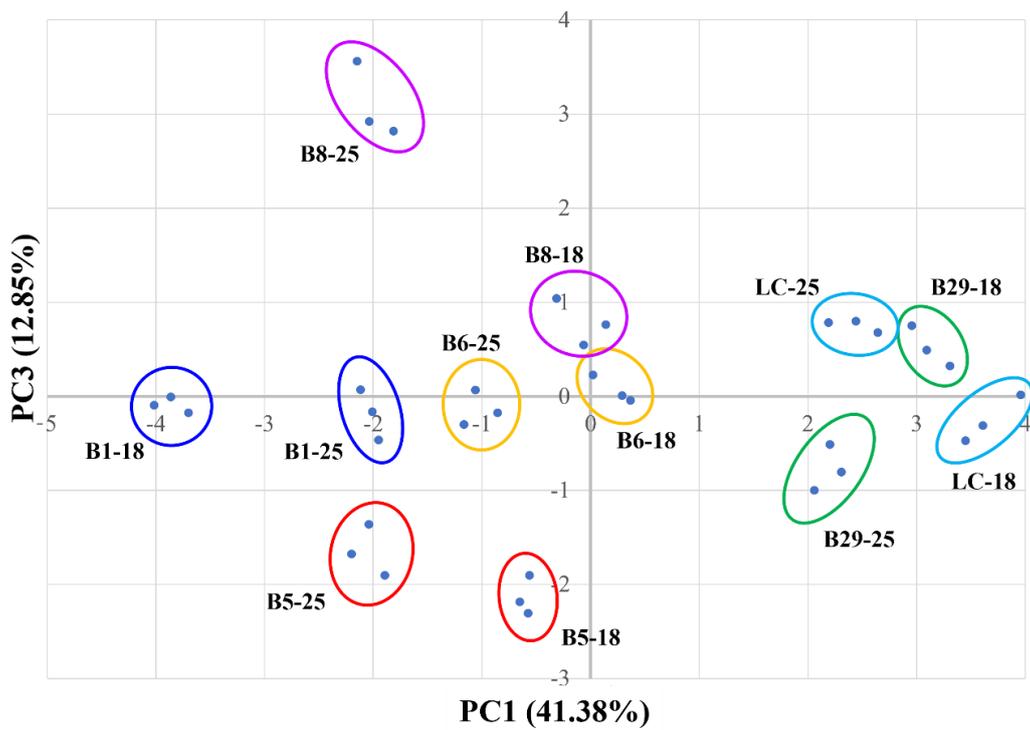
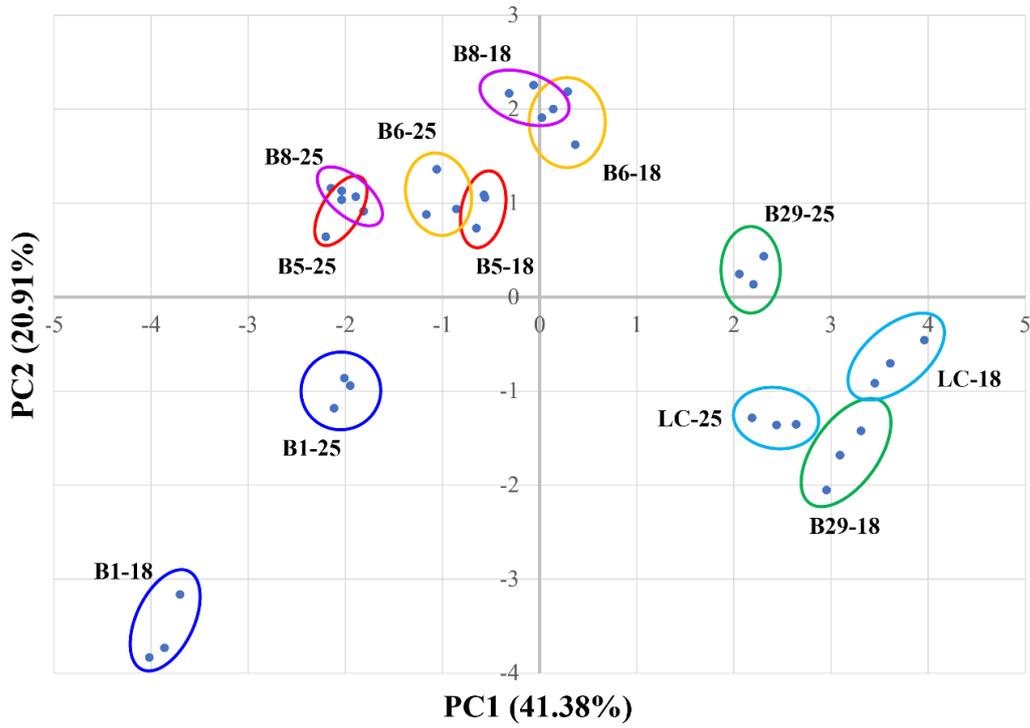


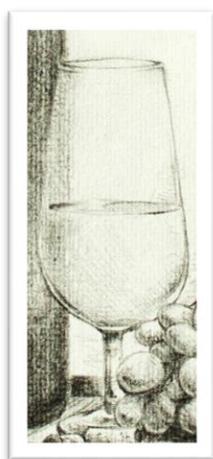
Figura 40. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio sin SO₂ en mostos, usando las series aromáticas como variables de clasificación “18”: Fermentación a 18 °C; “25”: Fermentación a 25 °C.

El tercer PCA (Figura 39), donde las componentes seleccionadas explican un total del 77.35% de la varianza, corresponde a las muestras de vino que proceden de mostos con SO₂, obtenidas a ambas temperaturas de fermentación por todas las cepas. La primera componente (PC1), que explica el 42.11% de la variabilidad total, separa de nuevo las muestras fermentadas por B29 y LC del resto. Las series cerosa, ahumada y de fruta verde son las principales contribuyentes a la PC1 (Tabla A34, Anexo I). Por su parte, la segunda componente (PC2), que explica un 20.09% de la varianza total, distingue las muestras obtenidas con B5 y B1 de las de B8, y refleja diferencias debidas a la temperatura, quedando las muestras fermentadas a 25 °C por encima. El mayor peso en esta componente lo presentan las series química y melosa (Tabla A34, Anexo I). Un 15.15% de la varianza total se explica gracias a la tercera componente (PC3). De nuevo se pone de manifiesto la diferenciación de vinos obtenidos por B1 y B6 debida a la temperatura, quedando por encima sus muestras fermentadas a 25 °C. Además, esta componente separa las muestras de B29 de las de LC. Las series cítrica y verde contribuyen mayormente a esta componente (Tabla A34, Anexo I).

En el último PCA (Figura 40) se exponen las muestras de vino obtenidas por las levaduras de estudio a partir de mostos sin SO₂, y las componentes seleccionadas explican el 75.14% de la varianza total. Un 41.38% de la misma es explicada por la primera componente (PC1), que nuevamente separa las muestras fermentadas por B29 y LC del resto, apreciándose la mayor diferenciación con las muestras de B1. Las series aromáticas que más contribuyen a la PC1 son las de fruta verde, herbácea y floral (Tabla A34, Anexo I). La segunda componente (PC2) explica el 20.91% de la variabilidad total. Esta componente separa los vinos obtenidos con B1 del resto. El mayor peso en esta componente lo ostentan las series grasa, cítrica y verde (Tabla A34, Anexo I). Por último, la tercera componente (PC3), que explica el 12.85% de la varianza total, señala diferencias notables entre las muestras de B5 y B8 sin SO₂. Las series especiada, química y melosa son las mayores contribuyentes al peso de esta componente (Tabla A34, Anexo I).

Los resultados obtenidos en los PCAs se corresponden con los análisis de conglomerados realizados para cada una de las condiciones de estudio testadas (Figuras 36a-d), destacando que los vinos de B29 y LC se diferenciaron del resto, y que los de B1 mostraron, entre sí, diferencias influidas por la temperatura y el SO₂

4. RESULTADOS



CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL ANHIDRIDO SULFUROSO EN LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS DE LOS VINOS FERMENTADOS POR CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE SILVESTRES Y UNA COMERCIAL CON BUENA APTITUD ENOLÓGICA FRENTE A LOS EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO

4.2. RESULTADOS. CAPÍTULO 2.

4.2.1. Compuestos volátiles mayoritarios

En las Tablas A6-A25 (Anexo I), comentadas en el capítulo anterior (Sección IV. Capítulo 1), fueron expuestos los contenidos de los compuestos volátiles detectados en las muestras analizadas. Aunque la presencia de SO₂ no ocasionó grandes diferencias en dichos contenidos, sí que se observó un efecto importante en la mayoría de compuestos mayoritarios, que son aquellos cuya concentración sobrepasa los 10 mg/L. De este modo, se decidió profundizar en estos resultados, que se representan en las Tablas A35-A38 (Anexo).

Los compuestos mayoritarios representados pertenecen a cuatro familias químicas diferentes: alcoholes (2-feniletanol, alcoholes isoamílicos, isobutanol, metanol y propanol), polioles (ambos estereoisómeros del 2,3-butanodiol y glicerina), ésteres (acetato de etilo y succinato de dietilo) y compuestos carbonílicos (acetaldehído y acetoína). La concentración de todos ellos en las muestras analizadas reflejan la influencia de la cepa de levadura empleada y, con las excepciones del propanol y el succinato de dietilo, también de la temperatura de fermentación. La presencia de SO₂ no pareció influir en los contenidos de metanol ni de ambos estereoisómeros del 2,3-butanodiol, ofreciendo, en cambio, diferencias significativas en los de 2-feniletanol, alcoholes isoamílicos, isobutanol, propanol, glicerina, acetato de etilo, acetaldehído y acetoína.

Los niveles de alcoholes isoamílicos, compuestos derivados de aminoácidos de cadena ramificada y procedentes del metabolismo de la levadura, fueron, de entre los alcoholes, de los que mayor contenido presentaron en las muestras, tras polioles como el 2,3-butanodiol o la glicerina. Autores como Jagatić-Korenika *et al.* (2020) o Patel & Shibamoto (2002) han descrito en sus trabajos resultados similares con respecto a las concentraciones de alcoholes isoamílicos en relación a las de otros alcoholes en vino. Se considera, además, que niveles inferiores a 300 mg/L en vino son contribuyentes positivos a la complejidad del aroma del vino (Waterhouse *et al.*, 2016), como ocurrió en el caso de los vinos obtenidos por las cepas de estudio.

El contenido de alcoholes isoamílicos presente en las muestras evaluadas en el

presente trabajo se representan a continuación en la Figura 41.

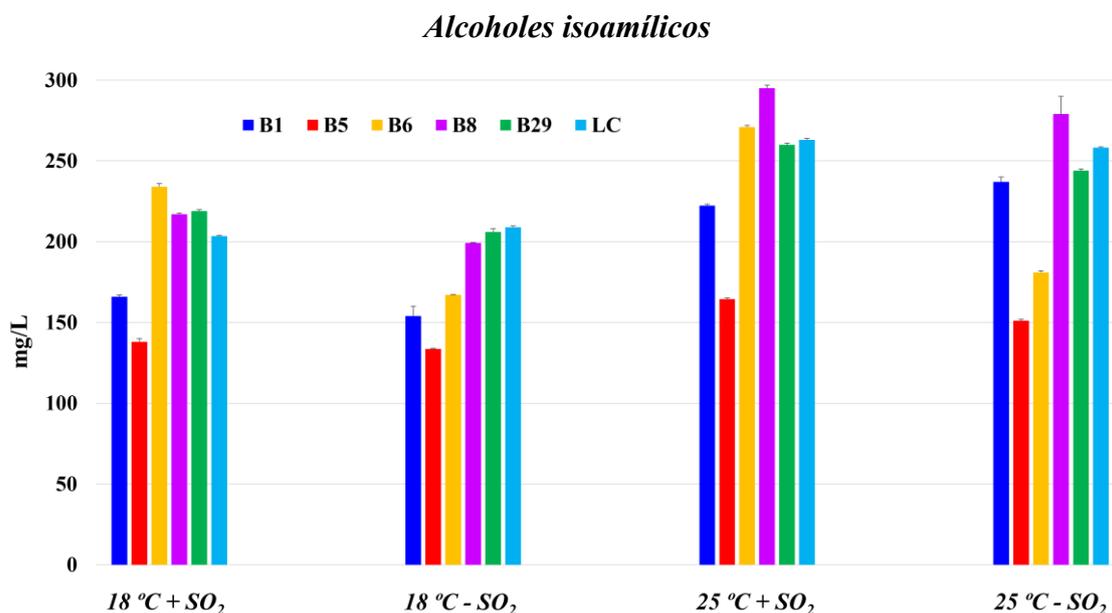


Figura 41. Niveles (mg/L) de alcoholes isoamílicos de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

En la Figura 41 se pueden observar, como previamente se indicó, la influencia de la levadura y la temperatura de fermentación en los valores de alcoholes isoamílicos (Tabla A39, Anexo I), habiéndose obtenido con B5 los menores niveles. También es contrastable el incremento del contenido de isoamílicos en las fermentaciones a 25 °C. Sin embargo, aunque el efecto de la presencia de SO₂ en los mostos de partida no presentó un patrón común a las fermentaciones de todas las cepas, es apreciable un aumento de las concentraciones de alcoholes isoamílicos en las muestras fermentadas por B6, B8 y B29 con SO₂ en mosto. Esta influencia del SO₂ en el aumento de los niveles de isoamílicos también fue apreciado en estudios de otros autores como Ochando *et al.* (2020).

Las concentraciones de 2-feniletanol (Figura 42) en las muestras presentaron diferencias notables debidas a los tres factores de estudio: levadura, temperatura y SO₂ (Tabla A39, Anexo I).

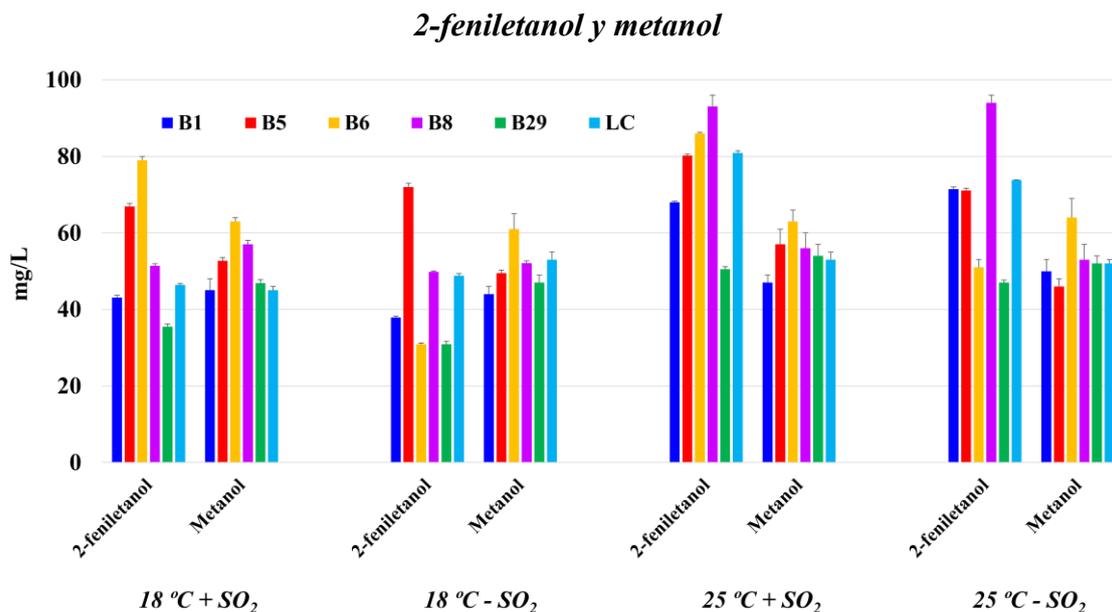


Figura 42. Niveles (mg/L) de 2-feniletanol y metanol de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

Se observó que, generalmente, la cepa B29 fue la que determinó vinos con menor contenido en 2-feniletanol, y la cepa B5 presentó los mayores niveles promedios. Además, los niveles de este compuesto fueron más elevados en los vinos fermentados a 25 °C, independientemente de la levadura. Este hecho se describe en Du *et al.* (2022), que habla del aumento del contenido de 2-feniletanol a mayor temperatura. El efecto del SO₂ resultó claramente significativo en los vinos fermentados por B6, correspondiéndose con las afirmaciones de estudios como el de Orlando *et al.*, (2020), que también detectaron influencia del SO₂ en los contenidos de 2-feniletanol. Con respecto al metanol (Figura 42), no se observaron diferencias debidas al SO₂, pero sí a la levadura y a la temperatura de fermentación, distinguiéndose levemente un aumento de los niveles de este compuesto en vinos obtenidos a 25 °C. La levadura B6 fue la que presentó mayores niveles de metanol en sus vinos, y B1, de forma general, fue la que mostró los niveles más reducidos.

Los contenidos de isobutanol y propanol detectados en los vinos obtenidos se representan en la Figura 43.

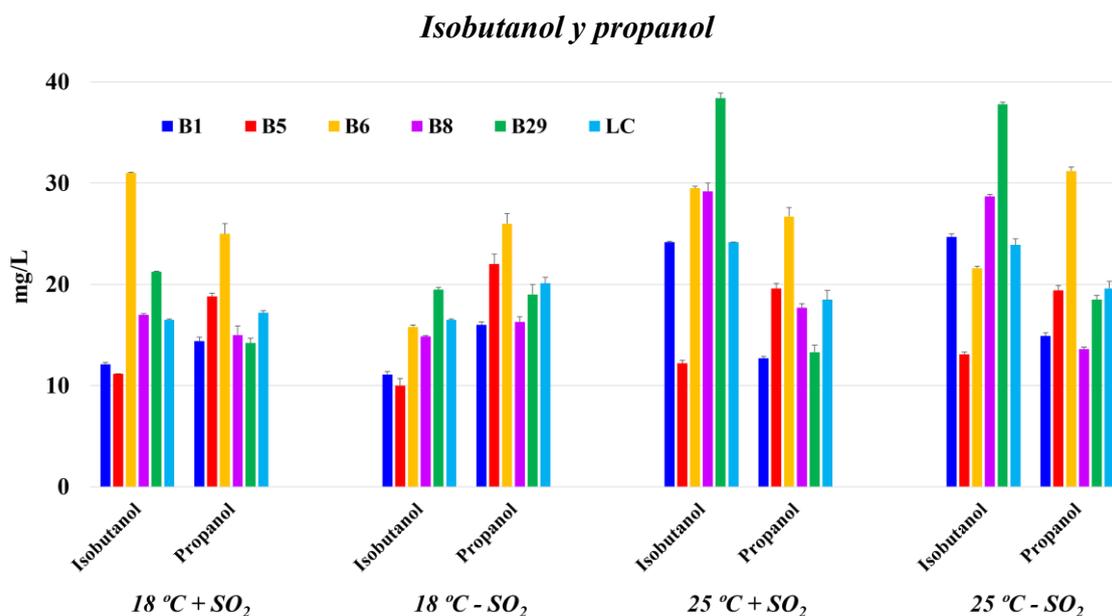


Figura 43. Niveles (mg/L) de isobutanol y propanol de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

El isobutanol, al igual que el resto de alcoholes descritos, también mostró influencia debida a la temperatura, aumentando sus niveles a 25°C; a la cepa utilizada, siendo B5 la que presentó contenidos más bajos; y a la presencia de SO₂, resultando éste muy influyente en los vinos obtenidos con la levadura B6. Por último, aunque el contenido en propanol no ofreció diferencias debidas a la temperatura, sí que lo hizo con respecto a la levadura y al SO₂ de forma muy significativa. Así, las muestras fermentadas por B6 fueron las más ricas en propanol y, por otro lado, aquellas obtenidas con las cepas B29 y LC en presencia de SO₂ reflejaron una tendencia a presentar menores cantidades de este compuesto.

Según los resultados, se puede determinar que no se apreciaron diferencias debidas al SO₂ en el contenido de alcoholes de los vinos obtenidos con B1 y B5, y que la temperatura de fermentación más alta (25 °C) influyó generalmente incrementando los niveles de todos los alcoholes mayoritarios.

De entre los compuestos mayoritarios correspondientes a polioles, el más representativo por su elevado contenido es la glicerina ya que, tras el agua y el etanol, este componente ocupa el tercer puesto en cuanto a su abundancia en el vino (Moreno &

Peinado, 2012), como así ocurrió en los vinos de estudio. También denominada glicerol, la glicerina constituye un producto secundario de la fermentación alcohólica, el tercero en importancia tras el etanol y el CO₂, y es producido por la levadura para protegerse del estrés osmótico del medio (Yang *et al.*, 2017; Waterhouse *et al.*, 2016). Debido a su naturaleza no volátil, la glicerina no presenta propiedades odorantes ni contribuye a ninguna serie aromática, pero sí aporta cualidades organolépticas positivas al vino, otorgándole dulzor y cuerpo (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Por ello, aunque esta práctica se encuentra prohibida en la mayoría de los países, algunas bodegas añaden artificialmente glicerina para favorecer sus efectos deseables en la calidad sensorial del vino (Waterhouse *et al.*, 2016). Sus niveles en los vinos obtenidos se ven en la Figura 44.

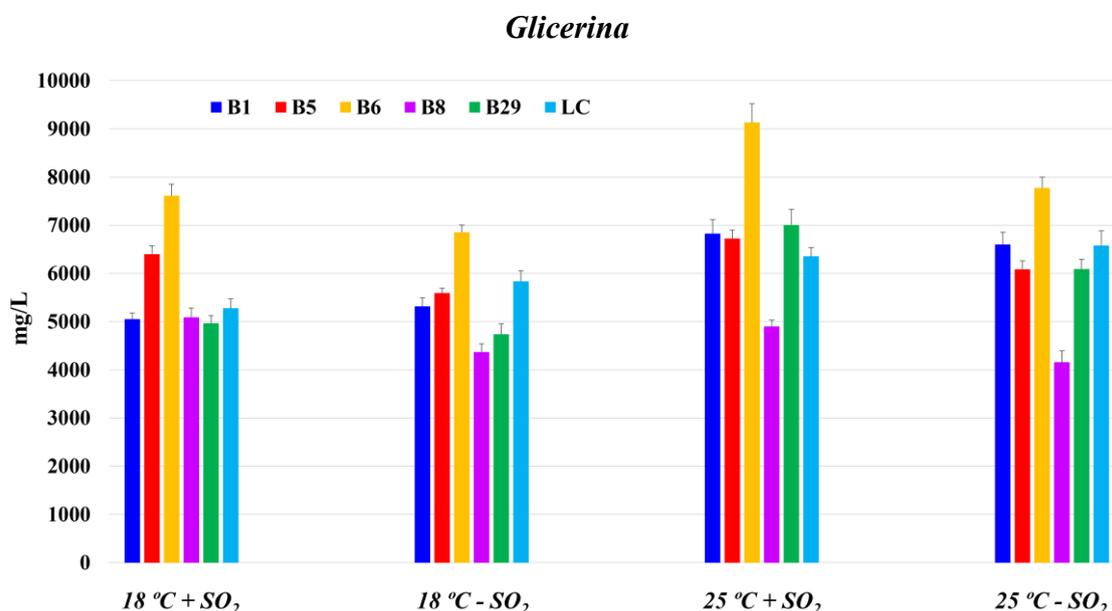


Figura 44. Niveles (mg/L) de glicerina de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

El análisis MANOVA (Tabla A39, Anexo I) determinó que los niveles de glicerina en las muestras se vieron afectados de forma significativa por la levadura empleada, la temperatura de fermentación y la presencia de SO₂ en mostos. Las fermentaciones de la cepa B6 fueron la que reflejaron mayores contenidos en glicerina y, de forma general, los niveles más bajos de este compuesto se observaron en las muestras fermentadas por la levadura B8. En todos los vinos, a excepción de los obtenidos con esta cepa, se observó una tendencia más o menos clara de presentar concentraciones más elevadas de glicerina

habiendo sido fermentados a 25 °C. Por último, se determinó un mayor contenido promedio de las concentraciones de este compuesto en las muestras obtenidas a partir de mostos con SO₂, salvo en las fermentadas por B1 y LC. Este hecho concuerda con las afirmaciones de autores como Waterhouse *et al.*, 2016, que ya definen la relación entre la presencia de SO₂ y la consecuente generación de mayores cantidades de glicerina.

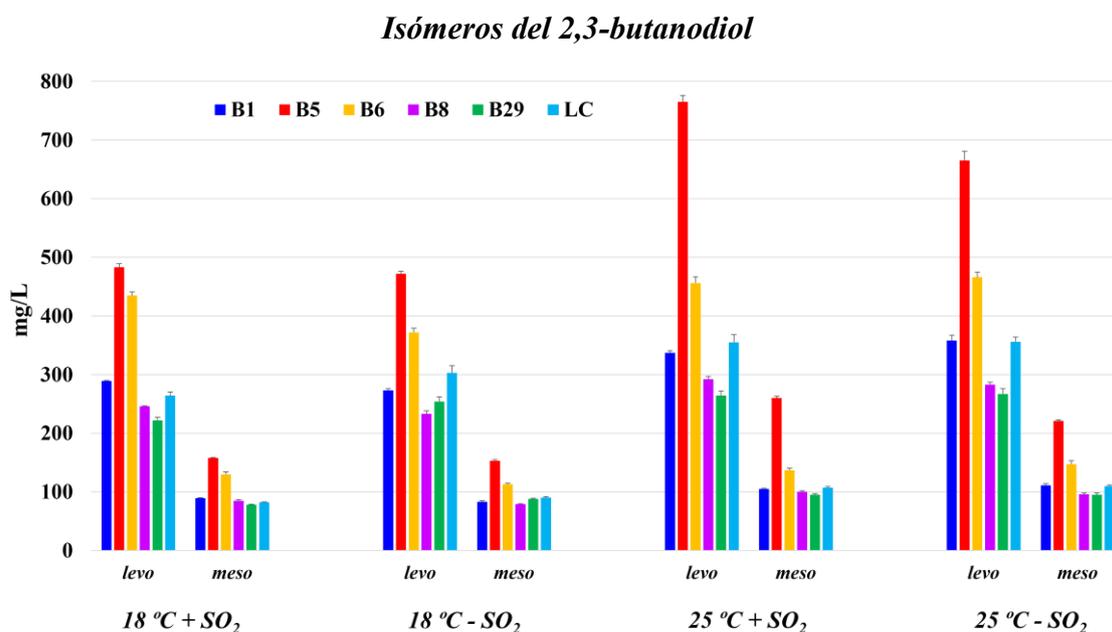


Figura 45. Niveles (mg/L) de ambos estereoisómeros del 2,3-butanodiol (*levo* y *meso*) de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

El 2,3-butanodiol es un poliol que surge de la reducción de la acetoína ocurrida en las condiciones anaeróbicas que acontecen durante el proceso fermentativo (Waterhouse *et al.*, 2016). La Figura 45 muestra las concentraciones medias cuantificadas en los vinos de estudio, las cuales, tal y como refleja la Tabla A39 (Anexo I), mostraron dependencia de la levadura y la temperatura; no observándose, en cambio, influencia significativa de la presencia de SO₂ en los mostos de partida. El estereoisómero *levo* fue detectado en mayores cantidades que el *meso*, siendo las muestras fermentadas por las cepas B5 y B6 las que presentaron niveles más altos con respecto a ambos; y la temperatura también resulto un factor clave generalizado, observándose concentraciones más elevadas de 2,3-butanodiol en las muestras fermentadas a 25 °C. Con todo ello, se puede resolver que la temperatura de fermentación más alta conllevó, al igual que en el caso de los alcoholes,

mayores cantidades de los polioles descritos.

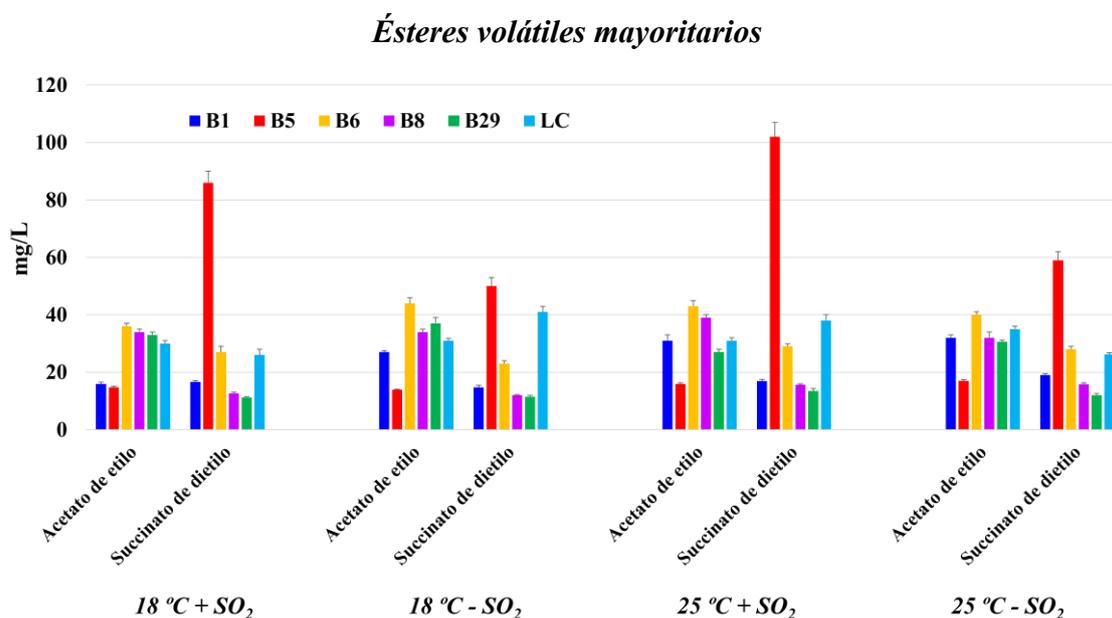


Figura 46. Niveles (mg/L) de acetato de etilo y succinato de dietilo de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

El acetato de etilo y el succinato de etilo, cuyos niveles en las muestras de estudio se representan en la Figura 46, son los ésteres mayoritarios más comunes en el vino. El primero, formado por la esterificación de ácido acético, presenta unos descriptores odorantes poco deseables en el vino, pudiendo aportar ciertas notas avinagradas o similares a quitaesmalte de uñas a su aroma dependiendo de los niveles en que se encuentre (Swiegers *et al.*, 2005). Por su parte, el succinato de dietilo, procedente de la esterificación del ácido succínico, presenta baja volatilidad y un umbral sensorial muy por encima de sus concentraciones habituales en el vino, por lo que es difícil que contribuya a su aroma con la esencia frutal que lo caracteriza (Waterhouse *et al.*, 2016).

Según los resultados observados en el análisis multivariante (Tabla A39, Anexo D), los niveles de ambos ésteres presentaron diferencias significativas debidas a la cepa de levadura y, algo más moderadas, a la presencia de SO₂. Con respecto al acetato de etilo, se detectaron los niveles más bajos en los vinos fermentados con la cepa B5; y mayores, en los de B6. No se apreció, sin embargo, una tendencia de comportamiento clara frente al SO₂ ni a la temperatura, aunque el análisis ofreciera signos de diferencias debidas a

ambos factores. Solo en el caso de los vinos obtenidos con B29 puede apreciarse una disminución de los niveles de acetato de etilo a 25 °C, correspondiéndose con lo afirmado por autores como Du *et al.* (2022), que describen en sus estudios que los niveles de acetato de etilo son más bajos a temperaturas más altas. Por otro lado, los niveles de succinato de dietilo, sin influencia de la temperatura de fermentación, sí que mostraron diferencias en base a la cepa utilizada y al SO₂, aunque este hecho solo se aprecia con claridad en los vinos obtenidos con la levadura B5. Sus vinos mostraron, con gran diferencia, los niveles más altos de este compuesto, y la presencia de SO₂ también contribuyó a la obtención de concentraciones más elevadas.

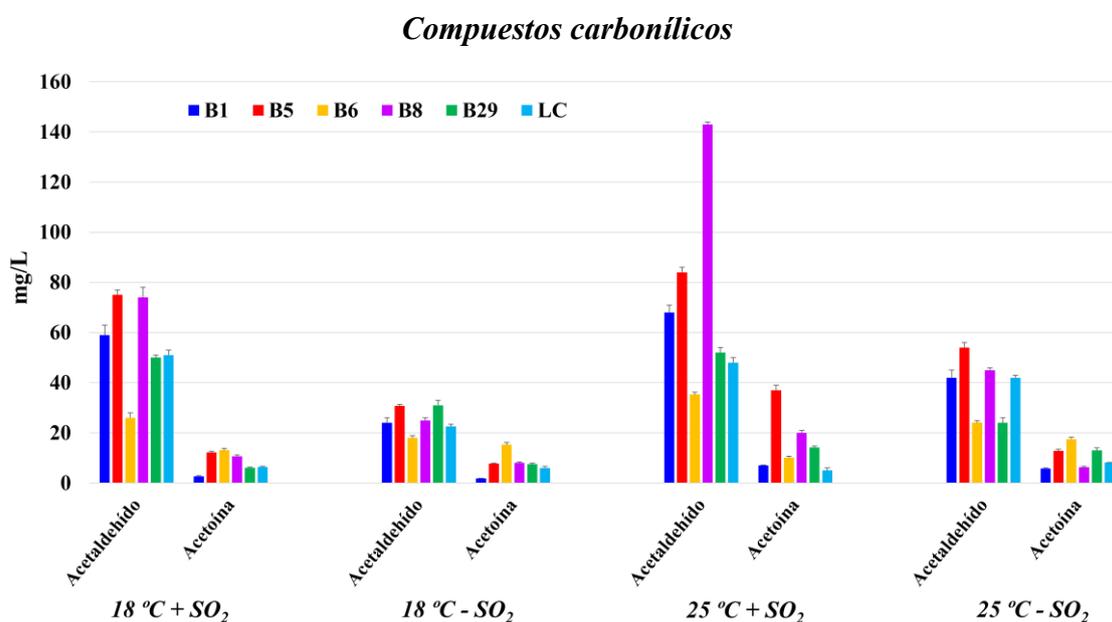


Figura 47. Niveles (mg/L) de acetaldehído y acetoína de los vinos obtenidos por las levaduras de estudio. “18 °C”: vinos fermentados a 18 °C; “25 °C”: vinos fermentados a 25 °C; “+ SO₂”: vinos obtenidos de mostos con 75 mg/L de SO₂; “- SO₂”: vinos obtenidos de mostos sin SO₂.

Los niveles determinados en los dos compuestos carbonílicos considerados mayoritarios, el acetaldehído y la acetoína, se representan en la Figura 47. El acetaldehído surge como producto de la glucólisis de la levadura a partir de piruvato (Ochando *et al.*, 2020), y es precursor, directo o indirecto, de muchos compuestos odorantes, como la acetoína, los alcoholes isoamílicos o el 2,3-butanodiol (Romano & Suzzi, 1996). Suele encontrarse en un rango de 40-200 mg/L en el vino blanco (Waterhouse *et al.*, 2016), lo cual se corresponde con lo observado en las muestras analizadas. Según se expone en la Tabla A39 (Anexo I), las concentraciones de acetaldehído en las muestras reflejan efectos

significativos por parte de los tres factores de estudio. Las levaduras B8, B5 y B1 dieron lugar a los vinos con un mayor contenido en acetaldehído, mientras que la B6 obtuvo los más bajos. La alta temperatura de fermentación también pareció influir en el incremento de acetaldehído, sobre todo en las muestras de B8. Sin embargo, el efecto más llamativo resultó ser el del SO₂, apreciándose niveles mayores de acetaldehído en las muestras fermentadas con adición de este compuesto. Se sabe que el acetaldehído tiende a asociarse de forma estable con el SO₂, de modo que, normalmente, en vinos donde el SO₂ se encuentra presente, el acetaldehído se detecta en mayores cantidades, en detrimento de la formación de etanol. Este efecto aglutinante se produce para regular el equilibrio redox en la célula que pudiera desajustarse por la adición de sulfuroso (Ochando *et al.*, 2020).

La acetoína, por su parte, constituye un precursor del 2,3-butanodiol y un producto de la transformación del α -acetolactato por las condiciones anaeróbicas típicas de la fermentación, aunque una elevada actividad diacetil reductasa también puede conllevar la obtención de acetoína a partir de diacetil (Romano & Suzzi, 1996). Los resultados expuestos en la Tabla A39 (Anexo I) y en la Figura 47 determinan diferencias significativas en sus niveles debidas a la levadura, y un incremento de sus niveles a 25 °C, mayormente influidos por las concentraciones obtenidas con la cepa B5. La influencia del SO₂ no pareció obedecer a un patrón concreto, observándose en su presencia descenso (B6) o incremento (B5 y B8) de los niveles de acetoína dependiendo de la levadura.

4.2.2. Análisis de Componentes Principales

Se realizaron diversos PCAs usando las concentraciones de compuestos mayoritarios como variables de clasificación y comparando las muestras en base a las condiciones de fermentación (Figuras 48-51). Se seleccionaron, para cada PCA, tres componentes (PC1, PC2 y PC3) que explicasen, en conjunto, el mayor porcentaje posible de la varianza entre las muestras. La contribución de los compuestos mayoritarios a cada componente se recoge en las Tablas A40 y A41 (Anexo I).

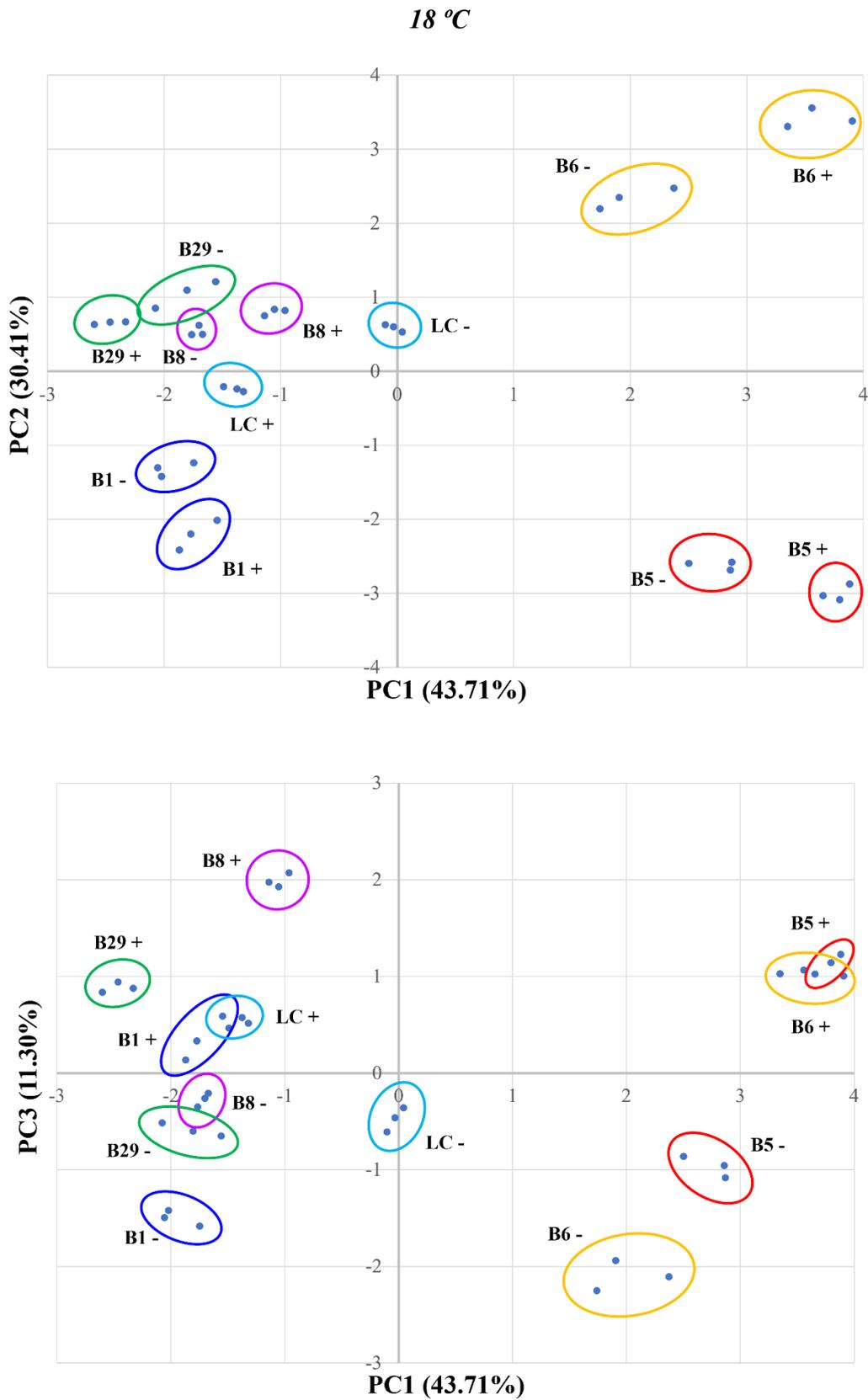


Figura 48. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio a 18 °C, usando los compuestos mayoritarios como variables de clasificación. “+”: 75 mg/L de SO₂ en mostos; “-”: 0 mg/L de SO₂ en mostos.

25 °C

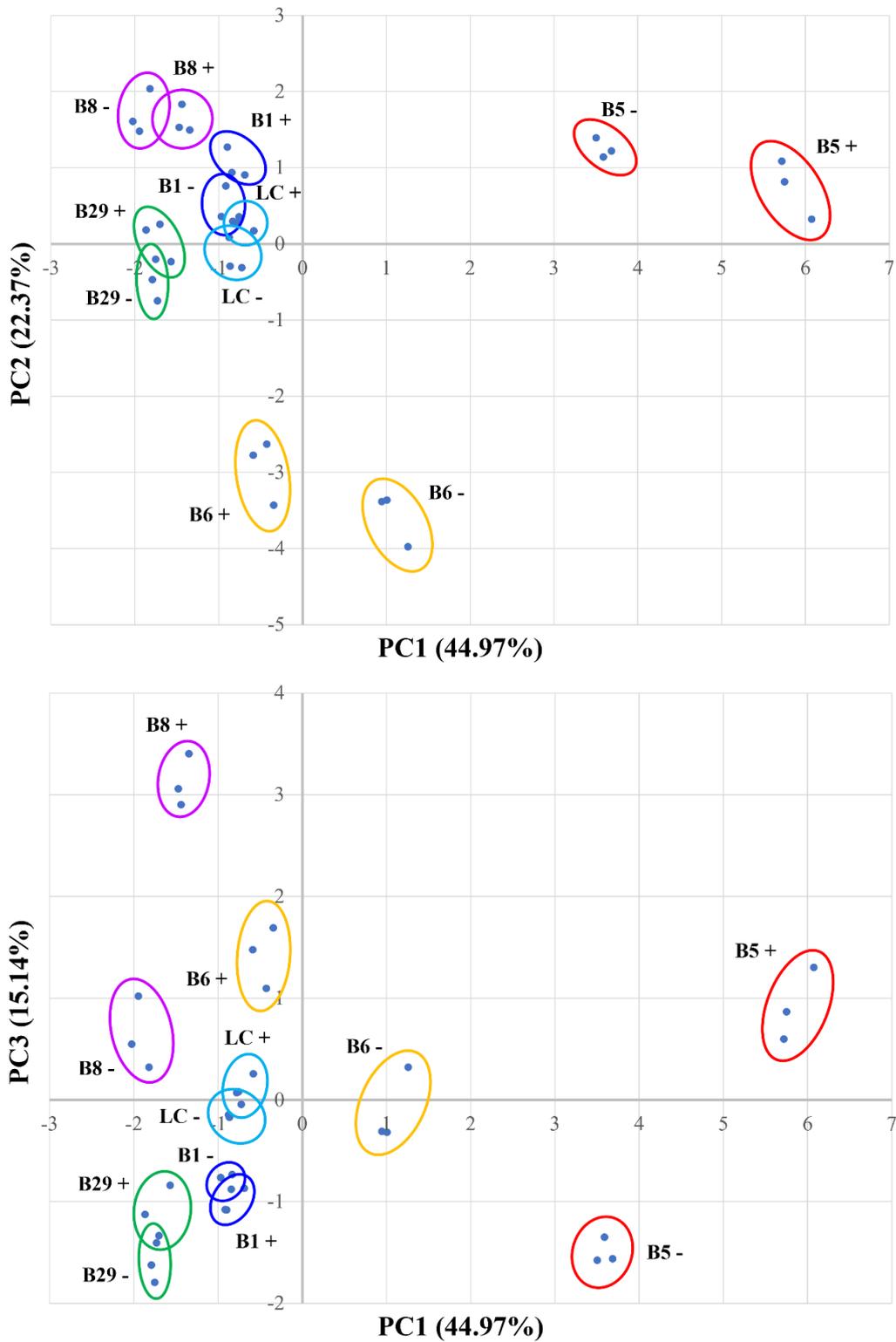


Figura 49. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio a 25 °C, usando los compuestos mayoritarios como variables de clasificación. “+”: 75 mg/L de SO₂ en mostos; “-”: 0 mg/L de SO₂ en mostos.

El primer PCA (Figura 48) analiza las diferencias entre los vinos fermentados por

todas las cepas a 18 °C con y sin SO₂ en base a los niveles de compuestos mayoritarios; y sus tres componentes explican, en conjunto, el 85.42% de la varianza total. La PC1, que explica un 43.71%, separa las muestras fermentadas por las cepas B5 y B6 del resto, mucho más agrupadas entre sí. Los compuestos que influyen mayormente en las diferencias explicadas por esta componente son el 2,3-butanodiol y la glicerina (Tabla A40, Anexo I). La PC2, que explica el 30.41% de la variabilidad total, aísla las muestras de B1 y B5 del resto, además de las fermentadas por LC con y sin SO₂. El acetato de etilo, el isobutanol y los alcoholes isoamílicos son los mayores contribuyentes a las diferencias explicadas por esta componente (Tabla A40, Anexo I). Por su parte, la PC3, responsable de un 11.30% de la varianza total, separa, curiosamente, las muestras obtenidas por todas las levaduras a partir de mostos con SO₂ de aquellas fermentadas en ausencia de este compuesto. Esta componente viene principalmente influida por el acetaldehído, el propanol y los alcoholes isoamílicos (Tabla A40, Anexo I). En general, el PCA que explica la variabilidad entre las muestras obtenidas a 18 °C destaca, en base a los compuestos mayoritarios detectados, que los vinos obtenidos con B5 y B6 resultaron notablemente distintos entre sí y del resto, con una influencia apreciable del SO₂.

En el PCA que representa la variabilidad entre las muestras fermentadas a 25 °C (Figura 49), un 82,48% de la varianza total se explica por las tres primeras componentes. La PC1 es responsable del 44.97%, y refleja diferencias en las muestras obtenidas con B5 con respecto al resto, además de distinguir entre los vinos fermentados por B6 con y sin SO₂. El 2,3-butanodiol, el succinato de dietilo, los alcoholes isoamílicos y el isobutanol son los mayores contribuyentes a las diferencias indicadas por esta componente (Tabla A40, Anexo I). Explicando el 22.37% de la varianza total, la PC2 distingue los vinos fermentados por B6 del resto, así como las muestras de B29 y LC con origen en mostos con y sin SO₂. Los compuestos que influyen en mayor medida a las diferencias explicadas por la PC2 son el propanol, la glicerina y el metanol (Tabla A40, Anexo I). Finalmente, la PC3, responsable del 15.14% de la varianza, separa las muestras de B1 y B29 de las de B8, y expresa diferencias relacionadas con el SO₂ en los vinos de B5. Esta componente está mayormente influenciada por el 2-feniletanol, el acetaldehído y el metanol (Tabla A40, Anexo I). En términos generales, según el PCA de las muestras fermentadas a 25 °C también destaca las diferencias existentes en los vinos de B5 y B6 entre sí y con el resto, con un efecto más discreto del SO₂.

75 mg/L SO₂

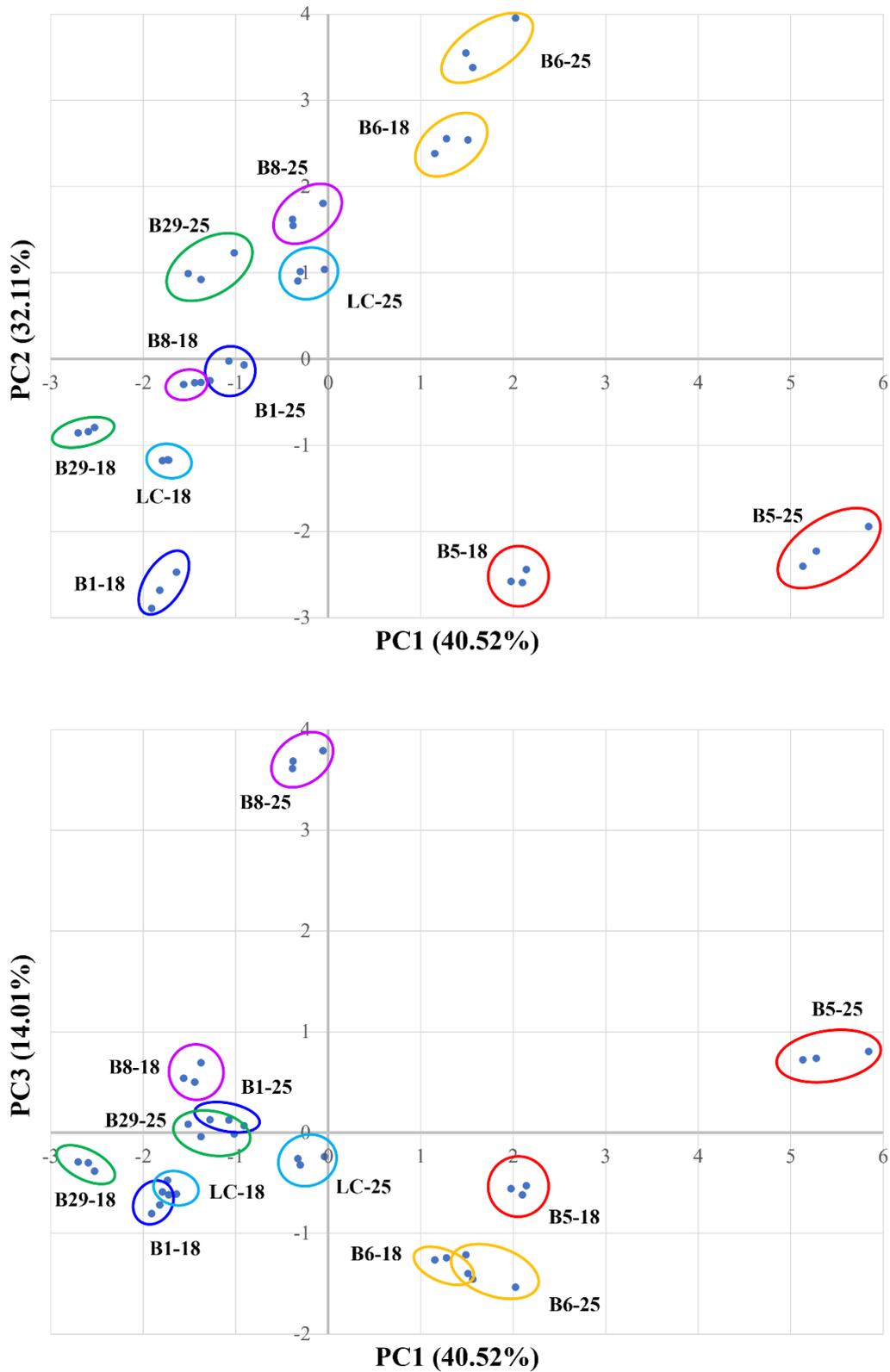


Figura 50. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio con SO₂ en los mostos, usando los compuestos mayoritarios como variables de clasificación. “18”: Fermentación a 18 °C; “25”: Fermentación a 25 °C.

0 mg/L SO₂

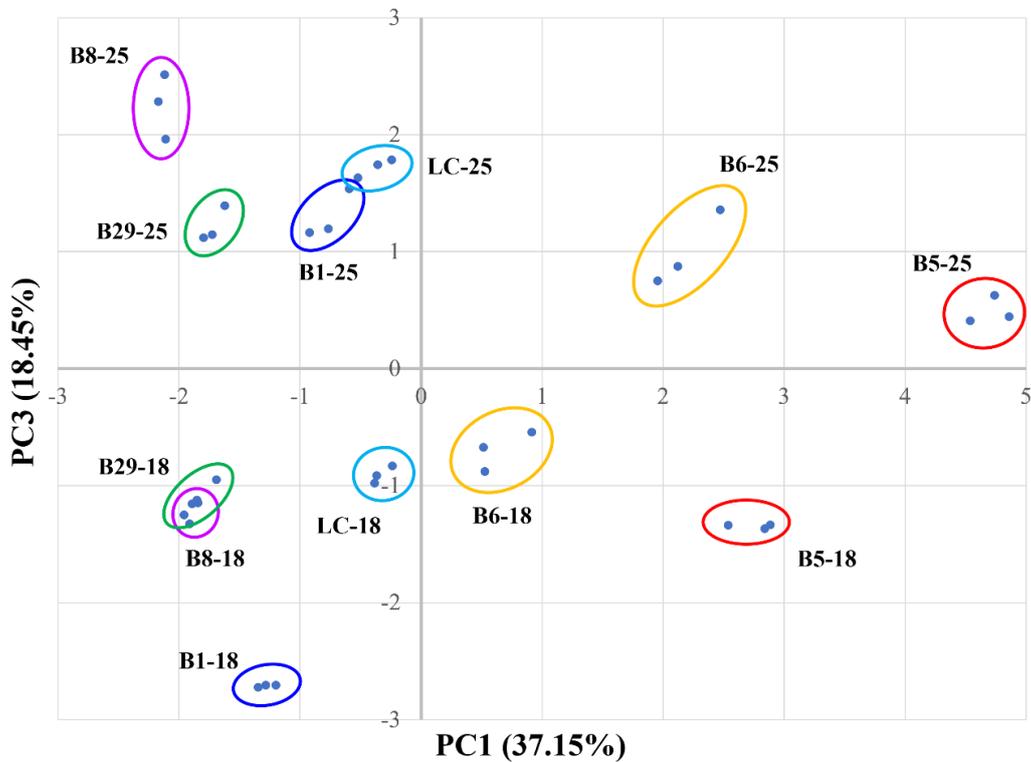
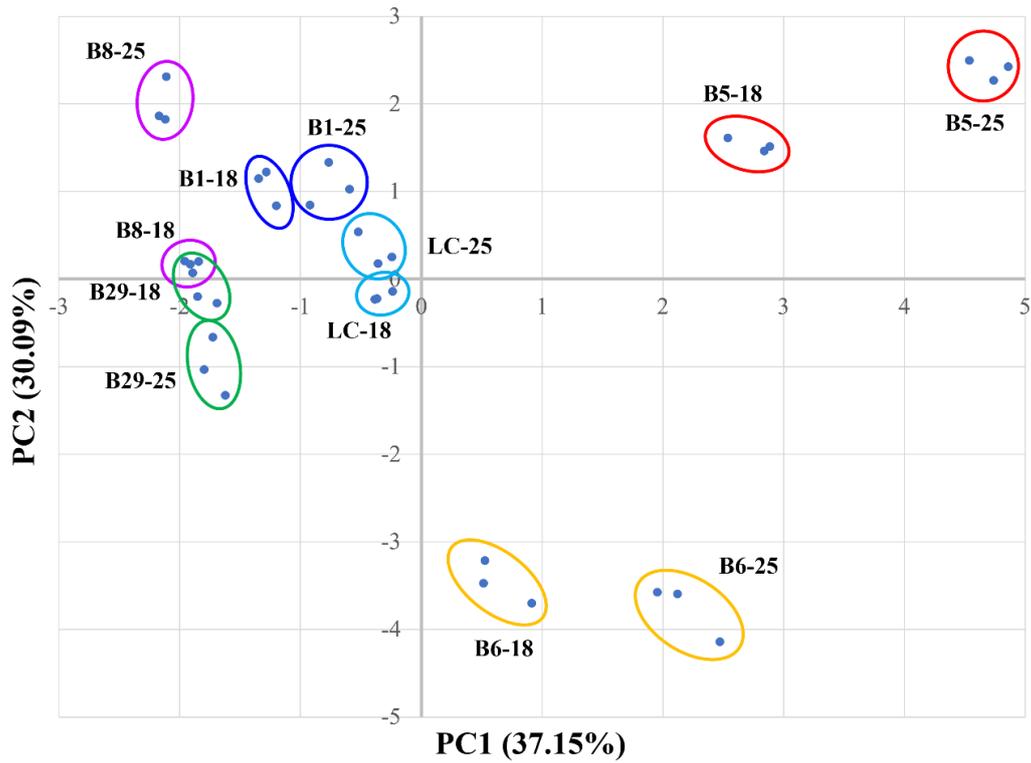


Figura 51. PCA de las muestras de vino fermentadas por las levaduras de estudio sin SO₂ en los mostos, usando los compuestos mayoritarios como variables de clasificación. “18”: Fermentación a 18 °C; “25”: Fermentación a 25 °C.

En el PCA realizado para explicar las diferencias entre los vinos fermentados a partir de mostos con SO₂ (Figura 50), las tres componentes seleccionadas representan un 86.64% de la variabilidad total. La PC1, responsable de un 40.52% de esa varianza, separa de nuevo las muestras de B5 y B6 del resto, siendo el 2,3-butanodiol y el succinato de dietilo los principales responsables de este hecho (Tabla A41, Anexo I). Un 32.11% de la varianza total es explicado por la PC2, que diferencia los vinos obtenidos con B1 y B5 de los de B6; y en cuanto a los del resto de cepas, separa a un lado los fermentados con SO₂ y al otro los obtenidos sin este compuesto. Los alcoholes isoamílicos, el acetato de etilo y el isobutanol fueron los que contribuyeron de forma mayoritaria a las diferencias explicadas por esta componente (Tabla A41, Anexo I). Por su parte, la PC3, responsable del 14.01% de la varianza total, diferencia las muestras de B6 y LC de las de B8, y en menor medida, los vinos obtenidos con B1 y B5 en las distintas temperaturas. La mayor contribución a esta componente viene dada gracias a los compuestos carbonílicos (acetaldehído y acetoína) y a la glicerina (Tabla A41, Anexo I). Vuelve a manifestarse, por medio de este PCA, que los vinos fermentados por B5 y B6 en presencia de SO₂ difieren del resto y entre sí en base a la concentración de compuestos mayoritarios.

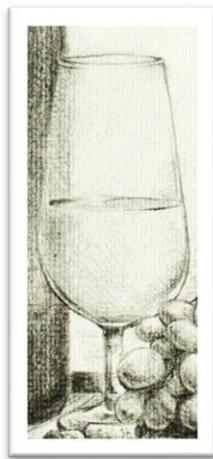
El último PCA representa las diferencias entre las muestras fermentadas sin haber añadido SO₂ a los mostos (Figura 51), y entre las tres componentes seleccionadas para el mismo, se explica un 85.69% de la varianza total. De ese porcentaje, el 37.15% corresponde a la PC1 que, al igual que los anteriores PCAs, distingue las muestras obtenidas con B5 y B6 del resto. El 2,3-butanodiol y el succinato de dietilo son los máximos contribuyentes a la variabilidad explicada por PC1 (Tabla A41, Anexo I), algo bastante común en el resto de PCAs con respecto a esta componente. Por otro lado, la PC2, responsable de explicar el 37.15% de la varianza, separa de forma más clara las muestras de B5 y B6, además de mostrar ciertas diferenciaciones entre los vinos de B29 y B1 y, en menor medida, entre los obtenidos con LC a ambas temperaturas. En este caso, son el metanol, el propanol, el acetato de etilo, el acetaldehído la acetoína los compuestos que más peso tienen en la componente (Tabla A41, Anexo I). Por último, la PC3, que explica un 18.45% de la variabilidad total, separa todas las muestras en base a la temperatura de fermentación, mostrando diferencias notables en todos los casos. Los compuestos con más peso en esta componente son el isobutanol, los alcoholes isoamílicos, el 2-feniletanol y el acetaldehído (Tabla A41, Anexo I). En general, los PCAs que agrupan las muestras en base a la presencia o ausencia de SO₂ también determinaron

que los vinos obtenidos con B5 y B6 diferían notablemente entre sí y del resto, con influencia de la temperatura de fermentación sobre todo en ausencia del compuesto antimicrobiano.

Observando los compuestos que tienen más peso en el conjunto global de los PCAs, destacan los alcoholes isoamílicos y el acetaldehído, dadas las grandes diferencias obtenidas en sus niveles por influencia de la cepa de levadura, la temperatura de fermentación y la presencia de SO₂. El isobutanol y los dos isómeros (*levo* y *meso*) del 2,3-butanodiol también contribuyeron de forma notoria a la variabilidad explicada por las diversas componentes de los PCAs, siendo influidos por los tres factores de estudio salvo por el SO₂ en el caso del 2,3-butanodiol.

Las levaduras que, por los niveles de compuestos mayoritarios de sus vinos, se diferenciaron del resto fueron B5 y B6. Tras observar las concentraciones de cada compuesto y los diversos PCAs, se puede apreciar que, de forma general, los vinos obtenidos con B5 en presencia y ausencia de SO₂ se diferenciaron entre sí debido principalmente al contenido en acetaldehído, estrechamente relacionado con la PC3. Además, la PC1 también ofreció diferencias importantes en las muestras fermentadas por B5 a 18 y 25 °C, esta componente está influenciada fundamentalmente por el 2,3-butanodiol y el succinato de dietilo. Los vinos obtenidos con la levadura B6, por su parte, se diferenciaron también del resto, siendo los niveles de 2,3-butanodiol, glicerina e isobutanol, los compuestos que más contribuyen a esta diferenciación.

4. RESULTADOS



CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL ALTO CONTENIDO EN AZÚCARES Y DE ANHIDRIDO SULFUROSO EN LA EFICIENCIA FERMENTATIVA DE DOS CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SILVESTRES Y UNA CEPA COMERCIAL Y EN EL PERFIL AROMÁTICO DE SUS VINOS

4.3. RESULTADOS. CAPÍTULO 3.

4.3.1. Resumen

A raíz de los resultados obtenidos en el estudio metabolómico del perfil volátil de las muestras tratadas, así como de sus niveles en los parámetros enológicos evaluados, se decidió, tal y como se describe en el Apartado 2 de la Sección de Material y métodos, realizar nuevas vinificaciones en un mayor volumen de mosto. Para ello, se seleccionaron, en principio, tres de las cepas de *S. cerevisiae* evaluadas previamente en los Capítulos 1 y 2 de la Sección de Resultados: las cepas silvestres B6 y B29, y la cepa comercial LC. Dicha experimentación se realizó con el objetivo de evaluar y comparar la cinética de fermentación de las tres levaduras, además de analizar diversos parámetros enológicos y la producción de compuestos volátiles en los vinos resultantes. Los factores condicionantes evaluados fueron la cepa de levadura fermentadora, la concentración inicial de azúcar del mosto y la presencia de SO₂ en el medio. Para estos ensayos se eligieron dos concentraciones de azúcar (220 y 250 g/L) en mostos sin SO₂, testando además una tercera condición en la cual se añadieron 70 mg/L de SO₂ a mostos con 250 g/L de azúcar. Los compuestos aromáticos volátiles, determinados mediante GC-MS, se clasificaron en series aromáticas basadas en descriptores aromáticos.

De los compuestos volátiles analizados, la cepa de levadura influyó en 39, mientras que el contenido de azúcar y el SO₂ afectaron a 16 y 23 compuestos respectivamente. 12 de ellos mostraron valores de actividad odorante superiores a la unidad, con contribuciones notables de los ésteres etílicos, la β -damascenona y la β -ionona, que influyen en las series aromáticas frutales, florales y herbáceas. En general, la cepa de levadura B6 exhibió valores más altos en la serie aromática en comparación con la cepa LC. El análisis multivariado reveló que la cepa B6 destacaba en la serie de fruta verde, cítrica y especiada, mientras que la cepa LC destacaba en aromas ahumados y herbáceos. El análisis de conglomerados y de componentes principales enfatizó que la composición aromática de los vinos producidos con las levaduras silvestres resultó más influenciada por el SO₂ que por el contenido inicial de azúcar, mientras que ocurrió lo contrario con los vinos producidos por la cepa comercial. Las series aromáticas clave que distinguían las muestras de las cepas de levadura eran las series afrutada, fruta verde y cítrica para B6; y herbácea, floral y ahumada para LC. En conclusión, la cepa de

levadura silvestre B6 mostró un comportamiento de fermentación similar al de la cepa comercial, lo que resultó en una mayor presencia de compuestos aromáticos. Los perfiles aromáticos distintivos aportados por cada cepa pueden permitir a los enólogos aprovechar esta diversidad y crear vinos enfatizados en la obtención de aromas específicos.

Todos los resultados correspondientes a esta experimentación fueron publicados dentro de la revista científica *Fermentation*, en el artículo titulado: The effect of yeast, sugar and sulfur dioxide on the volatile compounds in wine (Martín-García *et al.*, 2023). *Fermentation*, 9(6), 541; doi: 10.3390/fermentation9060541. En la publicación, las levaduras B6 y B29 son denominadas Sc1 y Sc5, respectivamente.

A continuación, se expone el artículo correspondiente a dicha publicación (Apartado 4.3.2.) y el material suplementario de la misma (Apartado 4.3.3).

Article

The Effect of Yeast, Sugar and Sulfur Dioxide on the Volatile Compounds in Wine

Francisco José Martín-García, Sandra Palacios-Fernández, Nieves López de Lerma , Teresa García-Martínez , Juan C. Mauricio  and Rafael A. Peinado * 

Agricultural Chemistry, Soil Science and Microbiology Department, Campus Rabanales, University of Córdoba, Building Severo Ochoa, Ground Floor, 14014 Córdoba, Spain

* Correspondence: rafael.peinado@uco.es

Abstract: This study compares three yeast strains: two wild *Saccharomyces cerevisiae* strains (Sc1 and Sc5) and a commercial strain (Lc). The objective is to assess their fermentation efficiency and volatile compound production. The factors examined are yeast strain, initial sugar concentration of the must, and the presence of sulfur dioxide. Volatile aroma compounds, determined via GC–MS, were categorized into aromatic series based on aroma descriptors. Out of the volatile compounds analyzed, the yeast strain influenced 39, while sugar content and sulfur dioxide affected 16 and 23 compounds, respectively. Twelve compounds displayed odor activity values exceeding unity, with notable contributions from ethyl esters, β -damascenone, and β -ionone, impacting fruit, floral, and herbal aromatic series. Overall, the Sc1 yeast strain exhibited higher values in the aromatic series compared to the Lc strain. Multivariate analysis revealed that the Sc1 strain highlighted green fruit, citrus, and spice series, while the Lc strain stood out for smoky and herbal aromas. Cluster and principal component analyses emphasized that the aromatic composition of wines produced with wild yeast strains is more influenced by sulfur dioxide than initial sugar content, whereas the opposite holds true for the commercial strain. The key aroma series distinguishing between yeast strains were fruity, green fruit, and citrus for Sc1, and herbal, floral, and smoky for Lc. In conclusion, the Sc1 wild yeast strain showed similar fermentation behavior to the commercial strain, resulting in increased aroma compound presence. The distinctive aromatic profiles contributed by each strain enable winemakers to leverage this diversity and create wines that emphasize specific aromas.

Keywords: fermentation efficiency; *Saccharomyces cerevisiae*; sugar concentration; sulfur dioxide; volatilome; wild yeast; wine



Citation: Martín-García, F.J.; Palacios-Fernández, S.; López de Lerma, N.; García-Martínez, T.; Mauricio, J.C.; Peinado, R.A. The Effect of Yeast, Sugar and Sulfur Dioxide on the Volatile Compounds in Wine. *Fermentation* **2023**, *9*, 541. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060541>

Academic Editor: Maurizio Ciani

Received: 9 April 2023

Revised: 30 May 2023

Accepted: 1 June 2023

Published: 4 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Spain is considered among the leading countries in wine production and marketing, and its international export levels are among the highest in the world [1]. Many wine regions are distributed throughout the Spanish geography which are dedicated to elaborate wine products of great variety and organoleptic quality [2]. Therefore, among the biggest concerns for the winemaking sector is the increasingly noticeable effect of climate change on vine crops, in addition to its consequences on the production and conservation of wines.

Weather conditions derived from climate change, such as the more irregular rainfall or longer periods of warm temperature each year, increase grapevine vulnerability to water stress and to high salinity levels in the soil [3–5]. Several authors have detailed the consequences of these effects on vine crops. Some of them [6–8] outline the decrease in grape weight, with consequent maturation problems, a notable sugar increase in the grape, and a high alcoholic degree in wines. In addition, a decrease in the contents of tartaric acid and malic acid is described, the second being the most essential in the acidity of the grape [9–11].

In addition, to achieve adequate phenolic maturity, red grapes are subjected to a longer maturation period, which entails a much higher final sugar content in grape. Additionally, the synthesis of aromas together with polyphenols can be inhibited at temperatures higher than 30 °C [9].

On the one hand, there are some studies about the modulation of structural and technical farm characteristics to mitigate injuries in vineyards [12]. Additionally, there are several viticultural practices to minimize the effect of climatic change: (i) minimizing excessive exposure of leaves and clusters, thereby reducing their temperature and shielding them against sunburn, by implementing sprawling trellis systems; (ii) employing late pruning to deliberately delay the phenological cycle by postponing pruning activities; (iii) adjusting the leaf-to-fruit ratio to postpone the harvest date, primarily by impeding the rapid accumulation of sugars and thus achieving a synchronization of phenolic and industrial ripeness; (iv) applying sun protectants to reflect a portion of the solar radiation reaching the plants, resulting in decreased plant temperature [13–16]. Additionally, studies highlight the genetic bases that regulate the resistance of the vine to these stress conditions, seeking to enhance that resistance. Similarly, desired genotypes in the cultivated varieties have been tested, given the greater genetic diversity they expose compared to wild varieties [6]. Nevertheless, despite these mechanisms, climate change continues to have undesirable consequences not only for the plant, but for the product, by altering its organoleptic qualities as well.

Furthermore, wine fermentation by yeasts is conditioned by biotic and abiotic stress. The high sugar level could determine incomplete fermentations that may result in wines with a large amount of residual sugar content and organoleptic defects [17]. On the contrary, a complete fermentation could potentially determine an overly high alcoholic degree in the final product. Therefore, a recent research trend carries the isolation and selection of yeasts trained to ferment musts with solvency under extreme conditions, which could enable obtaining high-quality wines despite the climate change effects [18].

As described by several authors [19,20], the fermentation of must with a high sugar concentration presents numerous challenges for wine yeast. The elevated sugar levels subject the yeast to osmotic stress, which can alter its metabolism, and may also lead to fermentation difficulties and the potential for spoilage by undesirable microorganisms. Additionally, the high sugar concentration can alter the aroma profile of the resulting wines and, as a response to the osmotic stress acetic acid, may be produced in high concentrations [19], which could even hinder the commercialization of the resulting wine. Some research lines open horizons as well to the utilization of different *Saccharomyces* strains or non-*Saccharomyces* yeasts [21] to obtain good-quality wines under climate change conditions. In addition, some of those research trends focus on the utilization of these yeasts to produce wines containing lower ethanol levels [22,23].

To prevent the above-mentioned spoilage, winemakers increase the application of antimicrobial agents such as sulfur dioxide. It is well known that sulfur dioxide application needs to be adequately moderated, since high doses could alter the organoleptic qualities of the product as well as to produce toxicity to the consumer [24,25]. Nevertheless, the use of this compound has become very useful in the winemaking process, since it has multiple advantages such as its antiseptic, antioxidant capability [25].

The aim of this study is to compare two specific wild yeast strains with a commercial strain in terms of their efficiency in fermenting high-sugar musts in the presence and absence of sulfur dioxide. Additionally, the volatile composition of wines produced under these experimental conditions will be compared.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical Standards

The identification and quantification of aroma compounds were carried out with standard solutions of pure compounds of analytical grade, purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), Merck Darmstadt, Germany) and Fluka (Madrid, Spain). Pure water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, MA, USA).

2.2. Yeasts

Three *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains were used in this work. Lalvin Clos[®] (Lc), a commercial strain known by its good fermentative capacity and its high tolerance to the presence of sulfur dioxide in the medium [26], was used as control. Its effect on the oenological parameters, and volatile composition of the resulting wine was compared with the strains, *S. cerevisiae* 1 and *S. cerevisiae* 5 (Sc1 and Sc5), which were isolated and selected by its capability to ferment completely must with high sugar concentration. The screening and selection of both yeasts was carried out by the Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI), Barcelona, Spain.

Yeast inoculum was performed in flasks containing 150 mL of YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose in distilled water), and incubated at 28 °C for 48 h at 165 rpm. Fermentations were conducted in a 250 mL flask containing 150 mL of pasteurized grape must.

2.3. Fermentation Conditions

Pasteurized musts supplied by Baixas Lehnberg, Tarragona, Spain were used for this study. Sugar content was modified by adding sterilized glucose and fructose (equimolecular) to a final content of 220 and 250 g/L. Furthermore, the effects of the presence and absence of sulfur dioxide were studied in musts with 250 g/L sugar. Therefore, 75 mg/L of sulfur dioxide (as potassium metabisulfite) was added to the corresponding flasks.

Three flasks were inoculated for each strain and each experimental condition (220 g/L sugar, 250 g/L sugar, and 250 g/L sugar + 75 mg/L sulfur dioxide) with 1×10^6 cells/mL, resulting a total of 18 flasks. Fermentation was performed at 22 °C.

The evaluation of the fermentation kinetics was made by measuring the loss of weight of the flasks due to the release of CO₂ during fermentation [27,28]. Checkpoints were performed once every 24 h. Fermentation was considered finished when no difference in weight for a given flask was observed in 48 h. The kinetic values were obtained by representing the loss of mass per unit of time during the time of fermentation.

2.4. Determination of Oenological Parameters

Oenological parameters such as pH, titratable acidity, volatile acidity, ethanol and residual sugar content were determined according to the official EEC methods [29]. Glycerol was determined with the enzymatic test of R-Biopharm AG, (Darmstadt, Germany).

2.5. Volatile Compounds Determination

Volatile compounds in must and wines can be classified according to their contents in major volatile compounds (≥ 10 mg/L) and minor volatile compounds (< 10 mg/L). Three biological replicates were used to undertake the analysis.

2.5.1. Major Volatile Compounds

Major volatile compounds and polyols were quantified in a gas HP 6890 Series II chromatograph, from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), equipped with the capillary column CP-WAX 57 CB (50 m in length, 0.25 mm in internal diameter and 0.4 μ m), and a FID, according to the conditions described by Peinado et al. [30]. The 0.5 μ L aliquots of 10 mL wine samples previously supplied with 1 mL of 4-methyl-2-pentanol as the internal standard (1024 mg/L) were injected. Tartaric acid in the wine was previously removed by precipitation with 0.2 g of calcium carbonate, followed by centrifugation at $300 \times g$.

The chromatographic conditions were as follows: a split ratio of 30:1, an FID, and a temperature program involving an initial temperature of 50 °C (15 min), a 4 °C/min ramp, and a final temperature of 190 °C (35 min) were used. The injector and detector temperatures were 270 and 300 °C, respectively. The flow rate of the carrier gas (helium) was initially set at 0.7 mL/min (16 min) and followed by a 0.2 mL/min ramp to the final value (1.1 mL/min), which was held for 52 min. To identify and quantify the analyzed

compounds, standards were injected under the same conditions as the samples. Additional information about LRI to identify volatile compounds is detailed in Table S1.

2.5.2. Minor Volatile Compounds

These compounds were identified and quantified in a two-step process, both described previously in detail by López de Lerma et al. [31]. The first one consists of an extraction procedure using stir bars (film thickness 0.5 mm, 10 mm length, Gerstel GmbH, Mülheim an der Ruhr, Germany). These are placed in a vial containing 10 mL of 1:10 diluted sample and 0.1 mL of ethyl nonanoate (0.4464 mg/L) as the internal standard. After 100 min of stirring at 1500 rpm, the stir bars were removed and inserted into a desorption tube for chromatographic analysis.

The second phase consists of the determination of the volatile compounds in a GC–MS equipped with a Gerstel TDS 2 thermal desorption system. Desorption tubes, containing the stir bars, were heated at 280 °C with the aim of releasing the volatile compounds in a CIS 4 PTV cooling system programmed at 25 °C, which contains a Tenax adsorption tube. Lastly, the CIS is heated to release the volatiles in the GC–MS equipped with an Agilent-19091S capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). The mass detector works in the scan mode at 1850 V and checks the mass from 39 to 300 amu.

To identify the volatile compounds, analytical standards were injected under the same chromatographic conditions as the samples and the retention times together with the Wiley spectral library was used. Quantification was made using calibration curves. Additional information about LRI to identify volatile compounds is detailed in Table S1.

2.6. Calculation of Aroma Series

The odor activity values (OAV) of the volatile compounds were determined as the ratio between concentration and the odor perception threshold. An aromatic series includes the volatile compounds with similar aroma descriptors, and its value is obtained as the sum of the OAVs of the volatile compounds that integrate it. In this way, there were twelve aroma series, namely, chemistry, citrus, creamy, floral, fruity, green, green fruit, herbal, honey, smoky, spice, and waxy. Based on its aroma descriptors, a given volatile aroma compound can be included in one or several aromatic series.

2.7. Statistical Analysis

Multivariate analysis of variance (MANOVA) was carried out to test the differences among the oenological parameters, volatile aroma compounds and aromatic series of the obtained wines under the studied conditions. A footprint of the wines was obtained by multivariate analysis using the aromatic series. Lastly, such aromatic series were used to perform cluster and a principal component analyses. To this end, the statistical software Statgraphics Plus v. 2 from STSC, Inc. (Rockville, MD, USA) was used.

3. Results

3.1. Fermentation Conditions and Kinetics

As described in material and methods section two sugar concentrations (220 and 250 g/L) were chosen to test the assayed strains—220 g/L equals to 12.9% (*v/v*) to 13% (*v/v*) of ethanol, a normal concentration under typical climatic conditions during grape maturation. However, in recent years, increasing temperatures provoke a difference between industrial maturation and phenolic and aromatic maturation. To obtain an appropriate phenolic and aromatic maturation, winemakers, usually, delay grape harvest, which gives rise to increasing sugar contents of the grape (approximately 250 g/L). This high sugar concentration together with the use of sulfur dioxide, mainly as antimicrobial agent, makes it difficult to ensure proper completion of alcoholic fermentation.

Table S2 and Figure S1 show the fermentation kinetics of the three yeast studied. At 220 and 250 g/L of initial sugar content, the yeast Sc5 reaches the maximum amount of CO₂ released. No remarkable differences among yeasts were observed in the time needed

to reach the maximum, and as expected, fermentations finished in a shorter time when the initial sugar content was lower. However, Lc always finished in first place.

On the other hand, the presence of sulfur dioxide was a determining factor in the fermentation kinetics of the three yeasts. In the Sc1 and Sc5 strains, a delay in the beginning of the fermentation was observed in its presence, which did not seem to affect the fermentation rates of Lc as much. Furthermore, sulfur dioxide induced lower maximum rates of daily ethanol production.

3.2. Oenological Parameters

Prior to fermentation, the oenological variables of the must were analyzed providing the results: pH = 3.4 ± 0.1; titratable acidity (g tartaric acid/L) = 6.6 ± 0.1; volatile acidity (g acetic acid/L) = 0.08 ± 0.1.

Among the oenological variables, once the fermentation finished (Table 1), it is surprising that in wines produced by Lalvin Clos yeast (Lc), the residual sugars are above 5 g/L. This commercial yeast is recommended for the fermentation of musts with a high concentration of sugars, so that the inability to finish fermentation may be due to the low levels of nitrogen easily assimilated from the starting must (80 mg/L). However, the two wild yeasts (Sc1 and Sc5) finished the fermentation completely. The few differences observed in the ethanol content are because the conversion rate of sugars into ethanol can vary for each yeast, although it is accepted that 1% (v/v) of ethanol is produced for 17 g/L of sugars [32].

Table 1. Oenological parameters of the wines obtained under the studied conditions. TA: titratable acidity (g tartaric acid/L); VA: volatile acidity (g/L) (g acetic acid/L); RS: residual sugars (g/L). MANOVA: multivariate analysis of variance performed with the factors: yeast strain (yeast), initial sugar content (sugar) and the presence or absence of sulfur dioxide (SO₂).

	220 g/L of Initial Sugars			250 g/L of Initial Sugars			250 g/L of Initial Sugars and 70 mg/L of SO ₂			MANOVA		
	Sc1	Sc5	Lc	Sc1	Sc5	Lc	Sc1	Sc5	Lc	Yeast	Sugar	SO ₂
pH	3.17 ± 0.05	3.28 ± 0.04	3.20 ± 0.04	3.17 ± 0.03	3.28 ± 0.02	3.24 ± 0.02	3.22 ± 0.03	3.26 ± 0.04	3.20 ± 0.03	ns	ns	ns
TA	6.2 ± 0.2	6.3 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.2 ± 0.2	6.25 ± 0.07	6.3 ± 0.1	6.3 ± 0.2	6.2 ± 0.1	ns	ns	ns
VA	0.47 ± 0.03	0.53 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.72 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.96 ± 0.02	1.01 ± 0.02	0.43 ± 0.01	***	**	***
Glycerol (g/L)	6.2 ± 0.2	5.1 ± 0.2	4.6 ± 0.1	6.9 ± 0.3	5.6 ± 0.1	5.2 ± 0.1	7.6 ± 0.3	6.4 ± 0.2	5.8 ± 0.2	***	***	ns
RS	1.8 ± 0.4	0.35 ± 0.07	6.3 ± 0.4	3.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4	7.5 ± 0.7	4.3 ± 0.4	1.5 ± 0.7	8.0 ± 0.7	***	***	ns
Ethanol (% v/v)	12.8 ± 0.1	12.9 ± 0.1	12.9 ± 0.1	14.6 ± 0.1	14.8 ± 0.1	13.9 ± 0.1	14.6 ± 0.1	14.9 ± 0.1	13.9 ± 0.1	***	***	ns

** denotes significant differences at the 99% confidence level; *** denotes significant differences at the 99.9% confidence level; ns denotes no significant differences.

On the other hand, a relation between the initial sugar content of the must and the production of glycerol, as well as with the presence of sulfur dioxide, with the Sc1 yeast being the one that produces the highest glycerol content, is observed. Additionally, it is noteworthy that the two wild yeasts produce higher amounts of acetic acid in wines with initial concentrations of sugar of 250 g/L. This fact was reported in wines produced from must of dried grapes [19]. It is well known that there is a relationship between the production of this compound and that of glycerol, being greater with a higher production of glycerol. Yeasts produce glycerol to protect themselves from osmotic stress and a greater amount of acetic acid is also produced to balance the redox potential [33].

3.3. Volatile Compounds

Table 2 shows the volatile compound concentration determined in wines under the assayed conditions, and the results of the multivariate analysis of variance performed considering the factors of variability. The concentration of a given compound can be influenced by the factors: (i) initial sugar concentration, (ii) yeast strain and (iii) presence of sulfur dioxide.

Table 2. Chemical families and volatile aroma compounds (µg/L, except where indicated), determined in wines obtained under the studied conditions. MANOVA: multivariate analysis of variance performed with the factors: yeast strain (yeast), initial sugar content (sugar) and the presence or absence of sulfur dioxide (SO₂).

	220 g/L of Initial Sugars			250 g/L of Initial Sugars			250 g/L of Initial Sugars and 70 mg/L of SO ₂			MANOVA		
	Sc1	Sc5	Lc	Sc1	Sc5	Lc	Sc1	Sc5	Lc	Yeast	Sugar	SO ₂
Acetate esters (mg/L)	13.8 ± 0.9	6.5 ± 0.4	13.0 ± 0.6	12.4 ± 0.4	6.2 ± 0.2	12.0 ± 0.7	16.2 ± 1.0	10.6 ± 0.3	11.4 ± 0.3	***	ns	***
Isoamyl acetate	112 ± 8	46 ± 3	189 ± 9	158 ± 5	35 ± 3	176 ± 11	81 ± 6	62 ± 2	189 ± 4	***	ns	ns
Ethyl acetate (mg/L)	13.4 ± 0.9	6.27 ± 0.38	12.5 ± 0.6	12.0 ± 0.4	5.94 ± 0.19	11.6 ± 0.7	16.0 ± 1.0	10.5 ± 0.3	11.0 ± 0.3	***	ns	***
2-Phenylethyl acetate	314 ± 21	218 ± 14	237 ± 15	295 ± 22	213 ± 9	217 ± 17	146 ± 9	86 ± 3	259 ± 2	**	ns	**
Hexyl acetate	0 ± 0	0 ± 0	0.62 ± 0.03	0 ± 0	0 ± 0	0.14 ± 0.01	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	***	*	ns
Alcohols (mg/L)	260 ± 12	244 ± 15	220 ± 12	261 ± 1	254 ± 1	198 ± 16	114 ± 5	154 ± 3	240 ± 6	ns	ns	**
Isoamyl alcohols (mg/L)	176 ± 10	174 ± 10	183 ± 11	181 ± 6	176 ± 2	174 ± 1	88 ± 4	125 ± 3	204 ± 5	*	ns	**
2-Phenylethanol (mg/L)	80 ± 3	67 ± 5	32 ± 1	77 ± 6	75 ± 2	19 ± 17	23 ± 1	25 ± 0	32 ± 1	**	ns	***
Hexanol	1832 ± 91	2119 ± 85	2801 ± 97	1748 ± 32	2145 ± 66	2527 ± 84	1214 ± 90	1570 ± 48	2831 ± 93	***	ns	*
2-Ethyl-1-hexanol	1014 ± 92	1056 ± 29	1742 ± 69	451 ± 15	1133 ± 49	774 ± 53	1863 ± 114	1699 ± 115	1622 ± 99	ns	***	***
Dodecanol	45 ± 4	30 ± 2	20.8 ± 0.9	20 ± 1	38 ± 2	19.6 ± 0.6	46 ± 3	71 ± 5	23 ± 1	***	ns	***
Guaiacol	82 ± 4	72 ± 5	55 ± 3	95 ± 5	90 ± 3	61 ± 2	69 ± 5	96 ± 5	43 ± 1	***	**	***
4-Vinylphenol	24 ± 2	14.0 ± 0.7	294 ± 8	20 ± 2	21 ± 1	231 ± 10	12.0 ± 0.7	14.0 ± 0.6	276 ± 12	***	*	ns
2-Methoxy-4-vinylphenol	14 ± 1	11.0 ± 0.4	141 ± 3	10.5 ± 0.6	15.4 ± 0.9	102 ± 8	12.6 ± 0.7	16 ± 1	119 ± 6	***	**	ns
Carbonyl compounds	64 ± 2	55 ± 2	40 ± 2	51 ± 3	57 ± 2	35.8 ± 0.2	77 ± 4	43 ± 2	48 ± 2	***	ns	*
Heptanal	2.0 ± 0.2	1.06 ± 0.05	1.04 ± 0.09	1.15 ± 0.05	0.84 ± 0.07	0.81 ± 0.06	2.4 ± 0.2	1.04 ± 0.06	1.16 ± 0.06	***	***	***
Octanal	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.4 ± 0.2	1.34 ± 0.09	1.14 ± 0.09	1.91 ± 0.09	2.9 ± 0.2	1.66 ± 0.09	2.0 ± 0.1	***	ns	***
Nonanal	15 ± 1	2.4 ± 0.1	4.1 ± 0.2	12.7 ± 0.9	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.2	14.0 ± 0.7	3.5 ± 0.2	4.3 ± 0.2	***	*	**
Decanal	2.9 ± 0.1	0.84 ± 0.07	1.98 ± 0.09	0.79 ± 0.06	1.9 ± 0.1	0.23 ± 0.02	1.9 ± 0.2	2.4 ± 0.2	0.36 ± 0.02	*	*	ns
Benzaldehyde	30 ± 2	31 ± 2	23 ± 2	17.1 ± 0.8	44 ± 1	22.5 ± 0.5	25 ± 2	26 ± 2	34 ± 3	*	ns	ns
6-Methyl-5-hepten-2-one	12.4 ± 0.7	18.3 ± 0.5	7.1 ± 0.4	18 ± 2	6.5 ± 0.3	7.5 ± 0.3	31 ± 2	9.1 ± 0.4	5.2 ± 0.3	***	ns	ns
Ethyl esters	1435 ± 83	934 ± 25	1101 ± 26	1381 ± 25	968 ± 17	1070 ± 37	1429 ± 36	1390 ± 21	1067 ± 6	***	ns	**
Ethyl propanoate	142 ± 10	74 ± 4	108 ± 7	127 ± 10	108 ± 7	71 ± 2	86 ± 4	115 ± 5	71 ± 4	**	ns	ns
Ethyl butanoate	404 ± 26	426 ± 12	464 ± 11	357 ± 11	396 ± 8	447 ± 32	317 ± 8	386 ± 2	425 ± 9	***	**	*
Ethyl 3-methylbutanoate	36 ± 2	1.70 ± 0.09	4.7 ± 0.3	28.9 ± 0.9	4.2 ± 0.2	20.0 ± 0.6	23.7 ± 0.7	3.3 ± 0.1	25 ± 1	***	ns	ns
Ethyl 4-hydroxybutanoate	37 ± 1	18.5 ± 0.8	22 ± 2	47 ± 4	25 ± 1	2.1 ± 0.1	18 ± 1	16.1 ± 0.7	30 ± 2	*	ns	ns
Ethyl hexanoate	246 ± 24	141 ± 7	196 ± 3	337 ± 7	148 ± 2	190 ± 6	263 ± 7	240 ± 4	186 ± 1	*	ns	ns
Ethyl heptanoate	0.54 ± 0.04	1.48 ± 0.09	0 ± 0	0.68 ± 0.04	1.54 ± 0.01	0 ± 0	0 ± 0	0.38 ± 0.03	0 ± 0	***	ns	***
Ethyl octanoate	272 ± 13	189 ± 6	232 ± 6	301 ± 11	193 ± 1	264 ± 10	355 ± 19	254 ± 5	271 ± 2	***	**	***
Ethyl decanoate	223 ± 12	69.6 ± 0.6	51 ± 1	131 ± 10	70 ± 2	62 ± 3	220 ± 9	288 ± 5	46.4 ± 0.9	***	ns	**
Ethyl dodecanoate	68 ± 2	6.2 ± 0.2	4.6 ± 0.2	44 ± 3	13.6 ± 0.9	5.43 ± 0.06	125 ± 7	71 ± 3	3.16 ± 0.03	***	ns	***
Ethyl hexadecanoate	4.88 ± 0.09	7.6 ± 0.4	19.1 ± 0.5	7.1 ± 0.4	9.0 ± 0.4	8.0 ± 0.6	21 ± 2	16 ± 1	8.5 ± 0.5	ns	ns	**
Lactones (mg/L)	57 ± 1	34 ± 1	31 ± 0	41 ± 1	40 ± 0	37 ± 2	36 ± 1	34 ± 1	32 ± 1	***	ns	*
γ-Crotonolactone (mg/L)	33 ± 2	19 ± 1	21 ± 1	26 ± 1	27 ± 1	16 ± 1	27 ± 1	25 ± 1	17 ± 1	***	ns	ns
γ-Butyrolactone (mg/L)	24 ± 1	15 ± 0	9 ± 1	15 ± 1	13 ± 1	21 ± 2	9 ± 0	8 ± 0	15 ± 1	ns	ns	**
γ-Nonalactone	9.3 ± 0.7	9.3 ± 0.6	11.4 ± 0.6	9.2 ± 0.9	10.8 ± 0.6	7.6 ± 0.3	14.7 ± 0.6	11.1 ± 0.5	11 ± 1	*	ns	ns
Valerolactone	51 ± 4	23 ± 2	24 ± 2	47 ± 3	32 ± 2	15.2 ± 0.8	24 ± 2	25 ± 1	31 ± 2	***	ns	ns
Nor-isoprenoids	344 ± 14	295 ± 14	546 ± 34	279 ± 14	300 ± 13	363 ± 11	293 ± 25	227 ± 16	418 ± 10	***	***	ns
β-Damascenone	330 ± 13	286 ± 14	542 ± 34	269 ± 15	292 ± 13	356 ± 10	283 ± 25	221 ± 16	410 ± 10	***	***	ns
β-Ionone	1.47 ± 0.01	1.47 ± 0.03	1.50 ± 0.01	1.47 ± 0.01	1.47 ± 0.01	1.50 ± 0.01	1.46 ± 0.03	1.47 ± 0.01	1.48 ± 0.02	***	ns	ns
Vitispirane	12.7 ± 0.8	7.7 ± 0.5	3.2 ± 0.1	8.6 ± 0.4	6.6 ± 0.5	5.5 ± 0.5	8.8 ± 0.5	4.7 ± 0.4	6.5 ± 0.4	***	ns	ns
Terpenoids	104 ± 3	88 ± 4	118 ± 3	109 ± 5	101 ± 0.2	113 ± 3	113 ± 4	114 ± 5	120 ± 2	***	ns	*
Linalol	1.7 ± 0.2	1.34 ± 0.08	0.60 ± 0.06	1.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2	0 ± 0	8.1 ± 0.6	0.50 ± 0.04	0.32 ± 0.03	**	ns	ns
Limonene	28 ± 1	23 ± 1	22.5 ± 0.7	22 ± 1	20 ± 1	24 ± 1	19.0 ± 0.7	23 ± 1	23 ± 1	ns	*	ns
β-Farnesene	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.2	11.8 ± 0.3	6.2 ± 0.3	6.3 ± 0.1	11.6 ± 0.1	5.8 ± 0.1	6.2 ± 0.3	11.7 ± 0.2	***	ns	ns
E-Nerolidol	17.9 ± 0.6	14.2 ± 0.8	15.8 ± 0.7	20.0 ± 0.9	15.7 ± 0.4	15.0 ± 0.2	21.8 ± 0.9	20.8 ± 0.7	17.4 ± 0.6	***	ns	***
Z-Dihydrofarnesol	17 ± 1	12.7 ± 0.6	21 ± 1	16.7 ± 0.9	14.2 ± 0.4	27 ± 1	26 ± 2	17 ± 1	24 ± 1	***	*	*
Farnesol 3	18.9 ± 0.7	18 ± 1	32.9 ± 0.3	26 ± 2	30.3 ± 0.8	23 ± 1	15.4 ± 0.8	33 ± 2	32.1 ± 0.9	**	ns	ns
Geranyl acetone	15 ± 1	13.0 ± 0.6	12.8 ± 0.2	16.2 ± 0.4	12.5 ± 0.6	12.0 ± 0.3	17 ± 1	13.6 ± 0.9	11.3 ± 0.9	***	ns	ns
Methyl esters	4.4 ± 0.2	5.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2	5.1 ± 0.1	6.7 ± 0.2	5.3 ± 0.2	5.5 ± 0.3	7.5 ± 0.3	5.7 ± 0.2	***	***	*
E-Methyl dihydrojasmonate	4.4 ± 0.2	5.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2	5.1 ± 0.1	6.7 ± 0.2	5.3 ± 0.2	5.5 ± 0.3	7.5 ± 0.3	5.7 ± 0.2	***	***	*

* Denotes significant differences at the 95% confidence level; ** denotes significant differences at the 99% confidence level; *** denotes significant differences at the 99.9% confidence level; ns denotes no significant differences.

Forty-seven volatile compounds were determined, and the chemical families with the highest contents were alcohols, acetate esters and lactones.

As products of the esterification between alcohols and acids during wine fermentation, esters are, in addition to alcohols, the compounds that contribute the most to the aroma of the alcoholic drinks [34]. According to their chemical nature, esters can be classified into acetate esters, ethyl esters and other esters. Altogether, esters confer wines with sweet and fruity-like aromas [31,34]. The influence of the yeast strain on the ester content has been described by many authors [35–37], although they also have a chemical origin in wine [38].

Ten ethyl esters and four acetate esters were detected, and the ethyl acetate content in wines fermented by Sc1 and Lc is greatest. Among the different esters families' acetate esters is the most representative. The levels of acetate esters in all the wines obtained, except for those obtained by Sc5 in the absence of sulfur dioxide, markedly exceeded the odor perception threshold (Table S3), which revealed their contribution to the wine aroma. Furthermore, they were present at lower than the undesirable level (>150 mg/L,) which would have provided the wines a nail polish, varnish and solvent-like aroma. A noticeable contribution to the wine aroma also comes from isoamyl acetate, ethyl propanoate, ethyl butanoate, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl hexanoate and ethyl octanoate, due to their concentration above the perception thresholds. Regarding the influence of sulfur dioxide in the ester levels, a moderate increase was detected in the wines fermented by Sc5. These results are in accordance with those described by Morgan et al. [39]. Nevertheless, these results contrast with other works that described a decrease in the ester content due to the presence of sulfur dioxide [40].

Lactones are cyclic esters produced through the intramolecular condensation of carboxylic acid and alcohol groups. There has been limited research conducted to explore the factors influencing the production of unsubstituted lactones. However, it seems that butyrolactone is generated through yeast catabolism of glutamic acid [38]. Although lactones showed the second highest contents in wines in this study, greater than the contents of γ -crotonolactone and γ -butyrolactone, they were not representative since they do not exceed their odor thresholds. In general, the concentration of the analyzed lactones seems to be dependent only on the yeast strain.

Some alcohols and phenols are pre-existing in musts, and others are released during yeast metabolism [36]. The contents of alcohols and phenols were lower than 300 mg/L in all wines, so they contribute positively to the aroma complexity at these levels [38]. Eight different alcohols were detected, with isoamyl alcohols and 2-phenylethanol having the greatest influence. Isoamyl alcohols are described to confer burnt, alcohol scents to the wines, whereas 2-phenylethanol contributes with floral, rose, honey essences [31]. Both alcohols were present at highly above their thresholds, unlike the rest of the alcohols. Exceptionally, 4-vinylphenol showed appreciable levels in wines obtained by Lc, which could entail little chemical, phenolic nuances in their aromas. Overall, the results highlight that the presence of sulfur dioxide induced lower concentrations of some alcohols, such as isoamyl alcohols, 2-phenylethanol and hexanol, in wines fermented by Sc1 and Sc5. In this sense, Sun et al. [41] provided similar results in wines produced from strawberry fruit. In terms of the other factors, the concentration of the individual alcohols depends, to a high extent, on the yeast strain and, to a lower extent, on the initial sugar content.

Carbonyl compounds, and particularly aldehydes, constitute a significant group of aroma compounds that have the potential to influence the sensory attributes of the ultimate wine product. These compounds are produced during the yeast metabolism of sugars [42], and their production is affected by the presence of sulfur dioxide [43]. Most of the carbonyl compounds detected in the wines were below the odor threshold so they may not have much influence on wine aroma. Nonanal levels in wines fermented by Sc1 had the greatest effect, enriching the overall aroma of those wines with some citrus nuances. The contents of carbonyl compounds were influenced by the strain used, with the lowest levels obtained in wines produced by Lc.

Nor-isoprenoids are ubiquitous flavor compounds and arise from the enzymatic or chemical breakdown of carotenoid pigments. As is reported in the bibliography, β -damascenone has a low sensory threshold and is often reported to have the highest odor activity of any compound in wine [38]. However, it is not an important odorant and its aroma is rarely the dominant sensation perceived in a wine [44], although it can enhance fruitiness associated with esters [45]. Here, β -damascenone was the nor-isoprenoid with the highest concentration, influenced by the yeast strain (highlighting the contents produced by Lc) and the initial sugar concentration of the must.

Terpenoids, are present in the grape and released to the must during prefermentative and fermentative treatments. Their contents are mainly linked to grape variety, although some factors can contribute to change the terpenoid profile of the wine such as enzymatic and chemical transformation [38]. Additionally, yeast autolysis [31], can influence the final content of terpenoids. Seven terpenes were detected in this study, and the wines obtained by the Lc strain had the highest content. Neither the initial sugar concentration nor the presence of sulfur dioxide significantly impacts the majority of the analyzed terpenes.

3.4. Aroma Profile

The aroma of a wine is determined not only by the volatile compounds it contains, considered individually, but also by the interactions among them [46]. Theoretically, by calculating the odor activity value (ratio concentration vs. odor perception threshold), we can obtain information about the influence of a given compound on the wine’s aroma. In this way, volatile compounds with an odor activity value above unity indicate a potential contribution to the wine’s aroma. However, a way of taking into account all aroma compounds is constructing aromatic series as described in the materials and methods section. The ultimate result is obtaining a volatilome fingerprint, which reduces the number of variables to take into account when analyzing differences among oenological treatments. Based on the volatile compounds that show similar aroma descriptors (Table S3), twelve aromatic series were established (Table 3): fruity, green fruit, green, creamy, citrus, chemical, honey, waxy, spice, herbal, floral and smoky. As in the individual aroma compounds, here the influence of initial sugar concentration, yeast strain and the presence of sulfur dioxide were taking into account.

Table 3. Odorant activity values of the aromatic series determined in wines obtained under the studied conditions. MANOVA: multivariate analysis of variance performed with the factors: yeast strain (yeast), initial sugar content (sugar) and the presence or absence of sulfur dioxide (SO₂).

	220 g/L of Initial Sugars			250 g/L of Initial Sugars			250 g/L of Initial Sugars and 70 mg/L of SO ₂			MANOVA		
	Sc1	Sc5	Lc	Sc1	Sc5	Lc	Sc1	Sc5	Lc	Yeast	Sugar	SO ₂
Chemistry	23 ± 1	15.4 ± 0.6	23 ± 1	21.6 ± 0.4	15.1 ± 0.3	21.9 ± 0.8	22 ± 1	18.3 ± 0.4	22.2 ± 0.3	***	*	*
Citrus	12.4 ± 0.6	5.2 ± 0.2	6.9 ± 0.3	9.2 ± 0.6	5.9 ± 0.3	4.8 ± 0.2	12.5 ± 0.6	6.7 ± 0.3	5.5 ± 0.2	***	**	**
Creamy	1.93 ± 0.01	1.28 ± 0.04	1.26 ± 0.03	1.48 ± 0.05	1.51 ± 0.02	1.32 ± 0.05	1.51 ± 0.05	1.33 ± 0.05	1.30 ± 0.07	***	ns	ns
Floral	80 ± 2	71 ± 2	106 ± 5	71 ± 2	74 ± 2	79 ± 2	68 ± 4	58 ± 2	87 ± 2	***	**	ns
Fruity	124 ± 7	80 ± 2	103 ± 3	131 ± 2	84 ± 1	109 ± 3	127 ± 5	104 ± 2	113 ± 1	***	ns	*
Green	1.47 ± 0.07	1.30 ± 0.04	1.45 ± 0.03	1.30 ± 0.06	1.01 ± 0.03	1.33 ± 0.04	1.9 ± 0.1	1.07 ± 0.01	1.45 ± 0.02	***	*	**
Green fruit	30 ± 2	11.3 ± 0.5	15.6 ± 0.3	34 ± 1	12.6 ± 0.2	21 ± 1	27 ± 1	18.4 ± 0.3	21.7 ± 0.2	***	*	ns
Herbal	68 ± 2	62 ± 2	99 ± 5	60 ± 2	63 ± 2	73 ± 2	62 ± 4	53 ± 2	80 ± 2	***	***	ns
Honey	1.25 ± 0.08	0.87 ± 0.06	0.95 ± 0.06	1.18 ± 0.09	0.85 ± 0.04	0.87 ± 0.07	0.58 ± 0.04	0.34 ± 0.01	1.03 ± 0.01	**	ns	**
Smoky	1.49 ± 0.03	1.26 ± 0.06	4.28 ± 0.05	1.57 ± 0.07	1.61 ± 0.06	3.4 ± 0.2	1.25 ± 0.05	1.69 ± 0.08	3.6 ± 0.2	***	ns	ns
Spice	5.1 ± 0.4	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2	4.7 ± 0.3	3.2 ± 0.2	1.52 ± 0.08	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.1	3.1 ± 0.2	***	ns	ns
Waxy	58 ± 3	39 ± 1	48 ± 1	62 ± 2	41 ± 1	53 ± 2	74 ± 4	54 ± 1	55 ± 1	***	*	***

* Denotes significant differences at the 95% confidence level; ** denotes significant differences at the 99% confidence level; *** denotes significant differences at the 99.9% confidence level; ns denotes no significant differences.

All the aromatic series depend on the yeast strain and, except for creamy, smoky and spice series, at least another factor. The chemistry, citrus green and waxy series significantly depend on the three studied factors.

The fruity series has the greatest influence. Values of this series were not influenced by the initial sugar although significantly dependent on the yeast strain and the presence of sulfur dioxide. Furthermore, the wines that showed the highest fruity OAVs were those fermented by Sc1, whereas those fermented by Sc5 showed the lowest levels. This relates directly to their ester levels, highlighting ethyl octanoate, the compound that contributed

the most, ethyl hexanoate and ethyl 3-methyl butanoate. All of them contribute with tropical fruit nuances. Sc1 also highlights the production of aromas related to green fruit notes. Opposite to the fruity series, their contents depend significantly on the initial sugar contents but not on sulfur dioxide. The floral series was the second series with the highest values, highlighting those reached by the Lc yeast strain. As in the case of the green fruit series, their contents are not influenced by the presence of sulfur dioxide.

Among the contribution of the individual aroma compounds to the aromatic series only twelve compounds show odor activity values above unity, and most of them are ethyl esters (ethyl propanoate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl acetate) that contribute, except for ethyl acetate, to the fruity series. Ethyl hexanoate and ethyl octanoate also contribute to the green fruit and waxy series, respectively. Other series such as floral and herbal are mainly influenced by β -damascenone and β -ionone. Ethyl octanoate and β -damascenone are those that contribute the most to wine aroma and, as can be seen in Table 2, depend on the yeast strain and the initial sugar concentration; and in the case of ethyl octanoate, also on the sulfur dioxide.

As reported by other authors [47,48], yeast strain is among the most differentiating factor in relation to the aroma profile of the wines. Here, a limited number of series are affected by the presence of sulfur dioxide and the initial sugar concentration of the must, but all aromatic series are influenced by the yeast strain (Table 3).

3.5. Multivariate Analysis

Figure 1 shows the results of a ray graph obtained by means of multivariate analysis. To construct such a graph, the values of the aromatic series are standardized, so each variable receives equal weight in the visual impression. The unity represents the average value of a given aromatic series. Values above the unity indicate that for a given condition these wines show higher values than the average. As Chambers et al. found [49], by means of this procedure, we can determine the dominant series for a given observation. Figure 1a shows the results obtained when the initial sugar concentration was 220 g/L. The green fruit, citrus and spice series are highlighted in Sc1 whereas the smoky and herbal series stand out for Lc. In general, Sc5 shows values above the median.

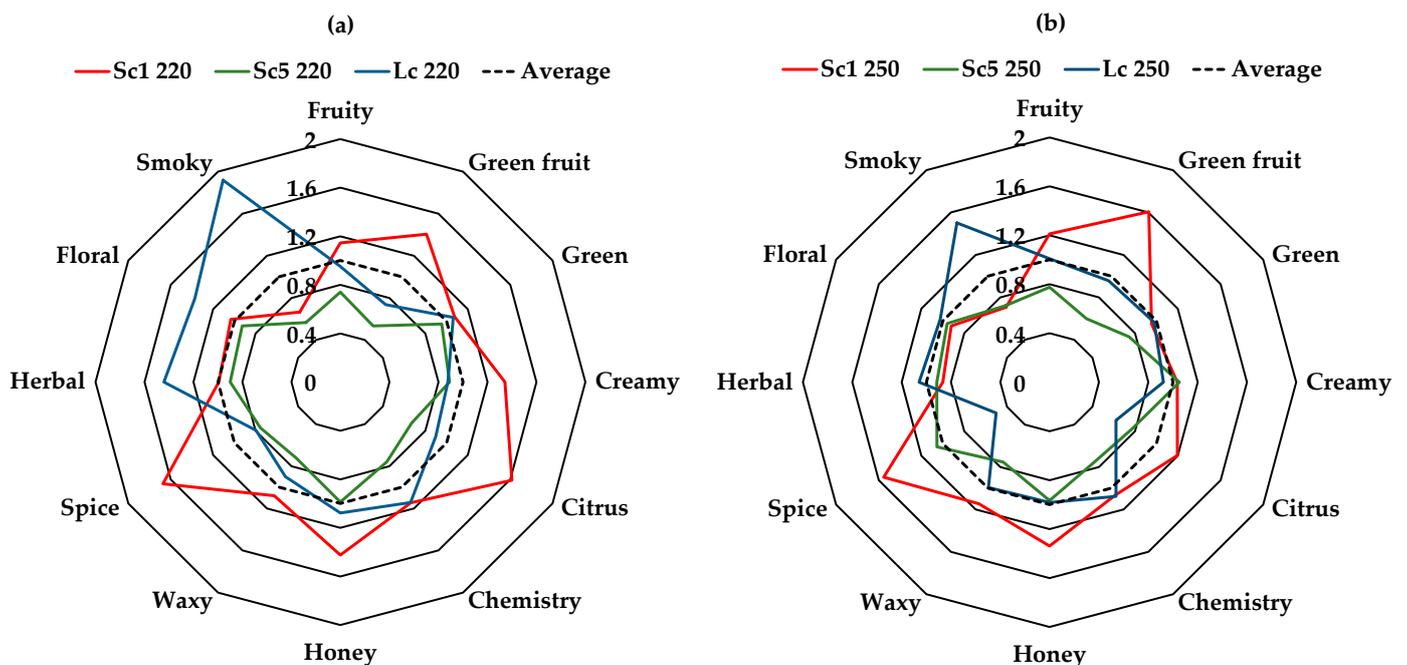


Figure 1. Cont.

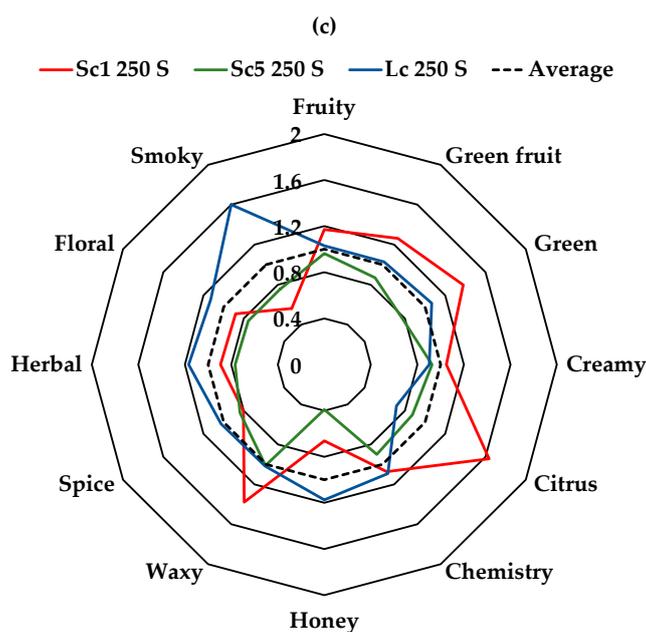


Figure 1. Star plot obtained by multivariate data analysis of aromatic series. (a) musts with 220 g/L w/o SO₂; (b) musts with 250 g/L w/o SO₂; (c) musts with 250 g/L w SO₂.

When the initial sugar concentration was 250 g/L (Figure 1b), the importance of the above-mentioned series diminished for both Sc1 and Lc yeast strains, except for the green fruit series. Additionally, the floral series was decreased for Lc. So, it can be assumed that a reduction in the wine aromas related to such series will be obtained.

On the other hand, the presence of sulfur dioxide (Figure 1c) slightly increases the values of the smoky series and, to a great extent, the spice series for Lc. This last series together with the honey and green fruit series were decreased, whereas the citrus and green series were increased, for Sc1. As in the previous conditions, Sc5 show the lowest values.

3.6. Cluster Analysis

Cluster analysis consists of a multivariate statistical technique with the purpose of grouping sets of samples according to their similarities. To this end, classifying variables are selected. The smaller the distance separating two clusters, the greater the similarity between the samples contained within these clusters. Here, cluster analysis according to Ward’s method was carried out using the aromatic series as classifying variables (Figure 2).

On first sight, we can distinguish two well-differentiated clusters. One of the groups is wines produced by the Sc1 strain, and there is a small distance between wines obtained from musts containing 220 and 250 g/L of sugars. Nevertheless, a major distance is found between wines fermented from musts containing sulfur dioxide, so it can be assumed that sulfur dioxide is a differentiating factor for this yeast strain.

The other cluster groups the wines produced by the Sc5 and LC strains. In a similar way to those obtained by Sc1, wines fermented by Sc5 showed few differences due to the initial sugar contents, and considering the distance that separates the wines produced by Sc5 in the presence and absence of sulfur dioxide, these are more similar to each other than those produced by Sc1. Lastly, taking into account the distance between the different treatments, wines obtained with Lc showed the smallest differences among them. However, in this case, the differentiating factor was the initial sugar concentration.

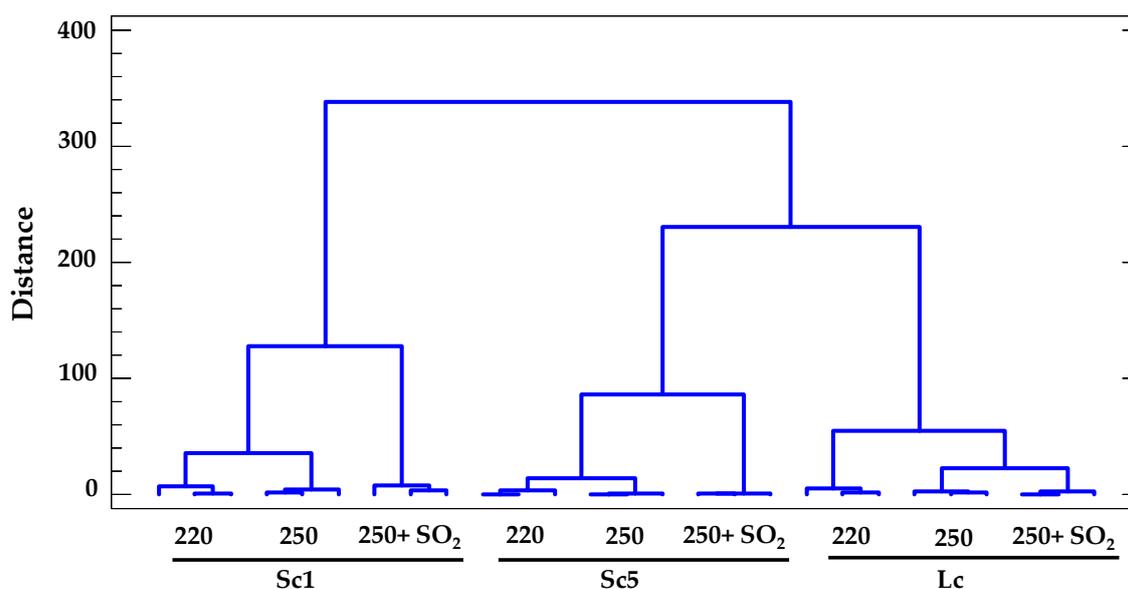


Figure 2. Cluster analysis of the wines obtained by the Sc1, Sc5 and Lc yeast strains under the study conditions. Musts conditions: 220: 220 g/L sugar; 250: 250 g/L sugar; 250 + SO₂: 250 g/L sugar with 75 mg/L SO₂.

3.7. Principal Components Analysis

Principal component (PCA) is a statistical technique used to minimize the number of variables while preserving as much information as possible. The new factors or components are formed by linearly combining the input variables. It is the responsibility of the analyst to interpret the obtained components. Here, a PCA was performed using the values of the aromatic series as classifying variables (Figure 3).

Three components were selected that together 88.6% of the observed variability. The first component (Figure 3a) explains 43.8% and clearly differentiates the strain Sc1, whereas the second component (29.4% of the variability) differentiates the Sc5 and Lc strains. The third component differentiates, in wild yeasts, the wines obtained with and without sulfur dioxide.

Principal component allows us to identify which variables have the greatest impact on the observed differences. The weight of the aromatic series is shown in Table S4. The first component is influenced by the aromatic series, fruit, green fruit and citrus, the second by the herbal, floral and smoky series, and the third component by the honey and spice series.

Regarding these results, in addition to those observed in the cluster analysis, it could be stated that increasing the sugar content in musts did not notably influence the aroma of the wines fermented by Sc1 and Sc5, while the presence of sulfur dioxide determined some differences in their aroma. On the other hand, wines fermented by Lc were not influenced by any of these conditions.

Some authors [39], using principal component analysis, found that the production of volatile metabolites was affected by both yeast strain and sulfur dioxide.

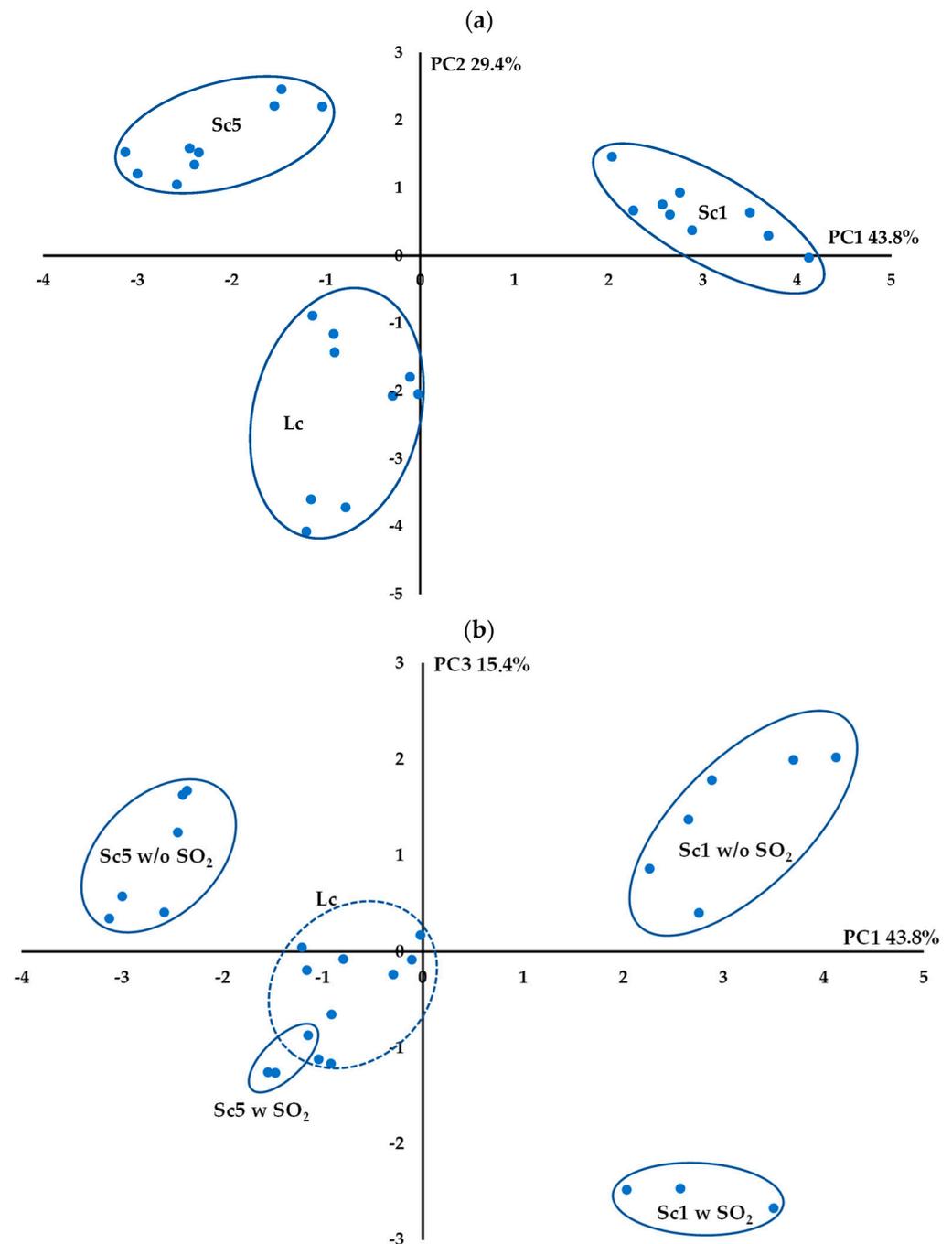


Figure 3. Principal component analysis (PCA) of the wines obtained. (a) represents the interaction between PC1 and PC2, and (b) shows the interaction between PC1 and PC3.

4. Conclusions

The selected yeast strains are capable of fully completing the fermentation of musts with high sugar concentrations, and the presence of sulfur dioxide does not affect its completion. However, there is a delay in the start of fermentation compared to commercial yeast.

The yeast strain is the factor that most influences the volatile composition of wines. In fact, out of the 45 volatile compounds analyzed, 39 of them depend on the yeast strain. Among the different strains tested, the Sc1 yeast strain stands out in terms of aroma production, followed by the commercial yeast strain.

When considering the individual aroma compounds, it is observed that twelve compounds exhibit odor activity values exceeding unity, with most of them being ethyl esters.

These compounds contribute significantly to the fruity aroma series, while others such as β -damascenone and β -ionone contribute to the floral and herbal aromatic series.

The results of multivariate analysis reveal that the Sc1 strain stands out for green fruit, citrus, and spice aromas, while the Lc strain exhibits prominent smoky and herbal notes. Overall, the Sc5 strain demonstrates values above the median. This information can be valuable for winemakers aiming to achieve specific organoleptic characteristics in their wines.

Furthermore, cluster and principal component analyses highlight that the aromatic composition of wines produced with wild yeast strains is more influenced by sulfur dioxide than by the initial sugar content of the must. In contrast, the commercial strain shows the opposite pattern. The fruity, green fruit, and citrus aroma series play a significant role in differentiating between yeast strains, particularly for Sc1, whereas the herbal, floral, and smoky series are more prominent for the Lc strain.

In conclusion, the Sc1 wild yeast strain exhibited a fermentation behavior comparable to that of the commercial yeast, with an increasing content in aroma compounds. However, as each strain contributes a distinct aromatic profile, winemakers can leverage this diversity to craft wines that showcase specific aromas.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/fermentation9060541/s1>, Table S1. Major and minor aroma compounds identified in the wines; Table S2. Fermentation kinetic rates of the *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained after the fermentation period; Table S3. Odor perception thresholds and aromatic series assigned to the volatile compounds; Table S4. Weight of the aromatic series to the component selected in the principal component analysis; Figure S1. Fermentation kinetics of the assayed yeast in the studied conditions.

Author Contributions: Conceptualization, R.A.P. and N.L.d.L.; methodology, R.A.P., J.C.M., T.G.-M. and N.L.d.L.; formal analysis, S.P.-F. and F.J.M.-G.; investigation, S.P.-F. and F.J.M.-G.; data curation, R.A.P. and F.J.M.-G.; writing—original draft preparation, S.P.-F. and F.J.M.-G.; writing—review and editing, R.A.P., J.C.M., T.G.-M. and N.L.d.L.; funding acquisition, R.A.P., J.C.M., T.G.-M. and N.L.d.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministry of Science and Innovation of Spain, grant number TED2021-129208B-100.

Data Availability Statement: The data are available upon request to the authors. Data Availability Statements are available in section “MDPI Research Data Policies” at <https://www.mdpi.com/ethics> (accessed on 1 June 2023).

Conflicts of Interest: All the authors have agreed on and authorized the publication of this manuscript upon the final version. The authors declare that they have no known competing financial interest or personal relationship that could influence the work reported in this paper. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results. This work has not been published previously and it is not under consideration for publication elsewhere. Furthermore, if accepted, it will not be published elsewhere either, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder.

References

1. OIV. Available online: <https://www.oiv.int/es> (accessed on 24 September 2022).
2. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Spain. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es> (accessed on 30 September 2022).
3. Mozell, M.R.; Thach, L. The impact of climate change on the global wine industry: Challenges & solutions. *Wine Econ. Policy* **2014**, *3*, 81–89. [CrossRef]
4. Chaves, M.M.; Zarrouk, O.; Francisco, R.; Costa, J.M.; Santos, T.; Regalado, A.P.; Rodrigues, M.L.; Lopes, C.M. Grapevine under deficit irrigation: Hints from physiological and molecular data. *Ann. Bot.* **2010**, *105*, 661–676. [CrossRef]
5. Grimplet, J.; Wheatley, M.D.; Ben Jouira, H.; Deluc, L.G.; Cramer, G.R.; Cushman, J.C. Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well-watered and water-deficit stress conditions. *Proteomics* **2009**, *9*, 2503–2528. [CrossRef]
6. Van Leeuwen, C.; Roby, J.P. Préservation des ressources génétiques de la vigne. Nécessité d’une cohabitation entre sélection clonale institutionnelle, sélection massale et sélection clonale privée. *Rev. Des. Oenologues* **2013**, *148*, 13–16.

7. Moreno, J.; Peinado, R. *Enological Chemistry*, 1st ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2012. [CrossRef]
8. Jones, G.V.; White, M.A.; Cooper, O.R.; Storchmann, K. Climate Change and Global Wine Quality. *Clim. Chang.* **2005**, *73*, 319–343. [CrossRef]
9. Martínez, A.; Aleixandre-Tudó, J.L.; Aleixandre, J.L. Efectos de los fenómenos producidos por el cambio climático sobre la calidad de los vinos. *Enoviticultura* **2016**, *42*, 4–16.
10. Sweetman, C.; Sadras, V.O.; Hancock, R.D.; Soole, K.; Ford, C.M. Metabolic effects of elevated temperature on organic acid degradation in ripening *Vitis vinifera* fruit. *JXB* **2014**, *65*, 5975–5988. [CrossRef] [PubMed]
11. Ruffner, H.P. Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*—a review. *Vitis* **1982**, *21*, 346–358.
12. Merloni, E.; Camanzi, L.; Mulazzani, L.; Malorgio, G. Adaptive capacity to climate change in the wine industry: A Bayesian Network approach. *Wine Econ. Policy* **2018**, *7*, 165–177. [CrossRef]
13. Reynolds, A.G.; Heuvel, J.E.V. Influence of Grapevine Training Systems on Vine Growth and Fruit Composition: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2009**, *60*, 251–268. [CrossRef]
14. Gatti, M.; Frioni, T.; Garavani, A.; Biagioni, A.; Poni, S. Impact of delayed winter pruning on phenology and ripening kinetics of Pinot Noir grapevines. *BIO Web Conf.* **2019**, *13*, 04002. [CrossRef]
15. De Toda, F.; Sancha, J.; Zheng, W.; Balda, P. Leaf area reduction by trimming, a growing technique to restore the anthocyanins: Sugars ratio decoupled by the warming climate. *Vitis* **2014**, *53*, 189–192. [CrossRef]
16. Dinis, L.T.; Malheiro, A.C.; Luzio, A.; Fraga, H.; Ferreira, H.; Gonçalves, I.; Pinto, G.; Correia, C.M.; Moutinho-Pereira, J. Improvement of grapevine physiology and yield under summer stress by kaolin-foliar application: Water relations, photosynthesis and oxidative damage. *Photosynthetica* **2018**, *56*, 641–651. [CrossRef]
17. Dos Santos, T.P.; Lopes, C.M.; Rodrigues, M.L.; de Souza, C.R.; da Silva, J.M.R.; Maroco, J.P.; Pereira, J.S.; Chaves, M.M. Effects of deficit irrigation strategies on cluster microclimate for improving fruit composition of Moscatel field-grown grapevines. *Sci. Hortic.* **2007**, *112*, 321–330. [CrossRef]
18. Muñoz-Bernal, E.; Rodríguez, M.E.; Benítez, P.; Fernández-Acero, F.J.; Rebordinos, L.; Cantoral, J.M. Molecular analysis of red wine yeast diversity in the Ribera del Duero D.O. (Spain) area. *Arch. Microbiol.* **2013**, *195*, 297–302. [CrossRef]
19. López de Lerma, N.; García-Martínez, T.; Moreno, J.; Mauricio, J.C.; Peinado, R.A. Volatile composition of partially fermented wines elaborated from sun dried Pedro Ximénez grapes. *Food Chem.* **2012**, *135*, 2445–2452. [CrossRef]
20. Caridi, A.; Crucitti, P.; Ramondino, D. Winemaking of must at high osmotic strength by thermotolerant yeast. *Biotechnol. Lett.* **1999**, *21*, 617–620. [CrossRef]
21. Castrillo, D.; Rabuñal, E.; Neira, N.; Blanco, P. Oenological potential of non-Saccharomyces yeasts to mitigate effects of climate change in winemaking: Impact on aroma and sensory profiles of Treixadura wines. *FEMS Yeast Res.* **2019**, *19*, 065. [CrossRef]
22. Xynas, B.; Barnes, C. Yeast or water: Producing wine with lower alcohol levels in a warming climate: A review. *J. Sci. Food Agric.* **2022**, in press. [CrossRef] [PubMed]
23. Alonso-Del-Real, J.; Contreras-Ruiz, A.; Castiglioni, G.L.; Barrio, E.; Querol, A. The Use of Mixed Populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* to Reduce Ethanol Content in Wine: Limited Aeration, Inoculum Proportions, and Sequential Inoculation. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2087. [CrossRef]
24. Hidalgo-Togores, J. Operaciones prefermentativas en las vinificaciones. In *Procesos Prefermentativos. Calidad de uva y Optimización del uso del SO₂*; Ayuntamiento de Haro; Dialnet: Haro, Spain, 2010; pp. 23–62.
25. Abramovič, H.; Košmerl, T.; Poklar Ulrih, N.; Cigić, B. Contribution of SO₂ to antioxidant potential of white wine. *Food Chem.* **2015**, *174*, 147–153. [CrossRef]
26. Lallemend Oenology Catalog. Available online: <https://www.lallemendwine.com/en/china/products/catalogue> (accessed on 15 July 2022).
27. Bely, M.; Sablayrolles, J.; Barre, P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **1990**, *70*, 246–252. [CrossRef]
28. Sablayrolles, J.M.; Barre, P.; Grenier, P. Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnol. Tech.* **1987**, *1*, 181–184. [CrossRef]
29. Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. 2023. Available online: <https://www.oiv.int/en> (accessed on 21 May 2023).
30. Peinado, R.A.; Moreno, J.A.; Muñoz, D.; Medina, M.; Moreno, J. Gas Chromatographic Quantification of Major Volatile Compounds and Polyols in Wine by Direct Injection. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6389–6393. [CrossRef] [PubMed]
31. López de Lerma, N.; Peinado, R.A.; Puig-Pujol, A.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; Garcia-Martinez, T. Influence of two yeast strains in free, bioimmobilized or immobilized with alginate forms on the aromatic profile of long aged sparkling wines. *Food Chem.* **2018**, *250*, 22–29. [CrossRef] [PubMed]
32. Moreno, J.; Peinado, R.A. The transformation of must into wine. In *Enological Chemistry*, 1st ed.; Moreno, J., Peinado, R.A., Eds.; Elsevier: London, UK, 2012; Volume 1, pp. 157–182.
33. Yang, F.; Heit, C.; Inglis, D.L. Cytosolic Redox Status of Wine Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*) under Hyperosmotic Stress during Icewine Fermentation. *Fermentation* **2017**, *3*, 61. [CrossRef]
34. Swiegers, J.H.; Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A.; Pretorius, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 139–173. [CrossRef]

35. Stribny, J.; Gamero, A.; Pérez-Torrado, R.; Querol, A. Saccharomyces kudriavzevii and Saccharomyces uvarum differ from Saccharomyces cerevisiae during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *205*, 41–46. [[CrossRef](#)]
36. Hazelwood, L.A.; Daran, J.-M.; van Maris, A.J.; Pronk, J.T.; Dickinson, J.R. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: A Century of Research on Saccharomyces cerevisiae Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2259–2266. [[CrossRef](#)]
37. Saerens, S.M.G.; Delvaux, F.R.; Verstrepen, K.J.; Thevelein, J.M. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Biotechnol.* **2010**, *3*, 165–177. [[CrossRef](#)]
38. Waterhouse, A.L.; Sacks, G.L.; Jeffery, D.W. *Understanding Wine Chemistry*, 1st ed.; Wiley: Chichester, UK, 2016. [[CrossRef](#)]
39. Morgan, S.C.; Haggerty, J.J.; Johnston, B.; Jiranek, V.; Durall, D.M. Response to Sulfur Dioxide Addition by Two Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Fermentation* **2019**, *5*, 69. [[CrossRef](#)]
40. De Souza, J.C.; Crupi, P.; Colleta, A.; Antonacci, D.; Toci, A.T. Influence of vinification process over the composition of volatile compounds and sensorial characteristics of greek wines. *J. Food Sci. Technol.* **2022**, *59*, 1499–1509. [[CrossRef](#)]
41. Sun, Y.; Zhang, T.; Lü, H.; Yu, Z.; Li, X. Effect of added sulphur dioxide levels on the fermentation characteristics of strawberry wine. *J. Inst. Brew.* **2016**, *122*, 446–451. [[CrossRef](#)]
42. Pretorius, I.S.; Lambrechts, M.G. Yeast and its Importance to Wine Aroma—A Review. *SAJEV* **2000**, *21*, 97–129. [[CrossRef](#)]
43. Frivik, S.K.; Ebeler, S.E. Influence of Sulfur Dioxide on the Formation of Aldehydes in White Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, *54*, 31–38. [[CrossRef](#)]
44. Sefton, M.A.; Skouroumounis, G.K.; Elsey, G.M.; Taylor, D.K. Occurrence, Sensory Impact, Formation, and Fate of Damascenone in Grapes, Wines, and Other Foods and Beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 9717–9746. [[CrossRef](#)]
45. Escudero, A.; Campo, E.; Fariña, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4501–4510. [[CrossRef](#)]
46. Hein, K.; Ebeler, S.E.; Heymann, H. Perception of fruity and vegetative aromas in red wine. *J. Sens. Stud.* **2009**, *24*, 441–455. [[CrossRef](#)]
47. Tang, K.; Sun, Y.; Zhang, X.; Li, J.; Xu, Y. Chemical and Sensory Characterization of Vidal Icewines Fermented with Different Yeast Strains. *Fermentation* **2021**, *7*, 211. [[CrossRef](#)]
48. Guittin, C.; Maçna, F.; Sanchez, I.; Barreau, A.; Poitou, X.; Sablayrolles, J.-M.; Mouret, J.-R.; Farines, V. The Impact of Must Nutrients and Yeast Strain on the Aromatic Quality of Wines for Cognac Distillation. *Fermentation* **2022**, *8*, 51. [[CrossRef](#)]
49. Chambers, J.; Cleveland, W.; Kleiner, B.; Tukey, B. *Graphical Methods for Data Analysis*, 1st ed.; Wadsworth & Brooks: Belmont, CA, USA, 1983.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Identification criteria and quantification

Aroma compounds were subjected to an identification process that involved three stages. Firstly, a tentative identification of metabolites was considered when the similarity values were equal or greater than 75% between the mass spectrum obtained for each chromatographic peak in samples and the mass spectral libraries (NIST-08 and Willey-7). Secondly, a difference lower than 15 units was considered between the linear retention index obtained for each compound through Van Den Dool & Kraft method (LRIC) and those reported (LRIR) in the NIST webbook of Chemistry. Finally, those compounds that did not meet these two requirements, were subjected to a definitive confirmation with the mass spectrum of their relative pure standards.

The quantification process was carried out through the internal standard quantification method, using calibration curves obtained with standard solutions subjected to the same analytical conditions as wine samples. The selection of target and qualifiers ions used for this purpose were performed with the Chemstation software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The calibration curves from compounds with the most similar chemical structures and/or similar number of C atoms was used to estimate the concentration of those volatiles without pure compounds commercially available.



Table S1. Major and minor aroma compounds identified in the wines.

1
2

Compound	Prvt [†]	CAS ^c	LRI ^a	LRI ^b	Slope	Interception	R ²	LOD ^d (µg/L)	LOQ ^e (µg/L)
Acetate esters									
Isoamyl acetate	F	123-92-2	875	876	4.80E-02	1.12E-02	0.984	22	75
Ethyl acetate*	S	141-78-6	906	885	4.96E-03	-3.0E-04	0.998	2.1e+03	7,00E+03
2-phenylethyl acetate	S	103-45-7	1256	1256	6.22E-02	4.10E-03	0.995	3	9
Hexyl acetate	S	142-92-7	1014	1015	1.34E-01	1.65E-02	0.991	5	18
Alcohols									
Isoamyl alcohols ^{†*}	M	123-51-3	1243	1230	8.7E+03	9.0E-03	0.999	4.2E+03	1,40E+04
2-phenylethanol*	S	60-12-8	2011	1892	1,10E-02	2,00E-03	0.999	3.6E+03	1,20E+04
Hexanol	F	111-27-3	867	867	1.00E-03	0.00E+00	0.944	3	11
2-ethyl-1-hexanol	S	104-76-7	1028	1027	1.04E-03	8.30E-06	0.955	11	36
Dodecanol	S	112-53-8	1461	1469	2.60E-03	8.65E-02	0.982	5	17
Guaiacol	S	90-05-1	1091	1088	3.30E-03	1.50E-03	0.933	2	6
4-vinylphenol ¹		2628-17-3	1225	1229					
2-methoxy-4-vinylphenol	S	2785-89-9	1313	1314	2.62E-01	-8.63E-02	0.969	2	8
Carbonyl compounds									
Heptanal	S	111-71-7	903	901	7.90E-03	2.56E-03	0.961	0.4	1.3
Octanal	S	124-13-0	1004	1004	9.10E-03	1.80E-02	0.961	0.2	0.6
Nonanal	S	124-19-6	1104	1103	9.90E-03	1.79E-02	0.979	1.5	4.9
Decanal	S	112-31-2	1206	1206	8.90E-03	1.78E-02	0.959	0.3	1.1
Benzaldehyde	S	100-52-7	958.9	959	5.10E-03	7.00E-03	0.988	3	10
6-methyl-5-hepten-2-one ²		110-93-0	982	987					
Ethyl esters									

Ethyl propanoate	S	105-37-3	708	705	2.20E-03	9.60E-03	0.967	12	39
Ethyl butanoate	S	105-54-4	802	802	7.80E-03	1.03E-03	0.989	23	76
Ethyl 3-methylbutanoate	S	108-64-5	851	847	7.78E-03	1.03E-02	0.989	5	15
Ethyl 4-hydroxybutanoate ³		999-10-0	1826	1819					
Ethyl hexanoate	F	123-66-0	1000	1001	7.02E-02	4.32E-02	0.917	10	34
Ethyl heptanoate ⁴		106-30-9	1102	1095					
Ethyl octanoate	F	106-32-1	1198	1196	1.78E-01	-4.70E-03	0.988	7	25
Ethyl decanoate	F	110-38-3	1395	1397	1.69E-01	6.90E-03	0.976	0.5	1.7
Ethyl dodecanoate	F	106-33-2	1594	1593	1.79E-01	7.10E-03	0.986	0.3	0.9
Ethyl hexadecanoate	F	628-97-7	1992	1996	1.83E-01	-2.60E-03	0.971	0.6	2.1
Lactones									
γ -Crotonolactone	S	497-23-4	913	916	1.00E-04	5.70E-03	0.972	9	29
γ -Butyrolactone	F	96-48-0	918	922	2.00E-04	4.70E-04	0.974	14	47
γ -Nonalactone	M	104-61-0	1363	1362	4.90E-03	-1.00E-04	0.943	1	4
Valerolactone ⁵		108-29-2	970	965					
Nor-isoprenoids									
β -Damascenone	S	23726-93-4	1385	1388	1.13E-02	5.85E-03	0.976	65	215
β -Ionone	S	8013-90-9	1420	1427	1.64E-02	2.89E-03	0.986	0.3	1.1
Vitispirane ⁶		65416-59-3	1279	1271					
Terpenoids									
Linalool	F	78-70-6	1090	1098	3.29E-02	2.50E-03	0.977	7	25
Limonene	S	138-86-3	1022	1030	3.30E-02	2.70E-03	0.976	1	4
β -Farnesene ⁷		18794-84-8	1478	1469					
E-Nerolidol	S	40716-66-3	1564	1562	1.78E-01	-8.09E-02	0.977	3	9
Z-Dihydrofarnesol ⁸		58001-87-9	1579	1587					
Farnesol 3	S	4602-84-0	1728	1740	6.65E-003	2.97E-01	0.992	5	16
Geranyl acetone	S	689-67-8	1442	1450	5.64E-03	6.32E-03	0.976	2	8
Other compounds									

E-Methyl dihydrojasmonate	S	24851-98-7	1661	1649	4.62E-03	4.95E-02	0.968	1.4	4.7
---------------------------	---	------------	------	------	----------	----------	-------	-----	-----

LRI: *Linear retention index* using definition of Van den Dool and Kratz (1963) in a HP-5MS capillary column (30 m/0.25 mm/0.25 µm. He) and *CPWAX57-CB capillary column (60 m/0.25 mm/0.40 µm. He). . ^aCalculated values ^bData collected from the NIST Webbook of Chemistry. <http://webbook.nist.gov/chemistry>. ^cCAS: Chemical Abstracts Service number. ^d LOD: Limit of Detection. ^e LOQ: Limit of Quantification. † Isoamyl alcohols = 2-methylbutanol + 3-methylbutanol.¹Quantified as 2-methoxy-4-vinylphenol.²Quantified as octanal. ³Quantified as ethyl butanoate. ⁴Quantified as ethyl hexanoate. ⁵Quantified as bytyrolactone.⁶Quantified based on internal standard. ^{7,8}Quantified as farnesol. ‡Prv: Standard providers. F: Fluka; M: Merck; S: Sigma-Aldrich.

3

4

5

6

7

8

9



Table S2. Fermentation kinetic rates of the *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained after the fermentation period.

	Sc1			Sc5			LC		
	220	250	250+SO ₂	220	250	250+SO ₂	220	250	250+SO ₂
Maximum dCO ₂ /dt values (g CO ₂ loss/day)	3.36	3.17	2.32	4.19	3.80	1.91	3.06	3.28	2.04
Time required for the maximum dCO ₂ /dt (days)	2±1	2±1	15±1	2±1	2±1	16±1	2±1	2±1	5±1
Fermentation duration (days)	22±1	27±1	33±1	22±1	25±1	34±1	15±1	19±1	22±1

Must conditions: 220: 220 g/L sugar; 250: 250 g/L sugar; 250 + SO₂: 250 g/L sugar and 75 mg/L SO₂.

Table S3. Odor perception thresholds and aromatic series assigned to the volatile compounds.

14

	<i>Perception threshold</i> ($\mu\text{g/L}$)		<i>Perception threshold</i> ($\mu\text{g/L}$)
Chemistry		Citrus	
Ethyl acetate	7500	2-ethyl-1-hexanol	8000
Guaiacol	75	Limonene	10
Isoamyl alcohols	30000	Linalol	6
Limonene	10	Octanal	2,5
4-vinylphenol	180	Nonanal	2,5
Creamy		Decanal	1,25
γ -Butyrolactone	35000	6-methyl-5-hepten-2-one	50
γ -Crotonolactone	35000	Green	
γ -Nonalactone	30	β -Farnesene	20
Floral		Heptanal	3
Damascenone	7	Hexanol	8000
Z-Dihydrofarnesol	20	6-methyl-5-hepten-2-one	50
3-Farnesol	20	E-Nerolidol	700
Geranyl acetone	60	Green fruit	
β -Ionone	0,09	Ethyl 3-methyl butanoate	3
Linalol	6	Ethyl hexanoate	14
E-Nerolidol	700	Ethyl heptanoate	2,2
2-phenylethyl acetate	250	Hexyl acetate	670
2-phenylethanol	10000	Herbal	
E-Methyl dihydrojasmonate	70	Damascenone	7
Vitispirane	800	β -Farnesene	20
Fruity		β -Ionone	0,09
Benzaldehyde	350	Smoky	
Ethyl propanoate	10	Ethyl 4-OH-butanoate	1000
Ethyl butanoate	20	2-methoxy-4-vinylphenol	125,8
Ethyl 3-methyl butanoate	3	Guaiacol	75
Ethyl hexanoate	14	Spice	
Ethyl heptanoate	2,2	δ -5-valerolactone	10
Ethyl octanoate	5	Waxy	
Ethyl decanoate	200	Decanal	1,25
Hexyl acetate	670	Dodecanol	1000
Isoamyl acetate	30	Ethyl octanoate	5
γ -Nonalactone	30	Ethyl decanoate	200
Honey		Ethyl dodecanoate	500
2-phenylethyl acetate	250	Ethyl hexadecanoate	2000

15

16

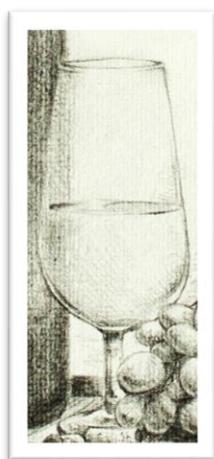
Table S4. Weight of the aromatic series to the component selected in the principal component analysis.

	PC1	PC2	PC3
Chemistry	0,015489	-0,45647	-0,048174
Citrus	0,382706	-0,23986	-0,033364
Creamy	0,336635	-0,12622	0,313825
Floral	-0,31302	-0,30076	0,155008
Fruity	0,252062	-0,35338	-0,095926
Green	0,117833	-0,3388	-0,241462
Green fruit	-0,365359	-0,27941	-0,052648
Herbal	-0,337777	-0,30129	0,0515395
Honey	-0,016694	-0,23512	0,547878
Smoky	-0,392701	-0,23933	-0,049479
Spice	0,272549	-0,13822	0,416798
Waxy	0,287958	-0,28705	-0,279741

17
18

19

4. RESULTADOS



CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE DOS CEPAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (UNA SILVESTRE Y UNA COMERCIAL) CON BUEN POTENCIAL ENOLÓGICO FRENTE A LA ACCIÓN DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN DOS CONDICIONES DE ADICIÓN DE ANHIDRIDO SULFUROSO

4.4. RESULTADOS. CAPÍTULO 4.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos previos, se decidió realizar un análisis del proteoma de dos cepas de levaduras seleccionadas en este estudio (la cepa silvestre B6 y la comercial LC). Como se indica previamente en el apartado de Material y Métodos, se llevaron a cabo nuevas microvinificaciones empleando dichas cepas, y se tomaron muestras a distintos tiempos en dos condiciones, sin adición de SO₂ y con adición de SO₂ (T0: levaduras recién inoculadas en el mosto; T1: 12 horas después del inóculo; T2: cuando el grado alcohólico alcanzó el 7%, v/v). En los tiempos mencionados, se recogieron las células de levaduras por centrifugación para obtener los extractos de proteínas, tal y como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos.

La nomenclatura de muestras proteicas de este estudio se recoge en la Tabla 6:

Tabla 6. Nomenclatura de las muestras procesadas en el estudio proteómico.

<i>Muestra</i>	<i>Levadura</i>	<i>Tiempo de muestreo (T)</i>	<i>SO₂</i>
<i>B6T0 -</i>	B6	T0	-
<i>B6T1 -</i>		T1	-
<i>B6T1 +</i>			+
<i>B6T2 -</i>		T2	-
<i>B6T2 -</i>			+
<i>LCT0 -</i>	LC	T0	-
<i>LCT1 -</i>		T1	-
<i>LCT1 +</i>			+
<i>LCT2 -</i>		T2	-
<i>LCT2 +</i>			+

T0: Tiempo 0; T1: Tiempo 1; T2: Tiempo 2; +: presencia de SO₂ (75 mg/L); -: ausencia de SO₂.

4.4.1. Evaluación cualitativa de perfiles proteómicos por análisis de intersección

Tras el procesamiento de todas las muestras proteicas y su posterior análisis bioinformático, un total de 1587 proteínas fueron detectadas en el conjunto de las muestras evaluadas. De entre estas proteínas, 1443 (B6T0 -: 1389; B6T1 -: 1387; B6T1 +: 1324; B6T2 -: 1365; LCT0 -: 1387; LCT1 -: 1380; LCT1 +: 1388; LCT2 -: 1384; LCT2 +: 1396) fueron identificadas de forma válida, considerándose dicha validación como la detección de la presencia de dichas proteínas en al menos 2 de las 3 réplicas de, al menos, una muestra.

El gráfico de intersección representado en la Figura 52 indica el número total de proteínas válidas que resultaron comunes a diferentes grupos de muestras.

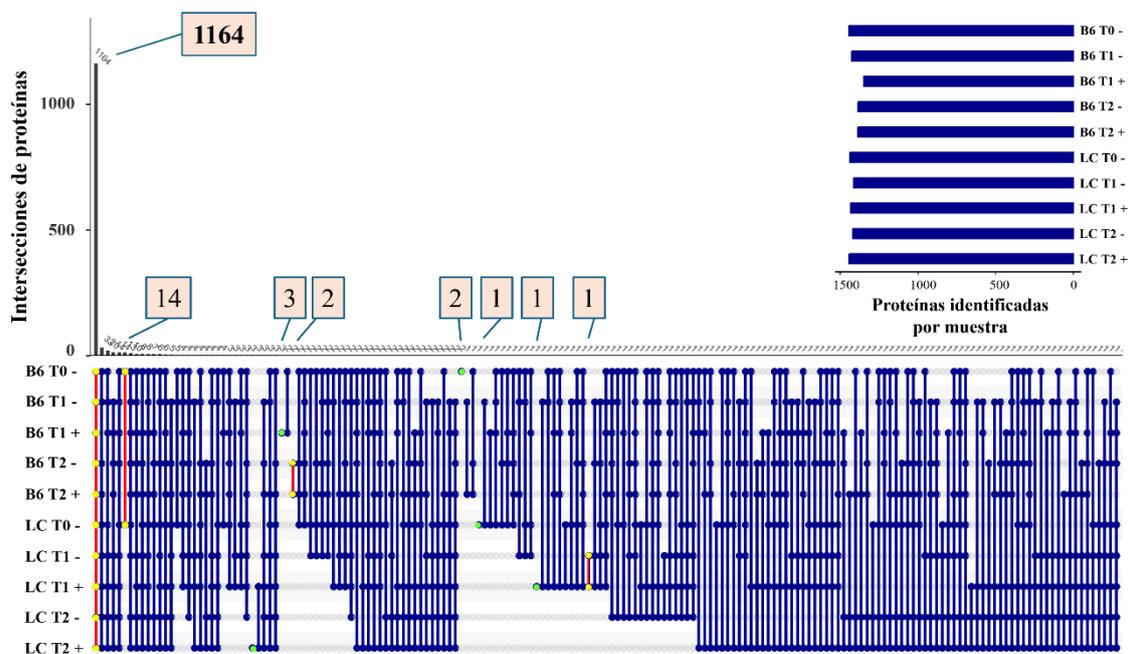


Figura 52. Gráfico de intersección de las proteínas de las levaduras de estudio (B6 y LC) identificadas de forma válida, indicándose el número total de proteínas comunes de cada intersección entre muestras. Las líneas rojas reflejan las intersecciones de interés para el presente análisis, y el número de proteínas comunes a dichas muestras se encuentra resaltado sobre las barras correspondientes. Los puntos verdes corresponden a las proteínas válidas identificadas exclusivamente en una sola muestra. En la esquina superior derecha, se representa el nivel medio de proteínas identificadas en las tres réplicas de cada muestra de estudio.

De estas 1443 proteínas válidas, 1164 resultaron comunes a todas las muestras testadas, lo que supone un 80.7% de proteínas encontradas en todas las condiciones de estudio. En la Figura 52, esta intersección corresponde a la primera barra, identificada en el diagrama con la primera línea roja. Sin embargo, no se observan intersecciones que agrupen las muestras según la levadura fermentadora, lo que indicaría la ausencia de proteínas identificadas como exclusivas de cada cepa. Sí que se dan, ocasionalmente, proteínas válidas encontradas exclusivamente en una muestra, aunque representan un porcentaje muy reducido con respecto al total. Es el caso de muestras como B6T0 - (2 proteínas), B6T1 + (3 proteínas), LCT0 - (una proteína) y LCT1 + (una proteína), indicadas en la Figura 52 con los puntos verdes. Se dieron también intersecciones algo menos representativas, como la existente entre las muestras de ambas levaduras en T0 (B6T0 - y LCT0 -), con 14 proteínas afectadas; la conformada por las muestras de B6 obtenidas en T2 en presencia y ausencia de SO₂ (B6T2 + y B6T2 -), incluyendo 2 proteínas; y la que agrupa las muestras con y sin SO₂ de la cepa LC en T1 (LCT1 + y LCT1 -), con una proteína exclusiva en común. En la Figura 52, dichas intersecciones se muestran con líneas rojas, a excepción de la primera.

Estos resultados evidencian una escasa influencia de la cepa de levadura y del SO₂ en la variabilidad del perfil proteómico de las muestras, observándose también poca influencia del tiempo de muestreo.

4.4.2. Análisis de agrupamiento jerárquico de proteínas por patrones de cuantificación

En primer lugar, los valores de intensidad de cuantificación de las 1164 proteínas identificadas como válidas y presentes en al menos 2 de las 3 réplicas de todas las muestras fueron normalizados mediante tipificación por *z*-score (valores de -2 a 2). Posteriormente, se estableció un agrupamiento jerárquico del proteoma de todas las muestras en base al patrón de cuantificación de cada proteína en las diversas condiciones de estudio. La Figura 53 representa un mapa de calor o 'heat map' que compendia todos los grupos o 'clusters' de proteínas que presentaron un patrón de cuantificación similar. Las 1164 proteínas detectadas en, al menos, 2 de las 3 réplicas de todas las muestras (primera línea roja de la Figura 52) se agruparon en un total de 13 clusters, cada uno correspondiente a un patrón de cuantificación diferente.

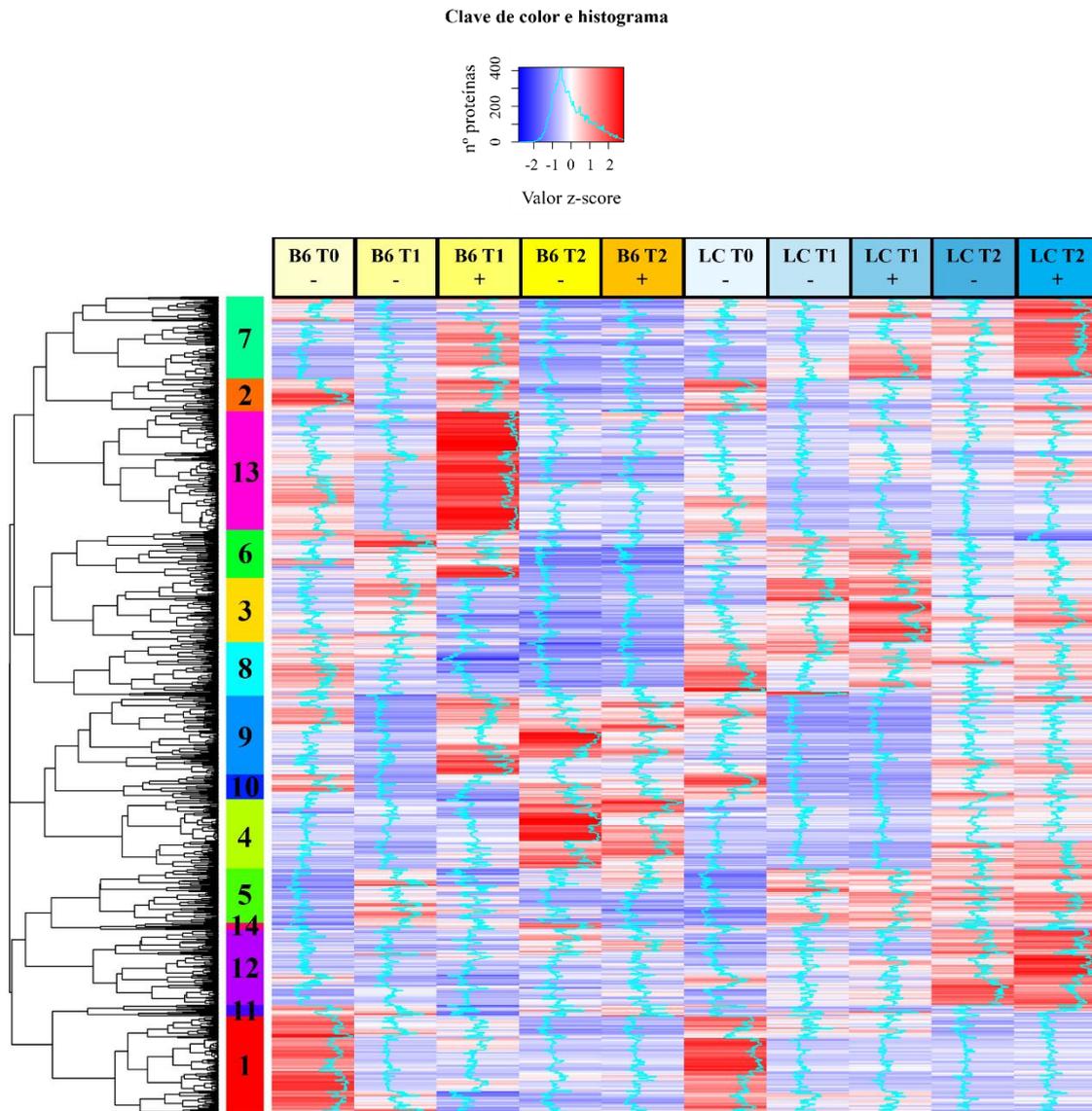


Figura 53. Mapa de calor que representa el agrupamiento jerárquico de las proteínas identificadas como válidas y detectadas en todas las muestras de estudio (fila de arriba). Los números en las celdas de diferentes colores se corresponden con los diversos clusters construidos. La anchura de los clusters depende del número de proteínas que los comprenden. Valores de z -score positivos: intensidad de cuantificación por encima de la media (expresados al alza; color rojo creciente); valores de z -score negativos: intensidad de cuantificación por debajo de la media (expresados a la baja; color azul creciente); valores de z -score cercanos a 0: intensidad de cuantificación próxima a la media (color claro – blanco).

El patrón de cuantificación correspondiente al primer cluster (1), que comprende un total de 139 proteínas ($n = 139$), se caracteriza por una marcada diferencia entre las muestras proteicas de ambas levaduras obtenidas en T0 con respecto al resto. De este modo, se observa que estas proteínas fueron detectadas con una intensidad de cuantificación muy alta en relación con el resto de tiempos de muestreo; aunque

también es apreciable que, en T1 y T2, la intensidad de cuantificación de las proteínas fue decreciendo hasta niveles cada vez más reducidos, incrementándose la proporción de proteínas expresadas a la baja sobre todo en T2. El segundo cluster (2), con 47 proteínas ($n = 47$), no presenta un patrón específico de cuantificación, aunque sí se observa una ligera expresión al alza de sus proteínas en las muestras de ambas levaduras recogidas en T0. El patrón de intensidad del tercer cluster (3), que incluye 92 proteínas ($n = 92$), expresa mayores niveles de cuantificación en el proteoma de la cepa LC con respecto al de B6, dándose, para cada levadura, la expresión más a la baja en T0. En el caso del cuarto cluster (4), que agrupa 99 proteínas ($n = 99$), muestra una tendencia clara de expresión proteica al alza en T2 para ambas cepas, destacando ligeramente en las muestras de B6. El quinto cluster (5), por su parte, comprende 77 proteínas ($n = 77$), describe un patrón de cuantificación que pone de manifiesto una expresión a la baja de proteínas en T0 para las dos levaduras, creciendo la intensidad en T1 y T2. Las muestras proteicas de LC, en este caso, destacaron por su expresión al alza por encima de las de B6. El sexto cluster (6) está conformado por 68 proteínas ($n = 68$) de patrón de cuantificación similar caracterizado, para ambas levaduras, por la expresión al alza de dichas proteínas en T0 y, sobre todo, en T1, reflejándose una fuerte tendencia a la pérdida de intensidad en T2. En cuanto al séptimo cluster (7), compuesto por 117 proteínas ($n = 117$), existe una ligera inclinación a la mayor expresión de dichas proteínas en LC que en B6 y, para ambas cepas, la intensidad aumentó en presencia de SO_2 . Son 76 ($n = 76$) las proteínas que se incluyen en el octavo cluster (8), y su expresión fue disminuyendo con la progresión del proceso fermentativo, atendiendo a su intensidad decreciente a mayor tiempo de muestreo. También se observa que dicha intensidad fue mayor en LC que en B6. En el noveno cluster (9) se agrupa un total de 112 proteínas ($n = 112$). La tendencia para ambas levaduras fue, generalmente, una fuerte expresión a la baja en T1, aunque en el caso de B6, este efecto no es tan claro. En el resto de tiempos de muestreo, la intensidad de expresión resultó notablemente más alta. El décimo cluster (10) comprende un reducido número de proteínas ($n = 35$) con un patrón de expresión similar al cluster 9, pero su tendencia es visiblemente más clara. También se observa un patrón parecido en el undécimo cluster (11), conformado por un reducido número de proteínas ($n = 16$). Sin embargo, en este grupo, la diferencia entre tiempos de muestreo resultó mucho más leve, aunque sí se apreció una expresión mayor de estas proteínas por parte de B6. El duodécimo cluster (12) está compuesto por 106 proteínas ($n = 106$) caracterizadas por un patrón de expresión con tendencia al alza a

medida que aumentan los tiempos de muestreo. En el caso de la cepa LC, este efecto resultó mucho más acusado, mostrándose una gran intensidad de expresión de estas proteínas en T2. El cluster más numeroso es el 13, conformado por 169 proteínas ($n = 169$). En él, solo una de las muestras (B6T1 +) ofreció una intensidad marcadamente más elevada que el resto, identificándose como el punto álgido de la fase exponencial de la fermentación, donde se da el mayor nivel de expresión proteica descrito por autores como Ghaemmaghami *et al.* (2013) y Salvadó *et al.* (2008). Por el contrario, el cluster más pequeño es el 14, con tan solo 10 proteínas ($n = 10$), y su tendencia tampoco es específica, aunque una de las muestras (B6T2 -) presentó una expresión al alza con respecto al resto.

4.4.3. Evaluación de la expresión de proteínas de respuesta a estrés

Las 1587 proteínas detectadas como válidas fueron sometidas a un análisis ANOVA unidireccional y post-hoc Tukey para determinar el número y la identidad de aquellas que, comparando entre las muestras de estudio, pudiesen mostrar diferencias significativas en su expresión. Al asignar un q -value < 0.05 , un total de 725 proteínas fueron seleccionadas por su intensidad de expresión significativamente distinta entre las muestras, mientras que, asignando un q -value más estricto (q -value < 0.01), fueron 547. En ambos casos, resultaron ser números muy elevados que, debido a la enormemente variada naturaleza de las proteínas en cuestión, serían difíciles y poco útiles de abordar. Según las condiciones ambientales determinadas para las fermentaciones del presente estudio (250 g/L de azúcar en mosto y dos dosis (0 y 75 mg/L) de SO₂), se decidió realizar un filtro de proteínas cuya naturaleza se relacionase con procesos biológicos de respuesta a estrés, concretamente, a dos tipos: osmótico y oxidativo. Al ajustar un q -value < 0.05 , fueron 28 las proteínas con diferencias significativas de expresión entre las muestras y que, además, estuvieran involucradas en los procesos de respuesta a, al menos, un tipo de estrés de los anteriormente mencionados. Esta selección permitió realizar diagramas radiales agrupando las proteínas según el tipo de estrés al que más se asociaban, buscándolas por GO-Terms en Uniprot. Se consideraron, para este estudio, cinco comparativas diferentes de la expresión de proteínas de respuesta a estrés entre muestras:

- Tiempo 0 (T0) por parte de ambas levaduras;

- Tiempo 1 (T1) en presencia (+) y ausencia (-) de SO₂, por ambas levaduras (B6 y LC);
- Tiempo 2 (T2) en presencia (+) y ausencia (-) de SO₂, por ambas levaduras (B6 y LC);
- Todos los tiempos (T0, T1 y T2) en presencia (+) y ausencia (-) de SO₂ por la cepa B6;
- Todos los tiempos (T0, T1 y T2) en presencia (+) y ausencia (-) de SO₂ por la cepa LC.

4.4.3.1. Proteínas de respuesta a estrés osmótico

La Tabla 7 recoge las 11 proteínas relacionadas con procesos de respuesta a estrés osmótico por parte de las levaduras de estudio cuya expresión resultó significativamente diferencial (q -value < 0.05) entre las muestras evaluadas. Sus números de acceso, así como los clusters donde se incluyen las proteínas según su patrón de cuantificación, también están indicados en la tabla.

Tabla 7. Proteínas de respuesta a estrés osmótico cuya expresión es significativamente diferencial entre las muestras de estudio, con un q -value < 0.05.

AN	Descripción	Cluster
P16649	Correpresor transcripcional general TUP1	5
P22943	Proteína de choque térmico por calor de 12 kDa	1
P25343	Proteína 161 de viabilidad reducida por inanición	12
P32485	Proteína quinasa HOG1 activada por mitógenos	7
P32563	Subunidad A de la ATPasa de protones tipo V (isoforma vacuolar)	12
P34160	Subunidad 1 del complejo proteico de unión a la membrana nuclear	-
P40106	Glicerol-1-fosfato fosfohidrolasa 2	12
P50263	Proteína SIP18	-
P54000	Subunidad 1 del coactivador transcripcional de la ARN polimerasa II	13
Q06151	Difosfatasa m7GpppX	2
Q12123	Difosfatasa inactiva DCS2	2

AN: Número de acceso. “-“: proteína no asociada a cluster por no encontrarse en, al menos, 2 de las 3 réplicas de todas las muestras.

Con esta selección de proteínas de respuesta a estrés osmótico se llevó a cabo una tipificación de los valores de intensidad de expresión por z -score (valores de 0 a 1), y se elaboró un diagrama radial, teniendo como objetivo visualizar las diferencias entre las muestras de extractos proteicos, comparando las diversas condiciones experimentales. En la Figura 54 se representan los valores estandarizados y tipificados de expresión de proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico, identificadas por su

AN, previamente al comienzo de la fermentación (T0 de muestreo) por parte de las dos cepas de estudio, analizándose también la presencia o ausencia de SO₂ en los mostos de partida.

B6 y LC. Respuesta a estrés osmótico (T0)

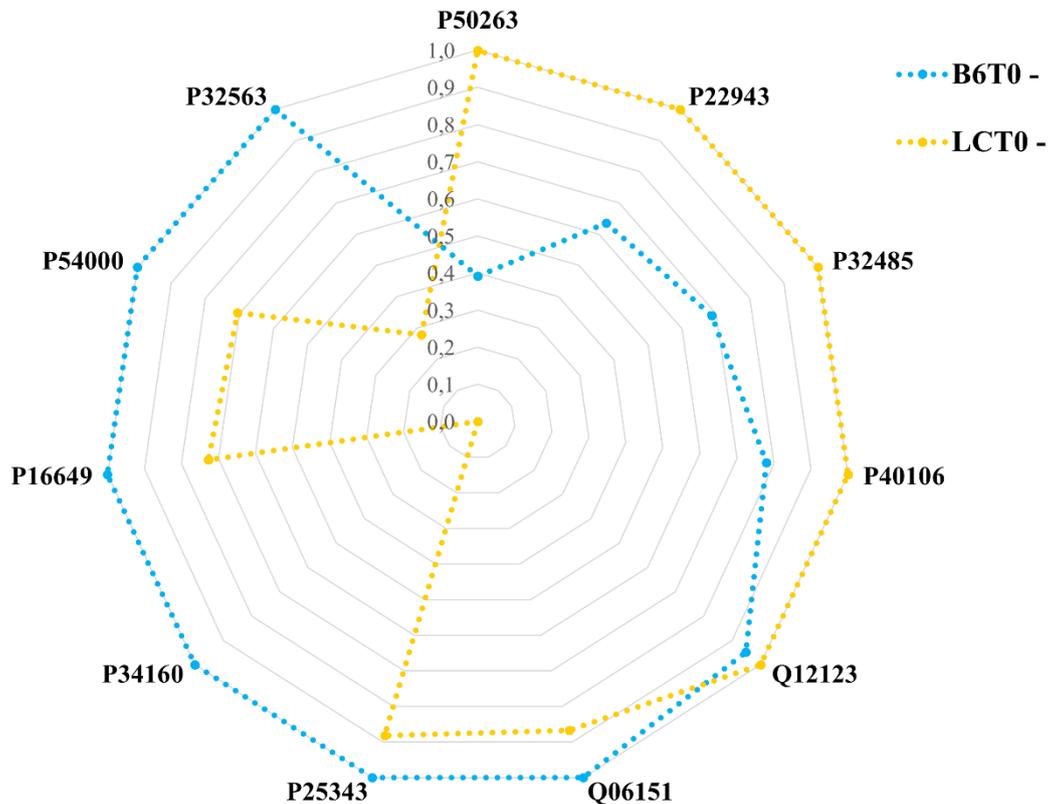


Figura 54. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0,05), identificadas por su AN, en el T0 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en ausencia (-) de SO₂ (valores tipificados por z -score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras sin SO₂ (discontinua).

Previamente al inicio de la fermentación (T0), las diferencias observadas en la intensidad de expresión proteica se deben únicamente a la cepa de levadura en las condiciones del inóculo y sin la adición de SO₂. La proteína que reflejó una mayor diferencia de expresión entre levaduras a T0 fue la subunidad 1 del complejo proteico de unión a la membrana celular (AN: P34160), no siendo detectada en la cepa B6. Esta proteína se expresa en el núcleo y la región perinuclear, y según Garre *et al.* (2012), dicha expresión resulta necesaria para la reprogramación rápida de la traducción del

ARNm a proteínas tras un choque hiperosmótico. La intensidad de la subunidad A de la ATPasa de protones tipo V (isoforma vacuolar) (AN: P32563) también fue bastante mayor en la cepa LC a T0. Esta isoforma se localiza en la vacuola y su complejo estructural hidroliza ATP y transloca protones a través de la membrana vacuolar. Su función se ha descrito, entre otros, por Banerjee *et al.* (2019), indicando que la mutación por delección del gen que codifica para esta subunidad proteica puede conducir a un crecimiento defectuoso de la célula cuando está sometida a estrés osmótico. Por otra parte, se observó una mayor expresión de la proteína SIP18 (AN: P50263) por la cepa B6 a T0. Esta proteína, que se localiza en el citoplasma y cuya función molecular es de unión a fosfolípidos, se asocia con la respuesta celular a la falta de agua como mecanismo de tolerancia al estrés hídrico (Dang & Hinch, 2011).

B6 y LC. Respuesta a estrés osmótico (T1)

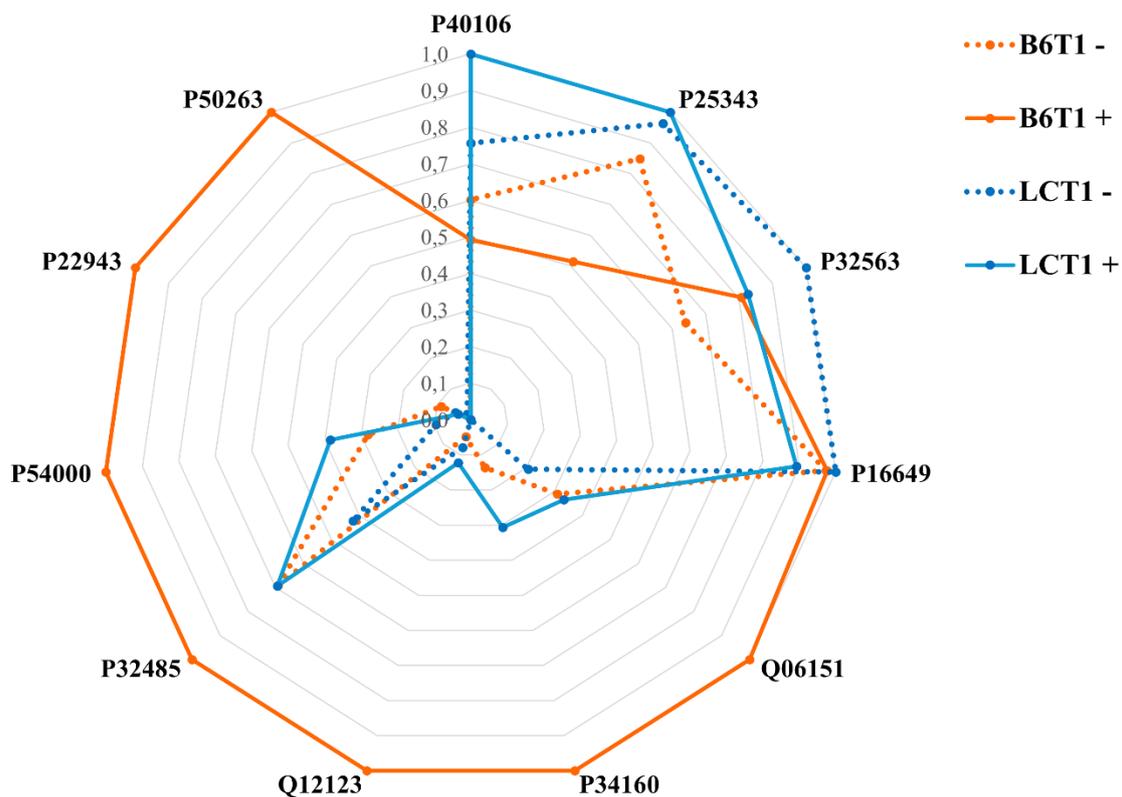


Figura 55. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T1 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en presencia (+) o ausencia (-) de SO₂ (valores tipificados por z-score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras con (continua) y sin SO₂ (discontinua).

La Figura 55 muestra los valores tipificados de expresión de proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico, identificadas por su AN, a las 12 horas de ser inoculadas en el mosto (T1 de muestreo) por las dos cepas de estudio. En este momento de la fermentación se alcanza la expresión máxima de proteínas (Ghaemmaghami *et al.*, 2013; Salvadó *et al.*, 2008), por lo que resulta muy interesante observar las diferencias de expresión en esta etapa por ambas cepas de levadura, junto con el efecto de la adición de SO₂.

En este caso, la mayoría de las proteínas de respuesta a estrés osmótico analizadas alcanzaron su mayor intensidad de expresión por parte de la cepa B6 en presencia de SO₂. La proteína SIP18 (AN: P50263), previamente descrita, fue la que mayor diferencia de expresión mostró, así como la subunidad 1 del complejo proteico de unión a la membrana celular (AN: P34160), no detectada en T0 por parte de B6. También fue diferencialmente mayor su expresión de la proteína de choque térmico de 12 kDa (AN: P22943), presente tanto en el citoplasma como en el interior del núcleo y en unión a la membrana plasmática. Esta proteína está involucrada también en más tipos de estreses, como el térmico (Welker *et al.*, 2010). La difosfatasa inactiva DCS2 (AN: Q12123) y la difosfatasa m7GpppX (AN: Q06151) fueron, de igual modo, cuantificadas en mayor medida por parte de B6 en T1, así como la subunidad 1 del coactivador transcripcional de la ARN polimerasa II (AN: P54000). Diversos estudios describen la importancia de dichas proteínas en la respuesta celular a diversos tipos de estreses, además del osmótico (Rosonina *et al.*, 2009; Malys *et al.*, 2004).

Resulta interesante la escasa cantidad de diferencias debidas a la adición de SO₂ observadas en la expresión de estas proteínas por la cepa LC. La similitud en las áreas de cuantificación con la condición sin SO₂ por la cepa B6 en T1 indica que este compuesto no parece afectar a la expresión proteica de LC asociada a la respuesta a estrés osmótico, algo que sí ocurre con la cepa B6. Este hecho podría relacionarse con el retraso en el inicio de la fermentación de esta cepa en presencia de SO₂ que ya observamos previamente (Martín-García *et al.*, 2023). Este fenómeno podría indicar que la adición de SO₂ condiciona a la cepa silvestre B6 durante las primeras horas de fermentación, por lo que la expresión de proteínas de resistencia a estrés osmótico podría estar favorecida en gran medida por el alto nivel de azúcar inicial en el mosto y la presencia de SO₂. Este resultado concuerda, por tanto, con la descripción de la cepa

comercial descrita en Material y Métodos (Sección III), que afirma que LC ya está adaptada a la presencia de SO₂ durante la fermentación, mientras que la silvestre no.

B6 y LC. Respuesta a estrés osmótico (T2)

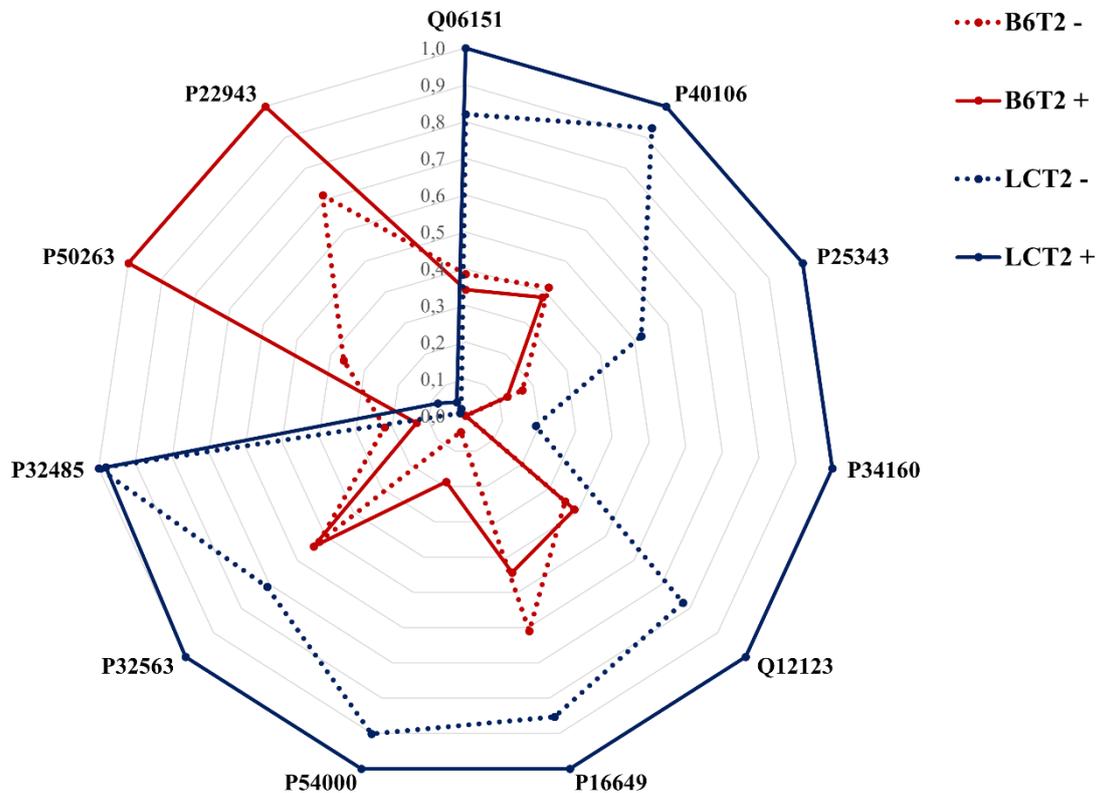


Figura 56. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T2 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en presencia (+) o ausencia (-) de SO₂ (valores tipificados por z -score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras con (continua) y sin SO₂ (discontinua).

Los valores tipificados de expresión de proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico, identificadas por su AN, en el T2 de muestreo (aproximadamente un 7% (v/v) de etanol) por parte de las dos cepas de estudio se representan en la Figura 56. En este tiempo de muestreo es la levadura LC la que ofreció la mayor expresión proteica de levaduras de respuesta a estrés osmótico. La presencia de SO₂ implicó en la cepa LC grandes diferencias en la intensidad detectada de la subunidad 1 del complejo proteico de unión a la membrana celular (AN: P34160), mientras que, para la cepa B6, la diferencia mayor debida a este compuesto se vio en la expresión de la proteína SIP18 (AN: P50263). En este diagrama radial se puede observar cómo, a T2, cada una de las

levaduras expresó en mayor cantidad diferentes proteínas de respuesta a estrés osmótico, con áreas de expresión muy distintas entre sí y menos afectadas por la dosis de SO₂. Esto podría indicar que ambas levaduras, durante la fermentación, se adaptan progresivamente a la presencia de este compuesto, reduciendo éste su influencia en los mecanismos proteicos de resistencia a las altas concentraciones de azúcar en el mosto.

B6. Respuesta a estrés osmótico

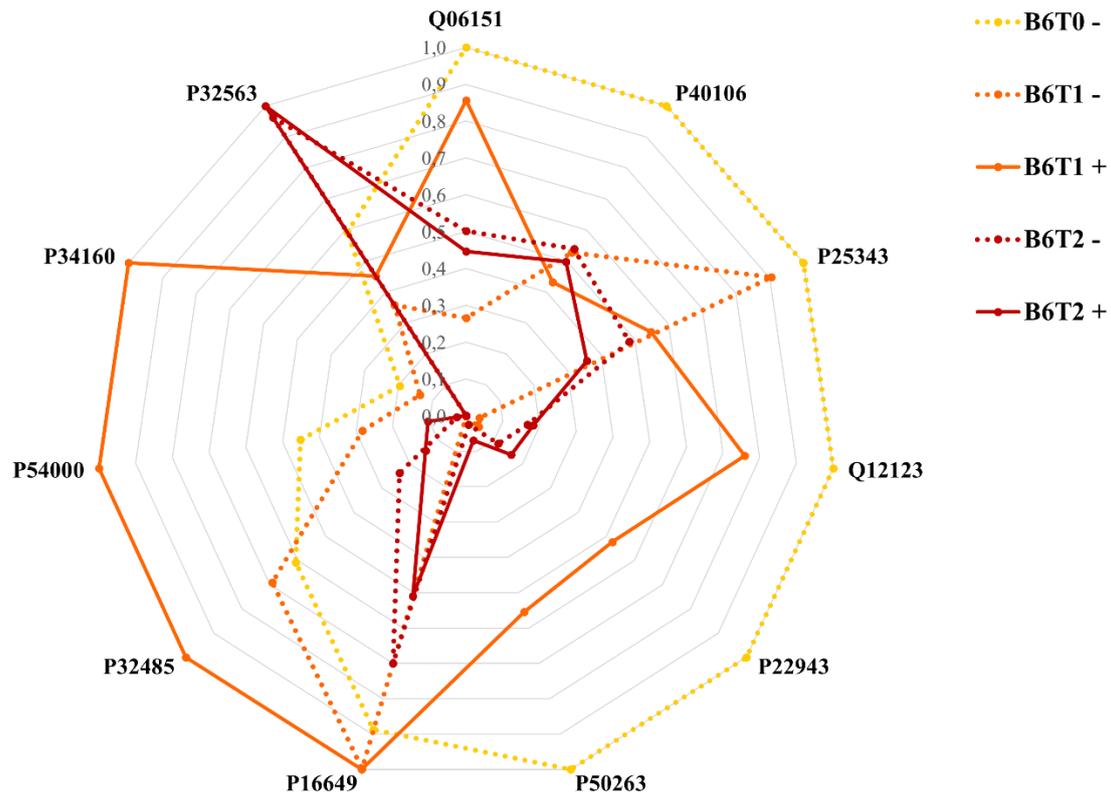


Figura 57. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0.05), identificadas por su AN, por parte de la levadura B6 en presencia (+) o ausencia (-) de SO₂ y en todos los tiempos de muestreo (T0, T1 y T2) (valores tipificados por z -score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras con (continua) y sin SO₂ (discontinua).

En la Figura 57, se representa la evolución de las áreas de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico por parte de B6, tanto en presencia como en ausencia de SO₂, durante los tres tiempos de muestreo. Resulta apreciable que, a medida que transcurrió la fermentación, la mayoría de estas proteínas disminuyeron su intensidad de expresión, lo cual podría reflejar de nuevo la adaptabilidad de esta cepa a

las condiciones osmóticas adversas de forma progresiva. Tan solo la subunidad A de la ATPasa de protones tipo V (isoforma vacuolar) (AN: P32563) muestra los niveles de intensidad más elevados en T2, con poca o nula diferencia debida a la presencia de SO₂.

LC. Respuesta a estrés osmótico

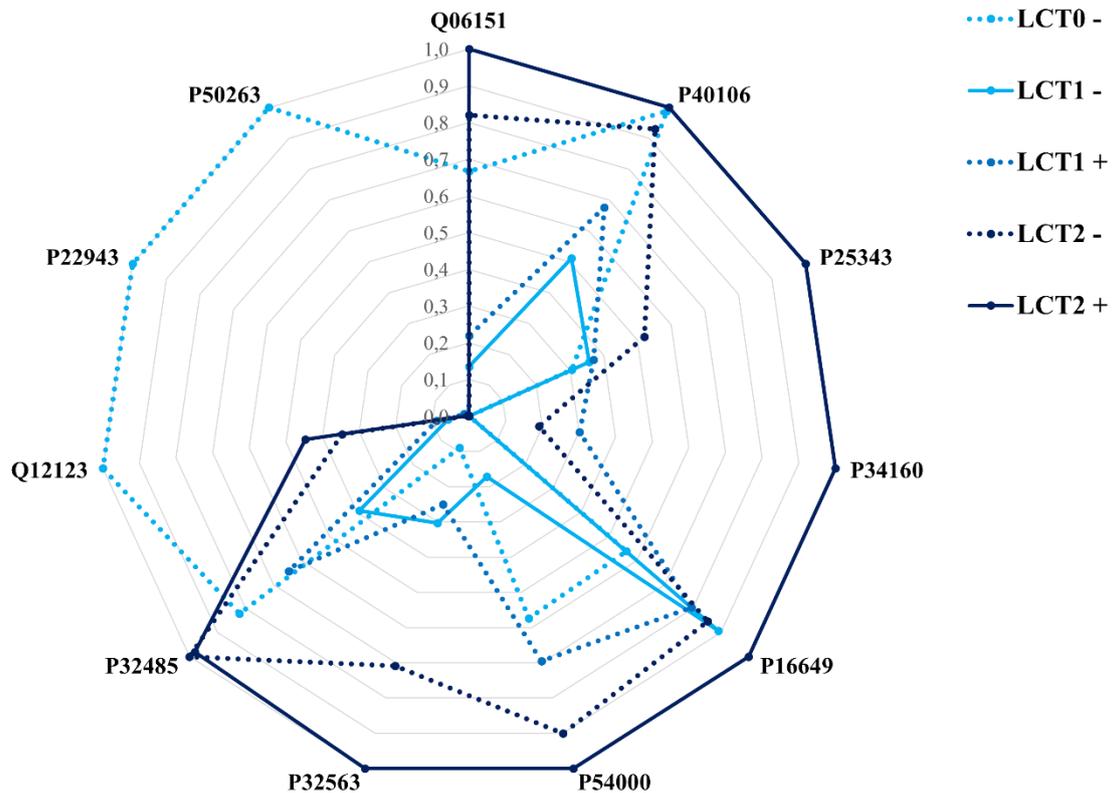


Figura 58. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés osmótico (q -value < 0.05), identificadas por su AN, por parte de la levadura B6 en presencia (+) o ausencia (-) de SO₂ y en todos los tiempos de muestreo (T0, T1 y T2) (valores tipificados por z -score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras con (continua) y sin SO₂ (discontinua).

En cuanto a las proteínas de respuesta a estrés osmótico expresadas por LC en presencia o ausencia de SO₂ durante la fermentación (Figura 58), también se observa una disminución en la expresión de algunas de ellas, como la proteína SIP18 (AN: P50263), la proteína de choque térmico de 12 kDa (AN: P22943) o la difosfatasa inactiva DCS2 (AN: Q12123). Sin embargo, el resto de las proteínas alcanzaron los valores máximos de cuantificación observados en T2 y en presencia de SO₂, por lo que es deducible que dicha expresión se viese en gran parte favorecida por el estrés

osmótico que suponen los altos niveles de azúcar inicial en mosto. Se observa además que algunas de estas proteínas, como la subunidad 1 del complejo proteico de unión a la membrana celular (AN: P34160), aumentaron su expresión también por la dosis añadida de SO₂. En Martín-García *et al.* (2023) se observó que la cepa LC presentó dificultades para terminar la fermentación en presencia de SO₂ y a concentraciones altas de azúcar, mostrándose niveles de azúcares residuales elevados y un menor grado alcohólico en comparación con las cepas silvestres (B6 y B29). Los resultados representados en la Figura 58 pueden corresponderse también con este hecho, indicándose que la respuesta celular a estrés por parte de la cepa LC comienza a ser más notable a medida que avanza la fermentación en condiciones de estrés.

4.4.3.2. Proteínas de respuesta a estrés oxidativo

Tabla 8. Proteínas de respuesta a estrés oxidativo cuya expresión es significativamente diferencial entre las muestras de estudio, con un *q*-value < 0.05.

AN	Descripción	Cluster
P00431	Citocromo c-peroxidasa mitocondrial	10
P17695	Glutarredoxina 2	1
P22517	Proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina	9
P22943	Proteína de choque térmico por calor de 12 kDa	1
P25372	Tiorredoxina mitocondrial 3	4
P25373	Glutarredoxina 1	9
P32485	Proteína quinasa HOG1 activada por mitógenos	7
P34227	Peroxirredoxina mitocondrial PRX1	10
P38013	Peroxirredoxina AHP1	4
P38230	Probable quinona-oxidoreductasa	5
P38623	Proteína quinasa de serina/treonina RCK2	-
P39676	Flavoheproteína	8
P40581	Peroxirredoxina HYR1 similar a glutatión-peroxidasa	1
P47137	Oxidoreductasa no caracterizada YJR096W	13
Q04792	Glutamato descarboxilasa	13
Q05948	Proteína no caracterizada YLR225C similar a SVF1	12
Q06151	Difosfatasa m7GpppX	2
Q06892	NADH-quinasa mitocondrial POS5	13
Q07551	α -cetoamida reductasa dependiente de NADPH	13
Q12123	Difosfatasa inactiva DCS2	2
Q96VH4	Nitrorreductasa putativa HBN1	5

AN: Número de acceso. “-“: proteína no asociada a cluster por no encontrarse en, al menos, 2 de las 3 réplicas de todas las muestras.

Las proteínas involucradas en procesos biológicos de respuesta a estrés oxidativo por parte de las levaduras de estudio que presentan expresión diferencial (q -value < 0.05) entre las condiciones ensayadas se enumeran en la Tabla 8. También están incluidos los correspondientes números de acceso y los cluster de cuantificación de intensidades a los que pertenecen dichas proteínas. Esta selección de proteínas de respuesta a estrés oxidativo fue sometida a una tipificación de los valores de intensidad de expresión por z -score (valores de 0 a 1), y los resultados se expresan en los siguientes diagramas radiales, teniendo como objetivo visualizar las diferencias entre las muestras de extractos proteicos comparando las condiciones experimentales testadas.

B6 y LC. Respuesta a estrés oxidativo (T0)

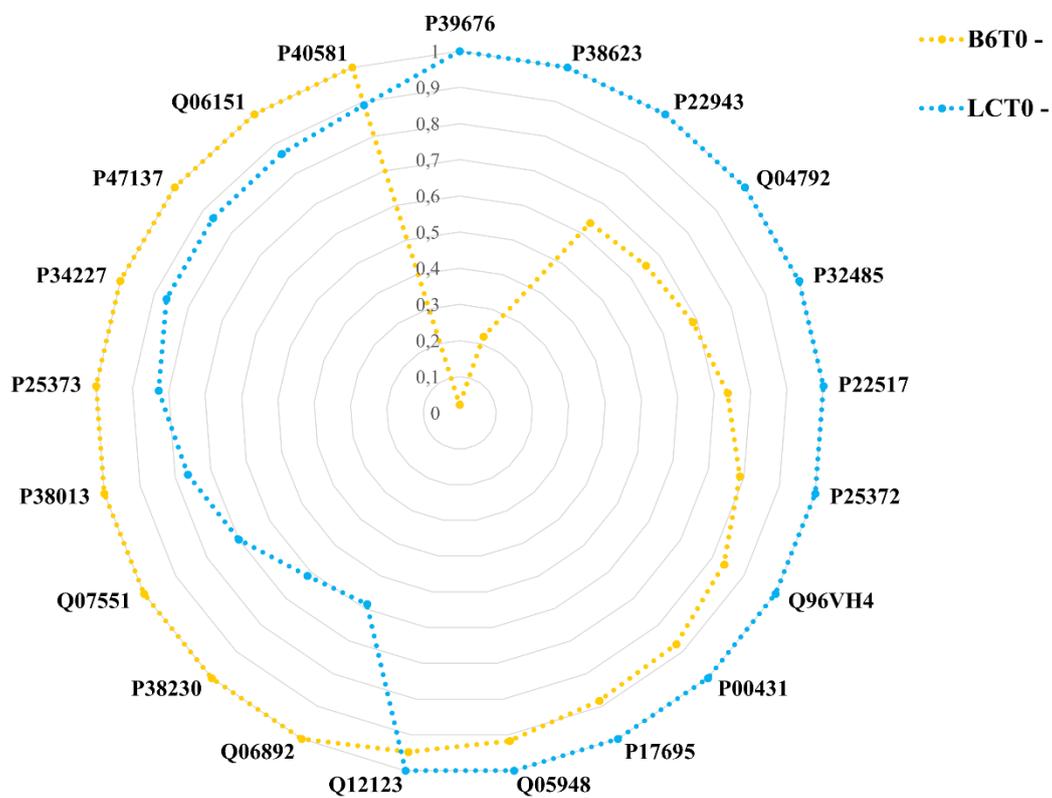


Figura 59. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T0 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en ausencia (-) de SO_2 (valores tipificados por z -score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras sin SO_2 (discontinua).

Las diferencias observadas en la intensidad de expresión proteica a T0 (Figura 59), como previamente se comentó, se deben únicamente a la cepa de levadura, ya que

no hubo adición de SO₂ al mosto ni tuvo lugar el comienzo de la fermentación. En este caso, la diferencia más notoria corresponde a la ausencia de cuantificación de una flavohemoproteína (AN: P39676) por parte de B6. Esta proteína puede encontrarse en el citoplasma, el núcleo y la mitocondria, y su expresión se favorece en condiciones de hipoxia o anaerobiosis para detoxificar el ambiente, sobre todo las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhao *et al.* (1996)). La expresión en el citoplasma de la proteína quinasa de serina/treonina RCK2 (AN: P38623), necesaria para la reprogramación de ribosomas en condiciones de estrés oxidativo (Swaminatan *et al.*, 2006), también resultó menor en el caso de B6. Por el contrario, hubo algunas proteínas que se expresaron con mayor intensidad en la cepa B6 que en la LC, destacando la NADH-quinasa mitocondrial POS5 (AN: Q06892) y una probable quinona-oxidorreductasa (AN: P38230).

B6 y LC. Respuesta a estrés oxidativo (T1)

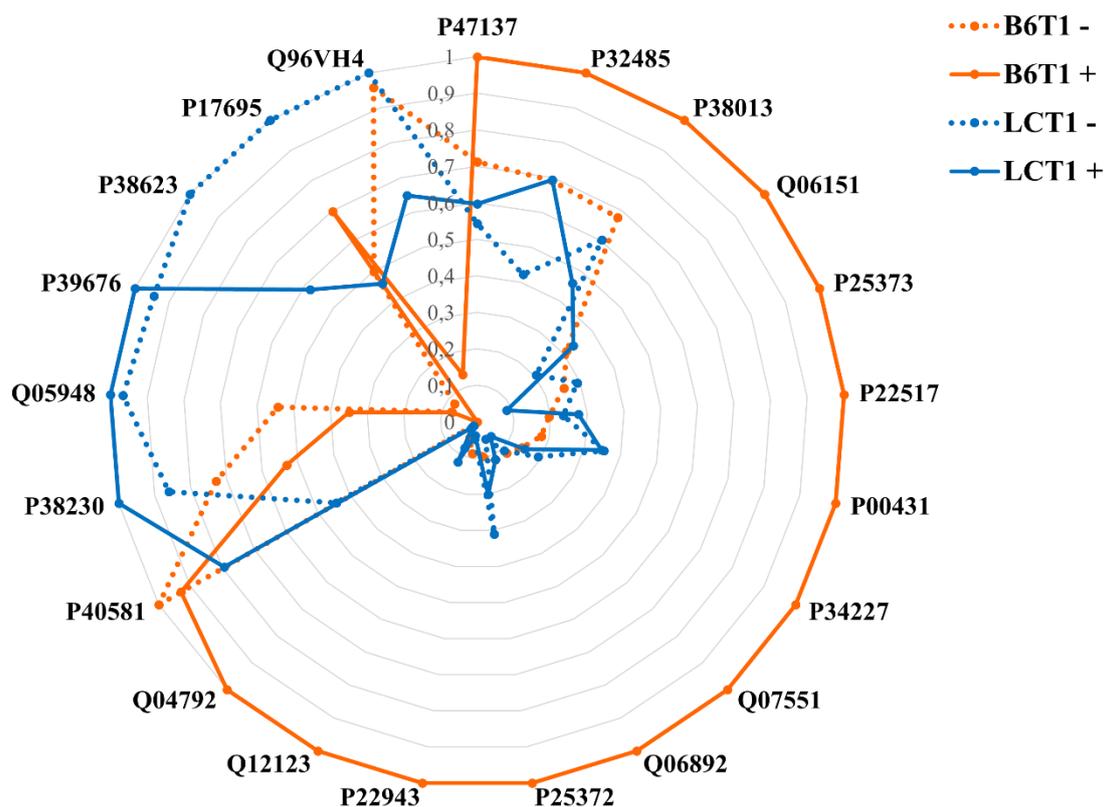


Figura 60. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T1 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en ausencia (-) de SO₂ (valores tipificados por z -score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras con (continua) y sin SO₂ (discontinua).

En T1 (Figura 60), son amplias las diferencias en las áreas de cuantificación de proteínas asociadas a estrés oxidativo por parte de ambas cepas. En presencia de SO₂, la levadura B6 mostró una expresión significativamente más elevada de muchas de estas proteínas, mientras que la levadura LC no mostró, en este tiempo de muestreo, diferencias tan acusadas debidas al SO₂. Este hecho puede encontrarse también relacionado con la tardanza en el inicio de la fermentación por la cepa B6 (Martín-García *et al.*, 2023). Algunas de las proteínas expresadas al alza por B6 en T1 en la condición con SO₂, como la difosfatasa m7GpppX (AN: Q06151) o la difosfatasa inactiva DCS2 (AN: Q12123) también están asociadas a estrés osmótico. Por parte de la cepa LC, algunas proteínas que disminuyeron su expresión en presencia de SO₂, como la glutarredoxina 2 (AN: P17695), importante para la protección celular contra las ROS (Luikenhuis *et al.*, 1998); o la proteína quinasa de serina/treonina RCK2 (AN: P38623).

B6 y LC. Respuesta a estrés oxidativo (T2)

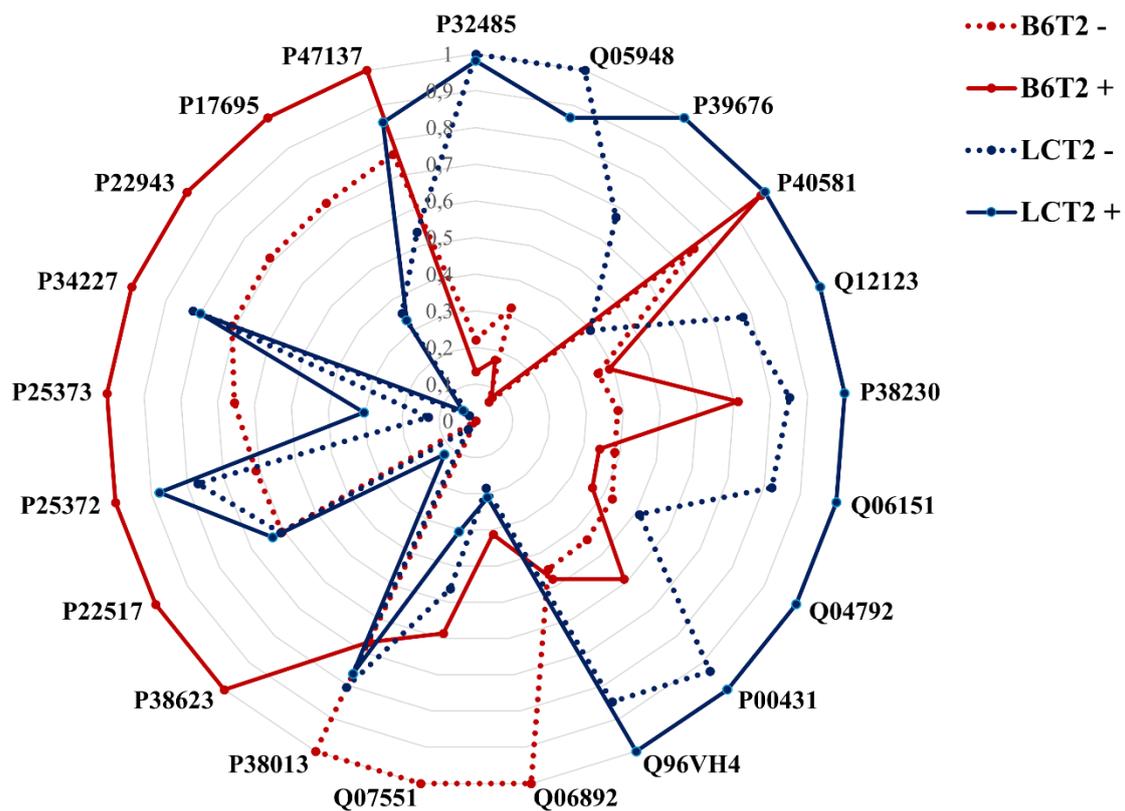


Figura 61. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, en el T2 de muestreo por parte de las dos levaduras (B6 y LC) en ausencia (-) de SO₂ (valores tipificados por z -score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras con (continua) y sin SO₂ (discontinua).

La Figura 61 muestra las diferencias en la expresión proteica relacionada con el estrés oxidativo por parte de las dos levaduras en T2, comparando también la presencia y la ausencia de SO₂ en ambas cepas.

Se puede apreciar que algunas de las proteínas que LC ya expresaba en mayor medida que B6 en T1 mantuvieron esta tendencia en T2, como es el caso de la flavohemoproteína (AN: P39676) antes descrita, o la proteína no caracterizada YLR225C similar a SVF1 (AN: Q05948).

Las mayores diferencias debidas al SO₂ en la expresión proteica de respuesta a estrés oxidativo por parte de LC en T2 se encuentran en la peroxirredoxina HYR1 similar a glutatión-peroxidasa (AN: P40581), involucrada en el equilibrio redox de la célula; y en la glutamato Descarboxilasa (AN: Q04792). La primera está involucrada en el equilibrio redox de la célula (Avery & Avery, 2001); y la segunda, con la resistencia a factores de estrés como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o la diamida (Coleman *et al.*, 2001).

Por otro lado, las proteínas que se cuantificaron en mayor medida en B6 frente a LC en este punto de la fermentación fueron la proteína quinasa de serina/treonina RCK2, que reflejó la mayor diferencia de intensidad de expresión debida al SO₂ dentro de la misma cepa B6; y la proteína de choque térmico por calor de 12 kDa (AN: P22943), previamente descrita.

La evolución de las áreas de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo por parte de B6, tanto en presencia como en ausencia de SO₂, durante los tres tiempos de muestreo, se muestra en la Figura 62.

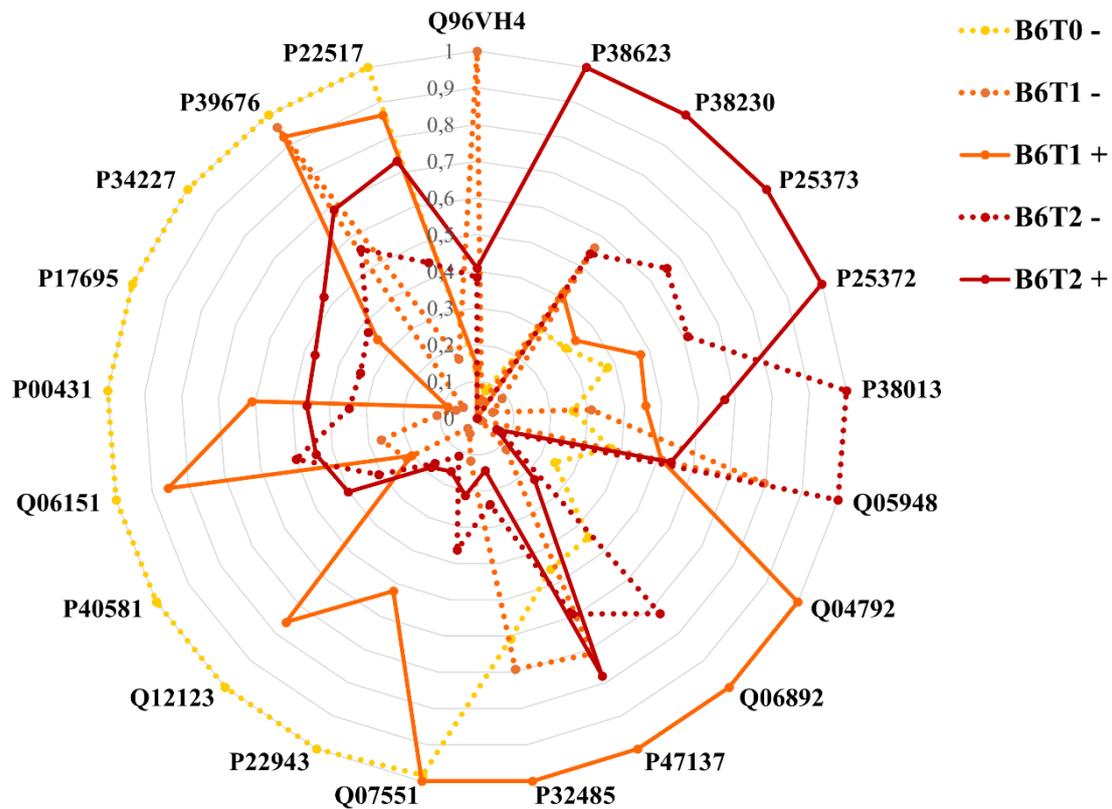
B6. Respuesta a estrés oxidativo

Figura 62. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, por parte de la levadura B6 en presencia (+) o ausencia (-) de SO_2 y en todos los tiempos de muestreo (T0, T1 y T2) (valores tipificados por z -score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras con (continua) y sin SO_2 (discontinua).

En este caso, se observan diversos patrones de expresión debidos al progreso de la fermentación, ya que una buena parte de las proteínas de respuesta a estrés oxidativo perdieron intensidad de expresión durante el proceso fermentativo, mientras que otras la fueron ganando. Como se comentó en los diagramas anteriores, en el caso de la cepa B6 se dieron grandes diferencias de expresión proteica debidas al efecto del SO_2 sobre todo en T1, y algo más moderadas, como posible indicativo de adaptación de la levadura al estrés oxidativo vigente, en T2. Cabe destacar también que parte del SO_2 presente al inicio de la fermentación se desprende como gas a la vez que se produce CO_2 producto del proceso, de modo que ello facilitaría la adaptación de la levadura al medio y podría desembocar en la visible reducción de la expresión de proteínas de estrés.

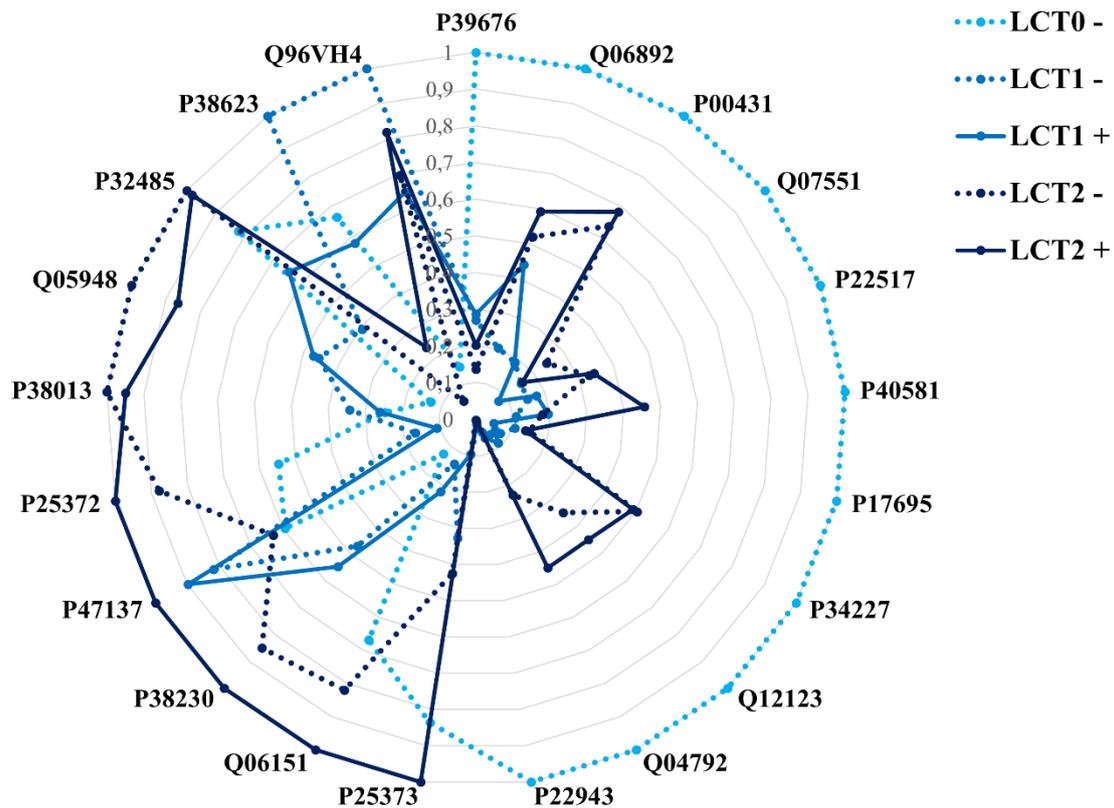
LC. Respuesta a estrés oxidativo

Figura 63. Diagrama radial que representa el área de cuantificación de las proteínas asociadas a la respuesta a estrés oxidativo (q -value < 0.05), identificadas por su AN, por parte de la levadura LC en presencia (+) o ausencia (-) de SO₂ y en todos los tiempos de muestreo (T0, T1 y T2) (valores tipificados por z-score: 0 a 1). Las líneas identifican el área de expresión proteica de muestras con (continua) y sin SO₂ (discontinua).

La Figura 63 muestra las áreas de cuantificación de las proteínas de respuesta a estrés oxidativo expresadas por LC en presencia o ausencia de SO₂ durante la fermentación. Se puede observar, al igual que en el caso de las proteínas relacionadas con el estrés osmótico, una disminución en la expresión de varias de ellas a medida que transcurría la fermentación. Durante este proceso, se manifiesta también un aumento en la expresión de otras proteínas, relacionándose esto con posibles factores de estrés oxidativo propias de la fermentación, como la aparición de ROS y la disminución del oxígeno disponible en el medio. Las diferencias debidas a la presencia o ausencia del SO₂ son apreciables en la intensidad de expresión de proteínas concretas, pero, en general, son menos llamativas que las existentes entre los diversos tiempos de muestreo, mostrándose el patrón de comportamiento de la cepa LC frente al progreso de la fermentación en condiciones estresantes para la viabilidad celular.

Sección V



CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

5.1. CONCLUSIONES

Analizar las variables enológicas más habituales de los vinos producidos por las cepas de levadura de estudio

Las conclusiones obtenidas con relación al objetivo específico 1: “Analizar las variables enológicas más habituales de los vinos producidos por las cepas de levadura de estudio” surgen de los resultados presentados en los Capítulos 1 y 3 de la Sección IV (Resultados), y son las que se describen a continuación:

- La cepa de levadura fue el factor que mayor influencia presentó en todos los parámetros enológicos de los vinos, salvo en el pH. Los valores de acidez volátil, la acidez titulable y el nitrógeno fácilmente asimilable de los vinos se vieron incrementados por la alta temperatura de fermentación. El grado alcohólico y los niveles de azúcar residual y acidez volátil se vieron mayormente influenciados por el alto contenido en azúcares iniciales del mosto, mientras que el SO₂ no influyó en ninguno de los parámetros enológicos evaluados.
- La levadura comercial LC no mostró influencia notable de la temperatura o el SO₂, aunque propició fermentaciones incompletas por efecto de la concentración más elevada de azúcar del mosto. En presencia de SO₂, las levaduras B6 y B29 sufrieron un desfase en el inicio de la fermentación en relación con el resto de las levaduras, aunque éstas sí culminaron el proceso.
- Los resultados indican que todas las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* evaluadas presentan niveles adecuados en cuanto a los parámetros enológicos más representativos de los vinos, mostrando así su eficiencia a la hora de fermentar vinos en condiciones similares a las de un escenario de cambio climático.

Analizar el volatiloma de las levaduras que presenten un mejor potencial enológico y determinar el perfil odorante de los vinos.

Las conclusiones obtenidas en relación con el objetivo específico 2: “Analizar el volatiloma de las levaduras que presenten un mejor potencial enológico y determinar el perfil odorante de los vinos fermentados por ellas” derivan de los resultados expuestos en los Capítulos 1, 2 y 3 de la Sección IV (Resultados), y son los siguientes:

- Las cepas de levaduras utilizadas determinaron grandes diferencias en la composición volátil de los vinos, afectando a más del 90% de los compuestos determinados. El 75% de ellos mostró influencia de la temperatura de fermentación, mientras que la concentración de azúcar inicial y la presencia de SO₂, afectaron solo al 30%. Aun así, la presencia de SO₂ resultó significativa en los niveles de varios compuestos mayoritarios, conllevando incrementos en los niveles de alcoholes superiores, polioles y compuestos carbonílicos.
- Los compuestos que presentaron mayores valores de actividad odorante fueron el acetato de isoamilo y el octanoato de etilo, ésteres con descriptores aromáticos frutales. Estos presentaron, respectivamente, valores de actividad odorante 60 y 43 veces superiores a la unidad. Otros, como la β-damascenona o la β-ionona, mostraron, respectivamente, valores de actividad odorante 38 y 21 veces superiores a su umbral de percepción, contribuyendo al aroma de los vinos con notas florales y herbáceas.
- Los vinos obtenidos con las cepas LC, B29 y B6 fueron los que presentaron mayores contenidos en los compuestos relacionados con los aromas florales y frutales. El análisis de conglomerados y el de componentes principales pusieron de manifiesto que los vinos obtenidos con las cepas B29 y LC fueron diferentes al resto, siendo las series aromáticas responsables de dicha diferenciación la floral y la herbácea. En el caso de la cepa B6 fue la serie frutal la que diferenció a los vinos producidos por esta, en comparación con los obtenidos por el resto de las cepas.
- La capacidad de cada cepa de levadura para obtener diferentes perfiles

aromáticos en los vinos dota al enólogo de alternativas para elaborar vinos con características organolépticas específicas.

Analizar el proteoma de las levaduras silvestres con mejor potencial enológico en condiciones de estrés y compararlo con el de una levadura comercial

Las conclusiones obtenidas en asociación con el objetivo específico 3: “Analizar el proteoma de las levaduras silvestres con mejor potencial enológico en condiciones de estrés y compararlo con el de una levadura comercial” parten de los resultados descritos en el Capítulo 4 de la Sección IV (Resultados) y se exponen a continuación:

- La evaluación cualitativa del proteoma de las cepas de levadura mostró que un 80.7% de las proteínas cuantificadas como válidas resultaron comunes a ambas levaduras (silvestre B6 y comercial LC) en los tres tiempos de muestreo, tanto en presencia como ausencia de SO₂.
- En las condiciones ensayadas, los patrones de expresión proteica más representativos indicaron que el proteoma general de la cepa B6 presenta su máxima intensidad de expresión a las 48 horas del inicio de la fermentación, mientras que la cepa LC tiende a una expresión proteica más fuerte hacia la mitad del proceso;
- La levadura LC presentó, tanto en presencia como en ausencia de SO₂, la mayor intensidad de expresión de proteínas de respuesta a estrés osmótico y oxidativo a la mitad del proceso fermentativo (7% de etanol (v/v)), relacionándose este hecho con su incapacidad para terminar la fermentación a alta concentración de azúcar. La cepa B6, por su parte, mostró mayores intensidades en el inicio y a las 48 horas del proceso, con una influencia apreciable del SO₂. Este hecho se corresponde con el retardo que esta cepa presentó para comenzar la fermentación.
- Estos resultados indican que, aunque estas cepas de levadura presentan diferentes comportamientos, expresando en mayor medida proteínas de respuesta a estrés osmótico y oxidativo en distintas etapas de la fermentación,

ambas pueden hacer frente con solvencia a dichas condiciones durante el proceso.

5.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras a nivel científico, se pretende seguir analizando el proteoma del resto de levaduras silvestres que resulten de interés, centrandó el enfoque no solo en proteínas de respuesta a estrés, sino también a la relación, mediante análisis quimiométricos, del proteoma de las levaduras y el volatiloma de sus vinos. También se considera realizar un análisis del metabolismo de aminoácidos que pueda asociarse a la expresión proteica. En cuanto al análisis del perfil organoléptico de los vinos, se contempla la posibilidad de realizar nuevas vinificaciones a mayor escala, con el fin de llevar a cabo análisis sensoriales que contribuyan a definir con más precisión la huella odorante de los productos de estas levaduras.

En definitiva, se pretende que estos estudios, tanto los descritos en el presente trabajo como los que les precedan, ayuden a obtener una herramienta sólida, bien estudiada, reproducible y sostenible con el medio ambiente para que las bodegas y las regiones productoras de vinos puedan mitigar los efectos adversos del cambio climático en el sector vitivinícola de nuestro país.

Financiamiento de esta Tesis Doctoral

- 1) Intervenciones agronómicas y enológicas para mitigar los efectos del cambio climático sobre la maduración de la uva y la calidad del vino (Proyectos Propios de Innovación y Transferencia de la Universidad de Córdoba, ref.: PPIT_2022E_025820);

- 2) Análisis del proteoma y exo-metaboloma de las cepas de levadura de la uva con mejor aptitud enológica para la fermentación de mostos de vides silvestres (Contrato artículo 83 LOU, ref.:12017081).

Sección VI



**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, C. A. (2006). Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. En *Springer eBooks* (pp. 285-334).

https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_10

Abramovič, H., Košmerl, T., Ulrih, N. P., Cigić, B. (2015). Contribution of SO₂ to antioxidant potential of white wine. *Food Chemistry*, 174, 147-153.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.030>

Modificación genética de levaduras vínicas - acenología. (2023). Acenología.

https://www.acenologia.com/ciencia52_2/

Alañón, M., Pérez-Coello, Marina, M. L. (2015). Wine science in the metabolomics era. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 1-20.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.006>

Alcalde, S. (2022). Así afectan los volcanes al cambio climático. *www.nationalgeographic.com.es*. [https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/asi-](https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/asi-afectan-volcanes-clima-planeta-y-calentamiento-global_17355)

[afectan-volcanes-clima-planeta-y-calentamiento-global_17355](https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/asi-afectan-volcanes-clima-planeta-y-calentamiento-global_17355)

Alexandre, H. (2013). Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*—Their ecology, genetics and metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 269-275.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.021>

Álvarez-Fernández, M. A., Carafa, I., Vrhovšek, U., Arapitsas, P. (2020). Modulating wine aromatic amino acid catabolites by using *Torulaspora delbrueckii* in sequentially inoculated fermentations or *Saccharomyces cerevisiae* alone. *Microorganisms*, 8(9), 1349. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091349>

Álvarez-Fernández, M. A., Fernández-Cruz, E., García-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M., Mattivi, F., Vrhovšek, U., Arapitsas, P. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* and

Torulaspota delbrueckii Intra- and Extra-Cellular Aromatic amino acids metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(28), 7942-7953.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01844>

Ansanay-Galeote V., Blondin B., Dequin S., Sablayrolles J. M. (2001). Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 23, 677–681. <https://doi.org/10.1023/A:1010396232420>

Arbulu, M., Sampedro, M. C., Gómez-Caballero, A., Goicolea, M. A., Barrio, R. J. (2015). Untargeted metabolomic analysis using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for non-volatile profiling of wines. *Analytica chimica acta*, 858, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.028>

Aupí, V. (2014). *Glaciaciones, calentamiento global y oscilaciones naturales del clima - revista Método*. *Revista Método*. <https://metode.es/revistas-metode/secciones/historias-clima/glaciaciones-calentamiento-global-y-oscilaciones-naturales-del-clima.html>

Avery, A., & Avery, S. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *The Journal of biological chemistry*, 276(36), 33730–33735. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105672200>

Bakker, B. M., Bro, C., Kötter, P., Luttk, M. A. H., Van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (2000). The mitochondrial alcohol dehydrogenase ADH3P is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4730-4737.

<https://doi.org/10.1128/jb.182.17.4730-4737.2000>

Banerjee, S., Clapp, K., Tarsio, M., Kane, P. M. (2019). Interaction of the late endo-lysosomal lipid PI(3,5)P2 with the Vph1 isoform of yeast V-ATPase increases its activity and cellular stress tolerance. *The Journal of biological chemistry*, 294(23), 9161–9171.

<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008552>

Battey, N. H. & Simmonds, P. E. (2005). *Phylloxera* and the grapevine: a sense of common purpose? *Journal of Experimental Botany*, 56(422), 3029-3031. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri320>

Baumes, R. (2000). Los constituyentes volátiles de la etapa fermentativa. En Flanzky, C. (Eds). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* (pp.147-158).

Belda, I., Ruíz, J. M., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., De La Oliva Santos, A., Moreno-Arribas, M. V. (2017). Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules*, 22(2), 189. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>

Beltrán, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Systematic and applied microbiology*, 25(2), 287–293. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00097>

Bely, M., Sablayrolles, J., Barré, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(4), 246-252. [https://doi.org/10.1016/0922-338x\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338x(90)90057-4)

Benítez, P., Castro, R., García-Barroso, C. (2003). Changes in the polyphenolic and volatile contents of “Fino” sherry wine exposed to ultraviolet and visible radiation during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6482-6487. <https://doi.org/10.1021/jf030223j>

Benito, S., Ruíz, J. M., Belda, I., Kiene, F., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., De La Oliva Santos, A., Rauhut, D. (2019). Application of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. En *Springer eBooks* (pp. 75-89). https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_3

Bennetzen, J. L., & Hall, B. D. (1982). The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 257(6), 3018-3025. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)81067-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)81067-0)

Berlanga, T. M., Millán, C., Mauricio, J. C., Ortega, J. M. (2006). Influence of nitrogen on the biological aging of sherry wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2113-2118. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2584>

Bolat, I., Romagnoli, G., Zhu, F., Pronk, J. T., Daran, J. (2013). Functional analysis and transcriptional regulation of two orthologs of *ARO10*, encoding broad-substrate-specificity 2-oxo-acid decarboxylases, in the brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* CBS1483. *Fems Yeast Research*, 13(6), 505-517. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12051>

Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., Alexandre, H. (2020). Yeast-yeast interactions: mechanisms, methodologies and impact on composition. *Microorganisms*, 8(4), 600. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040600>

Bordet, F., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Vichi, S., Quintanilla-Casas, B., Gougeon, R. D., Julien-Ortiz, A., Kopplin, P. S., Alexandre, H. (2021). Different wines from different yeasts? "*Saccharomyces cerevisiae* intraspecies differentiation by metabolomic signature and sensory patterns in wine". *Microorganisms*, 9(11), 2327. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112327>

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (1999). Principles and practices of winemaking. En *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6255-6>

Braconi, D., Amato, L., Bernardini, G., Arena, S., Orlandini, M., Scaloni, A., Santucci, A. (2011). Surfome analysis of a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Food microbiology*, 28(6), 1220–1230. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.04.009>

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Braga, C., & Adamec, J. (2018). Metabolome analysis. En *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* (Vol. 1-3, pp. 463-475). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20134-9>

Brosnan, M., Donnelly, D., James, T., Bond, U. (2000). The stress repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *Journal Applied Microbiology*, 88(5), 746-755.

Budziak-Wieczorek, I., Mašán, V., Rząd, K., Gładyszewska, B., Karcz, D., Burg, P., Čížková, A., Gagoś, M., Matwijczuk, A. (2023). Evaluation of the quality of selected white and red wines produced from Moravia Region of Czech Republic using physicochemical analysis, FTIR infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Molecules*, 28(17), 6326. <https://doi.org/10.3390/molecules28176326>

Buja, L. (2022). The history, science, and art of wine and the case for health benefits: Perspectives of an oenophilic cardiovascular pathologist. *Cardiovascular Pathology*, 60, 107446. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2022.107446>

Burney, J., Kennel, C. F., Victor, D. G. (2013). Getting serious about the new realities of global climate change. *Bulletin of the atomic scientists*, 69(4), 49-57. <https://doi.org/10.1177/0096340213493882>

Butt, T. M., & Copping, L. G. (2000). Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook*, 11(5), 186-191. <https://doi.org/10.1039/b008009h>

Byrne, S., Howell, G. (2017). Acetaldehyde: how to limit its formation during fermentation. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 637, 68-69.

Camps, J. & Ramos, M. C. (2011). Grape harvest and yield responses to inter-annual changes in temperature and precipitation in an area of north-east Spain with a Mediterranean climate. *International Journal of Biometeorology*, 56(5), 853-864. <https://doi.org/10.1007/s00484-011-0489-3>

Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., Jeffery, D. W. (2011). Identification and quantitation of 3-S-Cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in sauvignon blanc

grape juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11204-11210. <https://doi.org/10.1021/jf202543z>

Carrascosa, A. V., Bartolomé, B., Robredo, S., León, A., Cebollero, E., Juega, M., Núñez, Y., Martínez, M., Martínez-Rodríguez, A. J. (2012). Influence of locally-selected yeast on the chemical and sensorial properties of Albariño white wines. *LWT*, 46(1), 319-325. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.011>

Cata del Vino. (s. f.). *Enoturismo, visitar bodegas y comprar vino en catadelvino.com*. <https://www.catadelvino.com/>

Chaves, M. M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J., Santos, T. P., Regalado, A., Rodrigues, M., Lopes, C. M. (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany*, 105(5), 661-676. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq030>

Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C. D., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., . . . Wong, E. D. (2011). Saccharomyces Genome Database: The genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D700-D705. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1029>

Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Siesto, G., Romano, P. (2016). Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>

Claret, M., Reyes, M. Ruiz, C. (2020) Condiciones edafoclimáticas y productos enológicos en el Valle del Itata. *Chillán: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, 433(8). (Consultado el 15 de agosto de 2023). <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67463/Capitulo%208.pdf?isAllowed=y&sequence=10>

Climamanía. (2023). Clima en España: unos breves apuntes para entenderlo. *El blog de ClimaManía | Expertos en climatización*. <https://www.climamania.com/blog/el-clima-en-espana-10-apuntes/>

Climate, weather and vineyard management – eVineyard blog. (2019). <https://www.evineyardapp.com/blog/2019/01/17/climate-weather-and-vineyard-management/>

Climate change and wine overview – Thirty Fifty (2023). <https://www.thirtyfifty.co.uk/spotlight-climate-change.asp>

Coleman, S., Fang, T., Rovinsky, S., Turano, F., Moye-Rowley, W. (2001). Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 276(1), 244–250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007103200>

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>

Compés, R. & Sotés, V. (2018). El sector vitivinícola frente al desafío del cambio climático. Estrategias públicas y privadas de mitigación y adaptación en el Mediterráneo. *Madrid: Ed. Cajamar Caja Rural*.

Corison, C., Ough, C., Berg, H., Nelson, K. (1979). Must acetic acid and ethyl acetate as mold and rot indicators in grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(2), 130-134. <https://doi.org/10.5344/ajev.1979.30.2.130>

Dalu, J. D., Baldi, M., Marta, A. D., Orlandini, S., Maracchi, G., Dalu, G., Grifoni, D., Mancini, M. (2012). Mediterranean climate patterns and wine quality in north and central Italy. *International Journal of Biometeorology*, 57(5), 729-742. <https://doi.org/10.1007/s00484-012-0600-4>

Dang, N., & Hinch, D. (2011). Identification of two hydrophilins that contribute to the desiccation and freezing tolerance of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. *Cryobiology*, 62(3), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.03.002>

De Cortázar-Atauri, I., Duchêne, É., Destrac-Irvine, A., Barbeau, G., De Rességuier, L., Lacombe, T., Parker, A., Saurin, N., Van Leeuwen, C. (2017). Grapevine phenology in France: from past observations to future evolutions in the context of climate change. *OENO One*, 51(2), 115-126. <https://doi.org/10.20870/oenone.2017.51.2.1622>

De Lerma, N. L., Peinado, R. A., Puig-Pujol, A., Mauricio, J. C., Moreno, J., García-Martínez, T. (2018). Influence of two yeast strains in free, bioimmobilized or immobilized with alginate forms on the aromatic profile of long aged sparkling wines. *Food Chemistry*, 250, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.036>

Deed, R., Fedrizzi, B., Gardner, R. C. (2017). Influence of fermentation temperature, yeast strain, and grape juice on the aroma chemistry and sensory profile of Sauvignon Blanc Wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(40), 8902–8912. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03229>

Di Carlo, P., Aruffo, E., Brune, W. H. (2019). Precipitation intensity under a warming climate is threatening some Italian premium wines. *The Science of the total environment*, 685, 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.449>

Demirer, G., Silva, T., Jackson, C., Thomas, J., Ehrhardt, D., Rhee, S., Mortimer, J., Landry, M. (2021). Nanotechnology to advance CRISPR–CAS genetic engineering of plants. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 243-250. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00854-y>

Diagnostic key classes of off-character compounds odor impact amino acid derivatives found in wine. (2018, 13 abril). Viticulture And Enology. <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/fermentation-management-guides/key-diagnosing-problem-fermentations/diagnostic-key-classes-character-compounds-odor-impact-amino-acid-derivatives-found-wine>

Diamantidou, D., Zotou, A., Theodoridis, G. (2018). Wine and grape marc spirits metabolomics. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 14(12), 159. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1458-1>

Dickinson, J. R., Harrison, S. P., Dickinson, J. A., Hewlins, M. J. E. (2000). An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10937-10942. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.937>

Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J., Hewlins, M. J. E. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8028-8034. <https://doi.org/10.1074/jbc.m211914200>

Drawert, F., Schreier, P., Scherer, W. (1974). Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe des Weines. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 155, 342-347.

Du, Q., Ye, D., Zang, X., Nan, H., Liu, Y. (2022). Effect of low temperature on the shaping of yeast-derived metabolite compositions during wine fermentation. *Food research international*, 162(Pt A), 112016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112016>

Duina, A. A., Miller, M. E., Keeney, J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1), 33-48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>

Dumitriu, G., Peinado, R., Cotea, V., De Lerma, N. (2020). Volatilome fingerprint of red wines aged with chips or staves: Influence of the aging time and toasting degree. *Food Chemistry*, 310, 125801. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125801>

Dunn, W. B., & Ellis, D. I. (2005). Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(4), 285-294. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>

Egli, C., Edinger, W., Mittrakul, C., Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 779-789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x>

El Haloui, N.E., Corrieu, G., Cleran, Y. (1989). Method for on-line prediction of kinetics of alcoholic fermentation in wine making. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68, 131–135.

Eliuk, S., & Makarov, A. (2015). Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry instrumentation. *Annual review of analytical chemistry*, 8, 61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040325>

Emwas, A., Al-Talla, Z., Yang, Y., Kharbatia, N. (2015). Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. *Methods in Molecular Biology*, 1277, 91-112. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_8

Entradas, V. M. (2022). *El análisis del vino*. EL VIAJE. <https://elviajealcentrodelvino.com/2022/01/20/el-analisis-del-vino/>

Extreme April heat in Spain, Portugal, Morocco & Algeria almost impossible without climate change – *World Weather Attribution*. (s. f.). <https://www.worldweatherattribution.org/extreme-april-heat-in-spain-portugal-morocco-algeria-almost-impossible-without-climate-change/>

Fleet, G. H. & Heard, G. M. (1993). Yeast-growth during fermentation. En *Fleet, G.H., Ed., Harwood Academic, Wine, Microbiology and Biotechnology*, Lausanne, 27-54.

Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), 1034-1038. <https://doi.org/10.1128/aem.48.5.1034-1038.1984>

Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., Santos, J. A. (2012). An overview of climate change impacts on European viticulture. *Food and Energy Security*, 1(2), 94-110.

<https://doi.org/10.1002/fes3.14>

Frivik, S. K., Ebeler, S. E. (2003). Influence of sulfur dioxide on the formation of aldehydes in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(1), 31-38.

<https://doi.org/10.5344/ajev.2003.54.1.31>

Fundación Instituto Roche (2019). Informe “Anticipando Ciencias Ómicas”.

https://www.institutoroche.es/static/archivos/Informes_anticipando_CIENCIAS_OMICAS.pdf

Furer, D. (2006). Why the wine industry should care about global warming? *Winebusiness.com*. (Consultado el 19 de noviembre de 2021).

<http://www.winebusiness.com/wbm/index.cfm?go=getArticalSignIn&dataId=43868>

García, M. J., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J. M., Arroyo, T. (2019). Influence of native *Saccharomyces cerevisiae* strains from D.O. “Vinos de Madrid” in the volatile profile of white wines. *Fermentation*, 5(4), 94.

<https://doi.org/10.3390/fermentation5040094>

García, M., Greetham, D., Wimalasena, T. T., Phister, T. G., Cabellos, J. M., Arroyo, T. (2016). The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 215-233.

<https://doi.org/10.1111/jam.13139>

García-Ríos, E., & Guillamón, J. M. (2019). Sulfur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: beyond *SSU1*. *Microbial cell*, 6(12), 527–530.

<https://doi.org/10.15698/mic2019.12.699>

García-Ríos, E., & Guillamón, J. M. (2019). Mechanisms of yeast adaptation to wine fermentations. *Progress in molecular and subcellular biology*, 58, 37–59.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-13035-0_2

García-Ríos, E., López-Malo, M., Guillamón, J. M. (2014). Global phenotypic and genomic comparison of two *Saccharomyces cerevisiae* wine strains reveals a novel role of the sulfur assimilation pathway in adaptation at low temperature fermentations. *BMC genomics*, 15(1), 1059. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1059>

Garre, E., Romero-Santacreu, L., De Clercq, N., Blasco-Angulo, N., Sunnerhagen, P., Alepuz, P. (2012). Yeast mRNA cap-binding protein Cbc1/Sto1 is necessary for the rapid reprogramming of translation after hyperosmotic shock. *Molecular biology of the cell*, 23(1), 137–150. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-05-0419>

Garrido-Pérez, J. M., García-Herrera, R., Barriopedro, D., Ordóñez, C. (2023). Shifting summer holidays in Spain as an adaptation measure to climate change. *Science of the Total Environment*, 904, 166879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166879>

Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), 737–741. <https://doi.org/10.1038/nature02046>

GmbH, W. (2020). Norisoprenoides.wein.plus. (Consultado el 29 de junio de 2021). <https://glossaire.wein.plus/norisoprenoides-2>

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

Gomès, É., Maillot, P., Duchêne, É. (2021). Molecular tools for adapting viticulture to climate change. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.633846>

Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Cabisco, E., Matallana, E. (2010). Transcriptomic and proteomic insights of the wine yeast biomass propagation process. *Fems Yeast Research*, 10(7), 870-884. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00667.x>

Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Cabisco, E., Ros, J., Matallana, E. (2012). Correction: Reduction of oxidative cellular damage by overexpression of the thioredoxin TRX2 gene improves yield and quality of wine yeast dry active biomass. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 31. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-31>

González-Jiménez, M. D. C., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., Sánchez-León, I., Puig-Pujol, A., Moreno, J., Moreno-García, J. (2020). Comparative study of the proteins involved in the fermentation-derived compounds in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* during sparkling wine second fermentation. *Microorganisms*, 8(8), 1209. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081209>

González-Jiménez, M. D. C., Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J. J., Puig-Pujol, A., Capdevilla, F., Mauricio, J. C. (2020). Differential analysis of proteins involved in ester metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during the second fermentation in sparkling wine elaboration. *Microorganisms*, 8(3), 403. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030403>

González-Jiménez, M. D. C., García-Martínez, T., Puig-Pujol, A., Capdevila, F., Moreno-García, J., Moreno, J., Mauricio, J. C. (2020). Biological processes highlighted in *Saccharomyces cerevisiae* during the sparkling wines elaboration. *Microorganisms*, 8(8), 1216. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081216>

González-Ramos, D. & González, R. (2006). Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9411–9416. <https://doi.org/10.1021/jf062196d>

Gougeon, L., da Costa, G., Guyon, F., Richard, T. (2019). ¹H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines. *Food Chemistry*, 301, 125257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125257>

Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Rosellini, D., Vincenzini, M. (1998). Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentation for the production of

Brunello di Montalcino wines. *Food Technology and Biotechnology*, 36, 313-318.

<https://hdl.handle.net/2158/311933>

Grassi, F. and Arroyo-Garcia, R. (2020) Editorial: Origins and domestication of the grape. *Frontiers in Plant Science*. 11:1176. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01176>

Grimplet, J., Wheatley, M. D., Jouira, H. B., Deluc, L. G., Cramer, G. R., Cushman, J. C. (2009). Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well-watered and water-deficit stress conditions. *Proteomics*, 9(9), 2503-2528.

<https://doi.org/10.1002/pmic.200800158>

Guittin, C.; Maçna, F.; Sanchez, I.; Barreau, A.; Poitou, X.; Sablayrolles, J.-M.; Mouret, J.-R.; Farines, V. (2022). The impact of must nutrients and yeast strain on the aromatic quality of wines for cognac distillation. *Fermentation*, 8, 51.

<https://doi.org/10.3390/fermentation8020051>

Gutiérrez-Gamboa, G., Wu, Z., De Toda, F. M. (2021). Current viticultural techniques to mitigate the effects of global warming on grape and wine quality: A comprehensive review. *Food Research International*, 139, 109946.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109946>

Hannah, L., Roehrdanz, P. R., Ikegami, M., Shepard, A. V., Shaw, M. R., Tabor, G. M., Lü, Z., Marquet, P. A., Hijmans, R. J. (2013). Climate change, wine, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6907-6912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210127110>

Harding, J. (2015). Robinson, J. (Ed.), *The Oxford Companion to Wine*: Oxford University Press. (Consultado el 12 de septiembre de 2023).

<https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780198705383.001.0001/acref-9780198705383>

Haseeb, S., Alexander, B., Santi, R. L., Liprandi, Á. S., Baranchuk, A. (2019). What's in wine? A clinician's perspective. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 29(2), 97-106.

<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2018.06.010>

Hazelwood, L., Daran, J., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2259-2266.

<https://doi.org/10.1128/aem.02625-07>

Hidalgo, J. (2011). *Tratado de Enología. Vol. I y II*. Ediciones Mundi-Prensa.

Holm, T. (1999). Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *Journal of Chromatography A*, 842(1-2), 221-227. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(98\)00706-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(98)00706-7)

IPCC, 2023: Sections. in: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. *IPCC*, 35-115.

<https://doi.org/10.59327/IPCC/AR6-9789291691647>

Izquierdo-González, J. J., Amil-Ruiz, F., Zazzu, S., Sánchez-Lucas, R., Fuentes-Almagro, C. A., Rodríguez-Ortega, M. J. (2019). Proteomic analysis of goat milk kéfir: profiling the fermentation-time dependent protein digestion and identification of potential peptides with biological activity. *Food Chemistry*, 295, 456–465.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.178>

Jagatić-Korenika, A., Preiner, D., Tomaz, I., Jeromel, A. (2020). Volatile profile characterization of Croatian commercial sparkling wines. *Molecules*, 25(18), 4349.

<https://doi.org/10.3390/molecules25184349>

Jolly, N., Augustyn, O., Pretorius, Isak. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 15-38.

<https://doi.org/10.21548/27-1-1475>

Jones, G. V., & Webb, L. (2010). Climate change, viticulture, and wine: challenges and opportunities. *Journal of Wine Research*, 21(2-3), 103-106.

<https://doi.org/10.1080/09571264.2010.530091>

Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic Change*, 73(3), 319-343.

<https://doi.org/10.1007/s10584-005-4704-2>

Jorrín-Novo, J. V., Maldonado, A., Echevarría-Zomeño, S., Valledor, L., Castillejo, M. Á., Curto, M., De Juan Valero, J. A., Sghaier, B., Donoso, G., Redondo, I. (2009). Plant proteomics Update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of Proteomics*, 72(3), 285-314. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.026>

Kay, Jane. (2006). Now's the time to cellar wine / Scientists fear / Scientists fear that rising temperatures due to global warming will harm the wine industry in Napa, Sonoma and Santa Barbara counties. *San Francisco Chronicle*, p. 2. (Consultado el 17 de septiembre de 2021). <http://www.sfgate.com/politics/article/Now-s-the-time-to-cellar-wine-Scientists-fear-2493071>.

Keller, M. (2010). Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: A climate change primer for viticulturists. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 56-69. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00077.x>

Kirkpatrick, N. (2011). Will global warming affect the wine industry? *mmn. com*.

Kłosowski, G., Mikulski, D., Macko, D., Miklaszewska, B., Kotarska, K., Czupryński, B. (2015). Influence of various yeast strains and selected starchy raw materials on production of higher alcohols during the alcoholic fermentation process. *European Food Research and Technology*, 240. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2323-8>

König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (2017). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. En *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5>

Labster Theory - Crecimiento Diaúxico (2021).

<https://theory.labster.com/diauxic-shift-es/>

Lafon-Lafourcade S. (1983). Wine and brandy. En *Reed G.: Biotechnology, Heidelberg, Verlag-Chemie*, 5, 81-163.

Lage, P., Sampaio-Marques, B., Ludovico, P., Mira, N. P., Mendes-Ferreira, A. (2019). Transcriptomic and chemogenomic analyses unveil the essential role of COM2-regulon in response and tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to stress induced by sulfur dioxide. *Microbial Cell*, 6(11), 509-523. <https://doi.org/10.15698/mic2019.11.697>

Lallanilla, M. (2011). Will global warming crush the wine industry? Live Science. (Consultado el 24 de septiembre de 2021).

<http://www.livescience.com/28577-wine-global-warming.html>

Lallemand Enología. (2017). *Lalvin ClosTM – Catálogo - Lallemand Enología*.

<https://www.lallemandwine.com/es/spain/productos/catalogo/levaduras/12/lalvin-clos/>

Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2019). Yeast and its importance to wine aroma - a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1).

<https://doi.org/10.21548/21-1-3560>

Legras, J. L., Erny, C., Charpentier, C. (2014). Population structure and comparative genome hybridization of European flor yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome. *PloS one*, 9(10), e108089.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108089>

Legras, J. L., Moreno-Garcia, J., Zara, S., Zara, G., Garcia-Martínez, T., Mauricio, J. C., Mannazzu, I., Coi, A. L., Bou Zeidan, M., Dequin, S., Moreno, J., Budroni, M. (2016). Flor yeast: new perspectives beyond wine aging. *Frontiers in Microbiology*, 7, 503.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00503>

Lereboullet, A., Beltrando, G., Bardsley, D. K. (2013). Socio-ecological adaptation to climate change: A comparative case study from the Mediterranean wine industry in France and Australia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 164, 273-285.

<https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.10.008>

Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D., Pretorius, I. S. (2006). The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23(9), 641-659.

<https://doi.org/10.1002/yea.1382>

Liti, G. (2015). *The Natural History of Model Organisms: The fascinating and secret wild life of the budding yeast S. cerevisiae*. eLife 4:e05835.

<https://doi.org/10.7554/eLife.05835>

Lu, Y., Voon, M., Huang, D., Lee, P., Liu, S. (2017). Combined effects of fermentation temperature and pH on kinetic changes of chemical constituents of durian wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7), 3005–3014. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8043-1>

Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., Grant, C. M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular biology of the cell*, 9(5), 1081–1091.

<https://doi.org/10.1091/mbc.9.5.1081>

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson.

<https://lib.ugent.be/catalog/rug01:002399713>

Magris, G., Jurman, I., Fornasiero, A., Paparelli, E., Schwoppe, R. M., Marroni, F., Di Gaspero, G., Morgante, M. (2021). The genomes of 204 *Vitis vinifera* accessions reveal the origin of European wine grapes. *Nature Communications*, 12(1).

<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27487-y>

Malys, N., Carroll, K., Miyan, J., Tollervey, D., McCarthy, J. E. (2004). The 'scavenger' m7GpppX pyrophosphatase activity of Dcs1 modulates nutrient-induced responses in yeast. *Nucleic acids research*, 32(12), 3590–3600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh687>

Map of Spain wine regions - Wine folly. (s. f.). Wine Folly.

<https://winefolly.com/deep-dive/map-of-spain-wine-regions/>

Marcé, R. M., Calull, M., Olucha, J., Borrull, F., Rius, F. X. (1991). Optimized isocratic separation of major carboxylic acids in wine. *Journal of Chromatography A*, 542, 277-293. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)88767-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)88767-7)

Martín-García, F. J., Palacios-Fernández, S., De Lerma, N. L., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., Peinado, R. A. (2023). The effect of yeast, sugar and sulfur dioxide on the volatile compounds in wine. *Fermentation*, 9(6), 541.

<https://doi.org/10.3390/fermentation9060541>

Martínez, A., Tudó, A., Aleixandre, J. L. (2016). Efectos de los fenómenos producidos por el cambio climático sobre la calidad de los vinos. En *Enovicultura*, 42.

Mason, A. B., & Dufour, J. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16(14), 1287-1298.

[https://doi.org/10.1002/1097-0061\(200010\)16:14](https://doi.org/10.1002/1097-0061(200010)16:14)

McGovern, P. E., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M. P., Smith, K. E., Hall, G. R., Kvavadze, E., Maghradze, D., Rusishvili, N., Bouby, L., Failla, O., Cola, G., Mariani, L., Boaretto, E., Baciliéri, R., This, P., Wales, N., Lordkipanidze, D. (2017). Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(48).

<https://doi.org/10.1073/pnas.1714728114>

Mendes-Pinto, M. M. (2009). Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma. *Archives of biochemistry and biophysics*, 483(2), 236–245.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.008>

Minebois, R., Pérez-Torrado, R., Querol, A. (2020). Metabolome segregation of four strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces kudriavzevii* conducted under low temperature oenological conditions. *Environmental Microbiology*, 22(9), 3700–3721. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15135>

Minebois, R., Pérez-Torrado, R., Querol, A. (2020). A time course metabolism comparison among *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* and *S. kudriavzevii* species in wine fermentation. *Food Microbiology*, 90, 103484. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103484>

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>

Mirabelli-Montan, Y., Marangon, M., Graça, A., Marangon, C., Wilkinson, K. (2021). Techniques for mitigating the effects of smoke taint while maintaining quality in wine production: a review. *Molecules*, 26(6), 1672. <https://doi.org/10.3390/molecules26061672>

Molina, A., Swiegers, J., Varela, C., Pretorius, I., Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(3), 675–687. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1194-3>

Molon, M., Woznicka, O., Zebrowski, J. (2018). Cell wall biosynthesis impairment affects the budding lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biogerontology*, 19(1), 67–79. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9740-6>

Moreno, J. & Peinado, R. (2012). *Enological chemistry*. Academic Press.

Moreno-Arribas, M., Polo, M. (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. En *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>

Moreno-García, J., García-Martínez, T., Millán, M. C., Mauricio, J. C., Moreno, J. (2015). Proteins involved in wine aroma compounds metabolism by a *Saccharomyces cerevisiae* flor-velum yeast strain grown in two conditions. *Food Microbiology*, 51, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.005>

Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J. J., Millán, M. C., Mauricio, J. C. (2014). A proteomic and metabolomic approach for understanding the role of the flor yeast mitochondria in the velum formation. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.030>

Moreno-García, J., Martín-García, F., Ogawa, M., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J. C., Bisson, L. F. (2018). *FLO1*, *FLO5* and *FLO11* flocculation gene expression impacts *Saccharomyces cerevisiae* attachment to *Penicillium chrysogenum* in a co-immobilization technique. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02586>

Moreno-García, J., Mauricio, J. C., Moreno, J., García-Martínez, T. (2017). Differential proteome analysis of a flor yeast strain under biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 720. <https://doi.org/10.3390/ijms18040720>

Moreno-García, J., Ogawa, M., Joseph, C. M., Mauricio, J. C., Moreno, J. J., García-Martínez, T. (2018). Comparative analysis of intracellular metabolites, proteins and their molecular functions in a flor yeast strain under two enological conditions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 35(1). <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2578-5>

Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., Bacelar, E., Torres-Pereira, J. M. (2004) Leaf gas exchange and water relations of grapevines grown in three different conditions. *Photosynthetica*, 42, 81–86. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000040573.09614.1d>

Mozell, M. R., & Thach, L. (2014). The impact of climate change on the global wine industry: challenges & solutions. *Wine Economics and Policy*, 3(2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2014.08.001>

Musumeci, L., Ryona, I., Pan, B., Loscos, N., Feng, H., Cleary, M., Sacks, G. (2015). Quantification of polyfunctional thiols in wine by HS-SPME-GC-MS following extractive alkylation. *Molecules*, 20(7), 12280–12299. <https://doi.org/10.3390/molecules200712280>

Myles, S., Boyko, A. R., Owens, C. L., Brown, P. J., Grassi, F., Aradhya, M. K., Prins, B., Reynolds, A., Chia, J. M., Ware, D., Bustamante, C. D., Buckler, E. S. (2011). Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), 3530-3535.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1009363108>

Nadai, C., Treu, L., Campanaro, S., Giacomini, A., Corich, V. (2016). Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(2), 797–813. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7169-x>

Nilsson, U., Barron, N., McHale, L., McHale, A. P. (1995). The effects of phosphoric acid pretreatment on conversion of cellulose to ethanol at 45 °C using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Biotechnology Letters*, 17(9), 985-988.

<https://doi.org/10.1007/bf00127439>

Noti, O., Vaudano, E., Giuffrida, M. G., Lamberti, C., Cavallarín, L., Garcia-Moruno, E., Pessione, E. (2018). Enhanced arginine biosynthesis and lower proteolytic profile as indicators of *Saccharomyces cerevisiae* stress in stationary phase during fermentation of high sugar grape must: A proteomic evidence. *Food Research International*, 105, 1011–1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.004>

Nykanen, L. (1986). Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84-96.

Ochando, T., Mouret, J., Humbert-Goffard, A., Aguera, E., Sablayrolles, J., Farines, V. (2020). Comprehensive study of the dynamic interaction between SO₂ and acetaldehyde during alcoholic fermentation. *Food Research International*, 136, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109607>

Ogawa, M., Moreno-García, J., Joseph, L. C. M., Mauricio, J. C., Moreno, J., García-Martínez, T. (2021). Metabolic changes by wine flor-yeasts with gluconic acid as the sole carbon source. *Metabolites*, 11(3), 150. <https://doi.org/10.3390/metabo11030150>

Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), 2022

Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in biotechnology*, 16(9), 373–378. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01214-1)

O'Rourke, S., & Herskowitz, I. (2004). Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 532-542. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0521>

Patel, S., & Shibamoto, T. (2002). Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 50(20), 5649-5653. <https://doi.org/10.1021/jf020337f>

Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1-32. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

Pastron, A. (2016, 13 marzo). *The grape migration to South America*. thebacklabel. <https://www.thebacklabel.com/the-grape-migration-to-south-america/>

Peinado, R., Moreno, J. A., Muñoz, D., Medina, M., Moreno, J. (2004) Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6389-6393. <https://doi.org/10.1021/jf049369o>

Peng, C., Viana, T., Petersen, M. A., Larsen, F. H., Arneborg, N. (2018). Metabolic footprint analysis of metabolites that discriminate single and mixed yeast cultures at two key time-points during mixed culture alcoholic fermentations. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 14(7), 93. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1391-3>

Pérez-Ortín, J.E.; García-Martínez, J. (2005). Genómica y proteómica de levaduras vínicas. En *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V.; Muñoz, R.; González, R. (Eds.). (pp. 185-209). AMV Ediciones, Madrid (España).

Pérez-Porto, J. P. & Gardey, A. (2018). Enología - Qué es, definición y concepto. *Definición.de*. <https://definicion.de/enologia/>

Pérez-Prieto, L. J., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Pardo-Mínguez, F., Gómez-Plaza, E. (2003). Extraction and formation dynamic of Oak-Related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5444-5449. <https://doi.org/10.1021/jf0345292>

Petrucci, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Spano, G., Sinigaglia, M. (2017). Microbial resources and enological significance: opportunities and benefits. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00995>

Petitgonnet, C., Klein, G. L., Roullier-Gall, C., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Julien-David, D., Alexandre, H. (2019). Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome. *Food Microbiology*, 83, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.005>

Peña-Ortiz, C., Barriopedro, D., García-Herrera, R. (2015). Multidecadal variability of the summer length in Europe*. *Journal of Climate*, 28(13), 5375-5388. <https://doi.org/10.1175/jcli-d-14-00429.1>

Picazo, C., Matallana, E., Aranda, A. (2018). Yeast thioredoxin reductase TRR1P controls TORC1-regulated processes. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34908-4>

Picotti, P., Clément-Ziza, M., Lam, H., Campbell, D. S., Schmidt, A., Deutsch, E. W., Röst, H., Sun, Z., Rinner, O., Reiter, L., Shen, Q., Michaelson, J. J., Frei, A., Alberti, S., Kusebauch, U., Wollscheid, B., Moritz, R. L., Beyer, A., Aebersold, R. (2013). A

complete mass-spectrometric map of the yeast proteome applied to quantitative trait analysis. *Nature*, 494(7436), 266–270. <https://doi.org/10.1038/nature11835>

Pigeau, G., & Inglis, D. (2007). Response of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) aldehyde dehydrogenases to acetaldehyde stress during icewine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1576-1586.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03381.x>

Pinto, J., Oliveira, A. S., Azevedo, J., De Freitas, V., Lopes, P., Roseira, I., Cabral, M., Guedes de Pinho, P. (2018). Assessment of oxidation compounds in oaked Chardonnay wines: A GC-MS and 1H NMR metabolomics approach. *Food Chemistry*, 257, 120–127.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.156>

Plata, M. D. C., Mauricio, J. C., Millán, C., Ortega, J. M. (1998). In vitro specific activity of alcohol acetyltransferase and esterase in two flor yeast strains during biological aging of sherry wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(4), 369-374.

[https://doi.org/10.1016/s0922-338x\(98\)80079-2](https://doi.org/10.1016/s0922-338x(98)80079-2)

Porras-Agüera, J. A., Moreno-García, J., Mauricio, J. C., Moreno, J., García-Martínez, T. (2019). First proteomic approach to identify cell death biomarkers in wine yeasts during sparkling wine production. *Microorganisms*, 7(11), 542.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7110542>

Porras-Agüera, J. A., Moreno-García, J., González-Jiménez, M. D. C., Mauricio, J. C., Moreno, J., García-Martínez, T. (2020). Autophagic proteome in two *Saccharomyces cerevisiae* strains during second fermentation for sparkling wine elaboration. *Microorganisms*, 8(4), 523. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040523>

Porras-Agüera, J. A., Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J. C. (2021). Impact of CO₂ overpressure on yeast mitochondrial associated proteome

during the "prise de mousse" of sparkling wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 348, 109226. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109226>

Porras-Agüera, J. A., Mauricio, J. C., Moreno-García, J., Moreno, J., García-Martínez, T. (2020). A differential proteomic approach to characterize the cell wall adaptive response to CO₂ overpressure during sparkling wine-making process. *Microorganisms*, 8(8), 1188.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081188>

Porras-Agüera, J. A., Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J. C. (2021). Impact of CO₂ overpressure on yeast mitochondrial associated proteome during the "prise de mousse" of sparkling wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 348, 109226. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109226>

Pretorius, I. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 15, 675-629.

[http://dx.doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B)

Qi, S., & Li, Q. X. (2010). Proteomics in pesticide toxicology. En *Elsevier eBooks* (pp. 603-626). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374367-1.00021-5>

Quain, D. E. (1988). Studies on yeast physiology-impact on fermentation performance and product quality. *Journal of The Institute of Brewing*, 94(5), 315-323.

<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1988.tb04589.x>

Querol, A. & Fleet, G. H. (2006). Yeasts in food and beverages. En *Springer eBooks*.

<https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0>

Querol, A., Pérez-Torrado, R., Alonso-Del-Real, J., Minebois, R., Stribny, J., Oliveira, B. M., Barrio, E. (2018). New trends in the uses of yeasts in Oenology. *Advances in food and nutrition research*, 85, 177–210. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.03.002>

Rapp, A., & Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. En *Developments in food science* (pp. 1659-1694).

[https://doi.org/10.1016/s0167-4501\(06\)80257-8](https://doi.org/10.1016/s0167-4501(06)80257-8)

Remize, F., Andrieu, É., Dequin, S. (2000). Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the cytosolic MG²⁺ and mitochondrial K⁺ Acetaldehyde dehydrogenases ALD6P and ALD4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3151-3159. <https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3151-3159.2000>

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., Glories, Y., Maugean, A. (2008). *Tratado de enología de Ribereau-Gayón*. Hemisferio sur.

Rochfort, S., Ezernieks, V., Bastian, S. E., Downey, M. O. (2010). Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chemistry*, 121(4), 1296-1304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.067>

Röcker, J., Schmitt, M., Pasch, L., Ebert, K., Grossmann, M. (2016). The use of glucose oxidase and catalase for the enzymatic reduction of the potential ethanol content in wine. *Food Chemistry*, 210, 660-670. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.093>

Romano, P., Braschi, G., Siesto, G., Patrignani, F., Lanciotti, R. (2022). Role of yeasts on the sensory component of wines. *Foods*, 11(13), 1921. <https://doi.org/10.3390/foods11131921>

Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., Polsinelli, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Fems Microbiology Letters*, 118(3), 213-218. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06830.x>

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>

Rosonina, E., Willis, I., Manley, J. (2009). Sub1 functions in osmoregulation and in transcription by both RNA polymerases II and III. *Molecular and cellular biology*, 29(8), 2308–2321. <https://doi.org/10.1128/MCB.01841-08>

Rossignol, T., Kobi, D., Jacquet-Gutfreund, L., Blondin, B. (2009). The proteome of a wine yeast strain during fermentation, correlation with the transcriptome. *Journal of applied microbiology*, 107(1), 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04156.x>

Rossouw, D., Olivares-Hernandes, R., Nielsen, J., Bauer, F. F. (2009). Comparative transcriptomic approach to investigate differences in wine yeast physiology and metabolism during fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 75(20), 6600–6612. <https://doi.org/10.1128/AEM.01251-09>

Rossouw, D., Van den Dool, A., Jacobson, D., Bauer, F. (2010). Comparative transcriptomic and proteomic profiling of industrial wine yeast strains. *Applied and environmental microbiology*, 76(12), 3911–3923. <https://doi.org/10.1128/AEM.00586-10>

Ruffner, H. (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis V*: a review. *A. Vitis*.,: 247V259.

Ruíz-Muñoz, M., Hernández-Fernández, M., Cordero-Bueso, G., Martínez-Verdugo, S., Pérez, F. J., Cantoral, J. M. (2022). Non-*Saccharomyces* are also forming the veil of flor in sherry wines. *Fermentation*, 8(9), 456. <https://doi.org/10.3390/fermentation8090456>

Sablayrolles, J., Barré, P., Grenier, P. (1987). Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnology Techniques*, 1(3). <https://doi.org/10.1007/bf00227557>

Saerens, S., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 3(2), 165-177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>

Saerens, S., Thevelein, J., Delvaux, F. R. (2008). Ethyl ester production during brewery fermentation, a review. *Cerevisia*, 33(2), 82-90.

Saerens, S., Verstrepen, K. J., De Laere, S., Voet, A., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode

novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4446-4456.

<https://doi.org/10.1074/jbc.m512028200>

Sailwal, M., Das, A. J., Gazara, R. K., Dasgupta, D., Bhaskar, T., Hazra, S., Ghosh, D. (2020). Connecting the dots: Advances in modern metabolomics and its application in yeast system. *Biotechnology advances*, 44, 107616.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107616>

Salvadó, Z., Chiva, R., Rodríguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., Mas, A., Guillamón, J. M. (2008). Proteomic evolution of a wine yeast during the first hours of fermentation. *Fems Yeast Research*, 8(7), 1137-1146. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00389.x>

Sánchez-Benítez, A., Barriopedro, D., García-Herrera, R. (2020). Tracking Iberian heatwaves from a new perspective. *Weather and Climate Extremes*, 28, 100238.

<https://doi.org/10.1016/j.wace.2019.100238>

Sánchez-Benítez, A., García-Herrera, R., Barriopedro, D., Sousa, P. M., Trigo, R. M. (2018). June 2017: The earliest European summer mega-heatwave of reanalysis period. *Geophysical Research Letters*, 45(4), 1955-1962. <https://doi.org/10.1002/2018gl077253>

Sancho-Galán, P., Amores-Arocha, A., Palacios, V., Jiménez-Cantizano, A. (2021). Effect of grape over-ripening and its skin presence on white wine alcoholic fermentation in a warm climate zone. *Foods*, 10(7), 1583. <https://doi.org/10.3390/foods10071583>

Santisi, J. (2011). Warming up the wine industry. *The Environmental Magazine*, 22(6), 15-17.

Schueuermann, C., Steel, C., Blackman, J., Clark, A. C., Schwarz, L. J., Moraga, J., Collado, I. G., Schmidtke, L. (2019). A GC-MS untargeted metabolomics approach for the classification of chemical differences in grape juices based on fungal pathogen. *Food Chemistry*, 270, 375-384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.057>

Schultz, H. & Jones, G. (2010) Climate induced historic and future changes in viticulture. *Journal of Wine Research*, 21(2-3), 137-145.

<https://doi.org/10.1080/09571264.2010.530098>

Sgubin, G., Swingedouw, D., Mignot, J., Gambetta, G. A., Bois, B., Loukos, H., Noël, T., Pieri, P., De Cortázar-Atauri, I. G., Ollat, N., Van Leeuwen, C. (2022). Non-linear loss of suitable wine regions over Europe in response to increasing global warming. *Global Change Biology*, 29(3), 808-826. <https://doi.org/10.1111/gcb.16493>

Shively, C. E., & Henick-Kling, T. (2001). Comparison of Two Procedures for Assay of Free Amino Nitrogen. *American Journal Of Enology And Viticulture*, 52(4), 400-401. <https://doi.org/10.5344/ajev.2001.52.4.400>

Shikímico, Ruta biogenética del ácido - Unidad de Informática del Instituto de Química. (s. f.).

<https://uniiquim.iquimica.unam.mx/glossary/shikimico-ruta-biogenetica-del-acido/>

Smyth, M., & Russell, J. D. (2009). ‘From graft to bottle’—Analysis of energy use in viticulture and wine production and the potential for solar renewable technologies. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 13(8), 1985-1993.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.01.007>

Snow R. (1975). Genetic improvement of wine yeast. En *Spencer J. F. T., Spencer D. M., Smith A. R. W.: Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects*, 439-458.

Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. (1997). Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(5), 287-313. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2825\(1997\)11:5](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2825(1997)11:5)

Sonck, K., Kint, G., Schoofs, G., Wauven, C. V., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. J. (2009). The proteome of *Salmonella typhimurium* grown under in vivo-mimicking conditions. *Proteomics*, 9(3), 565-579. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700476>

Sotomayor, J. & Ruiz, C. (2000). *Establecimiento y manejo de vides en el Secano Interior Centro Sur de Chile*.

Spiropoulos, A. E., & 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>

Standage, T. (2005). A history of the world in 6 glasses.

<http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA80579289>

Swaminathan, S., Masek, T., Molin, C., Pospisek, M., Sunnerhagen, P. (2006). Rck2 is required for reprogramming of ribosomes during oxidative stress. *Molecular biology of the cell*, 17(3), 1472–1482. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-07-0632>

Sweetman, C., Sadras, V. O., Hancock, R. D., Soole, K. L., Ford, C. M. (2014). Metabolic effects of elevated temperature on organic acid degradation in ripening vitis vinifera fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(20), 5975-5988. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru343>

Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. En *Advances in Applied Microbiology* (pp. 131-175). [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(05\)57005-9](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(05)57005-9)

Szopinska, A., Christ, E., Planchon, S., König, H., Evers, D., Renaut, J. (2016). Stuck at work? Quantitative proteomics of environmental wine yeast strains reveals the natural mechanism of overcoming stuck fermentation. *Proteomics*, 16(4), 593–608.

<https://doi.org/10.1002/pmic.201500225>

Tang, K.; Sun, Y.; Zhang, X.; Li, J.; Xu, Y. (2021). Chemical and sensory characterization of vidal icewines fermented with different yeast strains. *Fermentation*, 7, 211.

<https://doi.org/10.3390/fermentation7040211>

Tate, A. (2001). Global warming's impact on wine. *Journal of Wine Research*, 12(2), 95-109. <https://doi.org/10.1080/09571260120095012>

Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711–18739. <https://doi.org/10.3390/ijms140918711>

Teixeira, M. C., Mira, N. P., Sá-Correia, I. (2011). A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current opinion in Biotechnology*, 22(2), 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.011>

Terral, J., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance, J., Jung, C., Fabre, L., Tardy, C., Compan, M., Bacilieri, R., Lacombe, T., This, P. (2009). Evolution and History of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: New morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105(3), 443-455. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp298>

The Wine Industry of Australia 1788-1979. (s. f.).

http://artserve.anu.edu.au/raid1/student_projects/wine/wia.html

Theodoridis, G., Gika, H., Franceschi, P., Caputi, L., Arapitsas, P., Scholz, M., Masuero, D., Wehrens, R., Vrhovšek, U., Mattivi, F. (2011). LC-MS based global metabolite profiling of grapes: solvent extraction protocol optimisation. *Metabolomics*, 8(2), 175-185. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0298-z>

Tiefenbacher, John & Townsend, Christi. (2019). The semiofoodscape of wine: The changing global landscape of wine culture and the language of making, selling, and drinking wine. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73400-2_213-2

Tofalo, R. (2021). Microbial dynamics in wine production. *Microorganisms*, 9, 700. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040700>

Török, T., Mortimer, R., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M. (1996). Quest for wine yeasts—An old story revisited. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(3-4), 303-313.

<https://doi.org/10.1007/bf01574705>

Torregrosa, L., Bigard, A., Doligez, A., Lecourieux, D., Rienth, M., Luchaire, N., Pieri, P., Chatbanyong, R., Shahood, R., Farnos, M., Roux, C., Adivèze, A., Pillet, J., Sire, Y., Zumstein, E., Veyret, M., Cunff, L. L., Lecourieux, F., Saurin, N., . . . Romieu, C. (2017). Developmental, molecular and genetic studies on grapevine response to temperature open breeding strategies for adaptation to warming. *OENO One*, 51(2), 155-165.

<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2017.51.2.1587>

Usbeck, J. C., Wilde, C., Bertrand, D., Behr, J., Vogel, R. F. (2014). Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(8), 3737–3752.

<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5586-x>

Usseglio-Tomasset, L. (1967). The volatile acids (homologous of acetic acid) in fermentation with various yeast species. *Atti.Acad.Ital. Vite Vino, Siena*, 19, 165-183

Valderrama-Heller, I. (2008). Aspectos generales en Microbiología clínica. Escuela de Medicina UMAR.

<https://es.slideshare.net/AuryHdezPerez1/microbiologiailsevalderrama12169446790893069091019182648phpapp01pdf>

Van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *Fems Microbiology Letters*, 32(3-4), 199-224.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01194.x>

Van Leeuwen, C. (2022). Terroir: the effect of the physical environment on vine growth, grape ripening, and wine sensory attributes. En *Elsevier eBooks* (pp. 341-393).

<https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102067-8.00005-1>

Van Leeuwen, C., Destrac-Irvine, A., Dubernet, M., Duchêne, É., Gowdy, M., Marguerit, E., Pieri, P., Parker, A., De Rességuier, L., Ollat, N. (2019). An update on the impact of climate change in viticulture and potential adaptations. *Agronomy*, 9(9), 514.

<https://doi.org/10.3390/agronomy9090514>

Van Leeuwen C. & Roby J. P. (2013). Préservation des ressources génétiques de la vigne et diversité des arômes. Nécessité d'une cohabitation entre sélection clonale institutionnelle, sélection massale et sélection clonale privée. *Revue des œnologues*, 148, 13-16.

Van Leeuwen, C., Trégoat, O., Choné, X., Bois, B., Pernet, D., Gaudillère, J. (2009). Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? *OENO One*, 43(3), 121.

<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2009.43.3.798>

Venios, X., Korkas, E., Nisiotou, A., Banilas, G. (2020). Grapevine responses to heat stress and global warming. *Plants*, 9(12), 1754. <https://doi.org/10.3390/plants9121754>

Venkataraman, C., Bhushan, M., Dey, S., Ganguly, D., Gupta, T., Habib, G., Kesarkar, A. P., Phuleria, H. C., Raman, R. S. (2020). Indian Network Project on carbonaceous aerosol emissions, source apportionment and climate impacts (COALESCE). *Bulletin of the American Meteorological Society*, 101(7), E1052-E1068.

<https://doi.org/10.1175/bams-d-19-0030.1>

Vilela-Moura, A., Schuller, D. E., Mendes-Faia, A., Côte-Real, M. (2010). Effects of acetic acid, ethanol, and SO₂ on the removal of volatile acidity from acidic wines by two *Saccharomyces cerevisiae* commercial strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4), 1317-1326. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2558-7>

Vink, N., Deloire, A., Bonnardot, V., Ewert, J. (2012). Climate change and the future of South Africa's wine industry. *International Journal of climate change strategies and management*, 4(4), 420-441.

Vitis — the plant list. (s. f.). <http://www.theplantlist.org/browse/A/Vitaceae/Vitis/>

Vollbrecht, D., & Radler, F. (1973). The formation of higher alcohols by amino acid auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. The conversion of amino acids to higher alcohols. *Archiv fur Mikrobiologie*, 94(4), 351-358.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4593312>

Wang, M., Wang, J., Chen, J., Philipp, C., Zhao, X., Wang, J., Liu, Y., Suo, R. (2022). Effect of commercial yeast starter cultures on cabernet sauvignon wine aroma compounds and microbiota. *Foods*, 11(12), 1725.

<https://doi.org/10.3390/foods11121725>

Waterhouse, A.L.; Sacks, G.L.; Jeffery, D. W. Understanding wine Chemistry, 1st ed. Wiley: Chichester, UK. 2016.

Webb, A. D. (1967). Some aroma compounds produced by vinous fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 9(3), 305-319.

<https://doi.org/10.1002/bit.260090304>

Webmaster. (2023). Química del dióxido de azufre en el vino. TDI Tecnología Difusión Ibérica, SL.

[https://t-d-i.es/quimica-del-dioxido-de-azufre-en-el-vino/#:~:text=Los%20vinos%20secos%20biodin%C3%A1micos%20certificados,Vins%20Naturels%2C%20de%20Francia\).](https://t-d-i.es/quimica-del-dioxido-de-azufre-en-el-vino/#:~:text=Los%20vinos%20secos%20biodin%C3%A1micos%20certificados,Vins%20Naturels%2C%20de%20Francia).)

Welker, S., Rudolph, B., Frenzel, E., Hagn, F., Liebisch, G., Schmitz, G., Scheuring, J., Kerth, A., Blume, A., Weinkauff, S., Haslbeck, M., Kessler, H., Buchner, J. (2010). Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function. *Molecular cell*, 39(4), 507–520.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.001>

Wines of South Africa - History. (s. f.). <https://www.wosa.us/wines/history/>

Wolff, S., Otto, A., Albrecht, D., Zeng, J. S., Büttner, K., Glückmann, M., Hecker, M., Becher, D. (2006). Gel-free and gel-based proteomics in *Bacillus subtilis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(7), 1183-1192. <https://doi.org/10.1074/mcp.m600069-mcp200>

Wu, C. C., & MacCoss, M. J. (2002). Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *PubMed*, 4(3), 242-250.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12139310>

Yang, F.; Heit, C.; Inglis, D.L. (2017) Cytosolic redox status of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) under hyperosmotic stress during icewine fermentation. *Fermentation*, 3, 61. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040061>

Zara, S., Bakalinsky, A. T., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M. A., Budroni, M. (2005). FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 2934–2939.

<https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2934-2939.2005>

Zara, S., Farris, G., Budroni, M., Bakalinsky, A. (2002). HSP12 is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S. cerevisiae*. *Yeast*, 19, 269-76.

<https://doi.org/10.1002/yea.831>

Zara, S., Gross, M. K., Zara, G., Budroni, M., Bakalinsky, A. T. (2010). Ethanol-independent biofilm formation by a flor wine yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 76(12), 4089–4091.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00111-10>

Zhang, W., Li, F., Nie, L. (2010). Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology*, 156(Pt 2), 287–301.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.034793-0>

Zhang, J., Plowman, J. E., Tian, B., Clerens, S., On, S. L. W. (2022). Predictive Potential of MALDI-TOF analyses for wine and brewing yeast. *Microorganisms*, 10(2), 265.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020265>

Zhao, X., Raitt, D., Burke, P., Clewell, A., Kwast, K., Poyton, R. (1996). Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a role in the oxidative stress response. *The Journal of biological chemistry*, 271(41), 25131–25138.

<https://doi.org/10.1074/jbc.271.41.25131>

Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E. (2012). Domestication of plants in the old world.

<https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199549061.001.0001>

Sección VII

ANEXO I

TABLAS SUPLEMENTARIAS

7. ANEXO I. TABLAS SUPLEMENTARIAS

TABLA A1. Niveles promedio de los parámetros enológicos evaluados en las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en presencia (+) de SO₂.

	<i>18 °C + SO₂</i>					
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>pH</i>	3.28 ± 0.16	3.31 ± 0.17	3.20 ± 0.16	3.32 ± 0.17	3.35 ± 0.17	3.17 ± 0.16
<i>AR (G+F) (g/L)</i>	1.70 ± 0.09	28 ± 1	4.2 ± 0.2	0.40 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.20 ± 0.01
<i>GAV (% v/v)</i>	14.3 ± 0.7	12.7 ± 0.6	13.7 ± 0.7	14.3 ± 0.7	14.7 ± 0.7	14.6 ± 0.7
<i>AT (g ácido tartárico/L)</i>	4.9 ± 0.2	4.2 ± 0.2	6.7 ± 0.3	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.2	5.6 ± 0.3
<i>AV (g ácido acético/L)</i>	0.19 ± 0.01	0.100 ± 0.005	0.28 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.27 ± 0.01
<i>Ácido málico (g/L)</i>	2.0 ± 0.1	1.30 ± 0.07	2.5 ± 0.1	1.70 ± 0.09	1.10 ± 0.06	1.70 ± 0.09
<i>NFA (mg/L)</i>	19 ± 1	16.0 ± 0.8	11.0 ± 0.6	16 ± 0.8	8.0 ± 0.4	12.0 ± 0.6

AR: Azúcares residuales; G: Glucosa; F: Fructosa; GAV: grado alcohólico volumétrico; AT: acidez titulable; AV: acidez volátil; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable.

TABLA A2. Niveles promedio de los parámetros enológicos evaluados en las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en ausencia (-) de SO₂.

<i>18 °C - SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>pH</i>	3.28 ± 0.16	3.30 ± 0.17	3.25 ± 0.16	3.30 ± 0.17	3.33 ± 0.17	3.14 ± 0.16
<i>AR (G+F) (g/L)</i>	1.8 ± 0.1	22 ± 1	3.0 ± 0.2	0.70 ± 0.04	0.40 ± 0.02	0.20 ± 0.01
<i>GAV (% v/v)</i>	14.3 ± 0.7	13.1 ± 0.7	14.0 ± 0.7	14.3 ± 0.7	14.7 ± 0.7	14.5 ± 0.7
<i>AT (g ácido tartárico/L)</i>	5.0 ± 0.3	4.3 ± 0.2	5.7 ± 0.3	5.0 ± 0.3	4.9 ± 0.2	5.6 ± 0.3
<i>AV (g ácido acético/L)</i>	0.18 ± 0.01	0.100 ± 0.005	0.34 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.25 ± 0.01
<i>Ácido málico (g/L)</i>	2.1 ± 0.1	1.40 ± 0.07	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.10 ± 0.06	1.80 ± 0.09
<i>NFA (mg/L)</i>	17.0 ± 0.9	19 ± 1	15.0 ± 0.8	16.0 ± 0.8	9.0 ± 0.5	11.0 ± 0.6

AR: Azúcares residuales; G: Glucosa; F: Fructosa; GAV: grado alcohólico volumétrico; AT: acidez titulable; AV: acidez volátil; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable.

TABLA A3. Niveles promedio de los parámetros enológicos evaluados en las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 25 °C en presencia (+) de SO₂.

		<i>25 °C + SO₂</i>					
		B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>pH</i>		3.31 ± 0.17	3.32 ± 0.17	3.29 ± 0.16	3.31 ± 0.17	3.40 ± 0.17	3.28 ± 0.16
<i>AR (G+F) (g/L)</i>		1.10 ± 0.06	29 ± 1	2.4 ± 0.1	1.30 ± 0.07	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01
<i>GAV (% v/v)</i>		14.1 ± 0.7	12.5 ± 0.6	13.8 ± 0.7	14.0 ± 0.7	14.6 ± 0.7	14.4 ± 0.7
<i>AT (g ácido tartárico/L)</i>		5.2 ± 0.3	4.7 ± 0.2	6.5 ± 0.3	5.6 ± 0.3	4.9 ± 0.2	5.6 ± 0.3
<i>AV (g ácido acético/L)</i>		0.22 ± 0.01	0.130 ± 0.007	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.26 ± 0.01
<i>Ácido málico (g/L)</i>		1.60 ± 0.08	1.30 ± 0.07	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.20 ± 0.06	1.80 ± 0.09
<i>NFA (mg/L)</i>		23 ± 1	19 ± 1	20 ± 1	19 ± 1	18.0 ± 0.9	11.0 ± 0.6

AR: Azúcares residuales; G: Glucosa; F: Fructosa; GAV: grado alcohólico volumétrico; AT: acidez titulable; AV: acidez volátil; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable.

TABLA A4. Niveles promedio de los parámetros enológicos evaluados en las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 25 °C en ausencia (-) de SO₂.

		<i>25 °C - SO₂</i>					
		B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>pH</i>		3.29 ± 0.16	3.34 ± 0.17	3.32 ± 0.17	3.31 ± 0.17	3.36 ± 0.17	3.23 ± 0.16
<i>AR (G+F) (g/L)</i>		1.70 ± 0.09	37 ± 2	3.7 ± 0.2	0.60 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01
<i>GAV (% v/v)</i>		14.1 ± 0.7	12.0 ± 0.6	13.8 ± 0.7	14.1 ± 0.7	14.7 ± 0.7	14.5 ± 0.7
<i>AT (g ácido tartárico/L)</i>		5.4 ± 0.3	4.7 ± 0.2	5.8 ± 0.3	5.4 ± 0.3	4.9 ± 0.2	5.8 ± 0.3
<i>AV (g ácido acético/L)</i>		0.20 ± 0.01	0.100 ± 0.005	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.23 ± 0.01
<i>Ácido málico (g/L)</i>		1.50 ± 0.08	1.20 ± 0.06	2.0 ± 0.1	1.80 ± 0.09	1.20 ± 0.06	1.70 ± 0.09
<i>NFA (mg/L)</i>		21 ± 1	21 ± 1	22 ± 1	18.0 ± 0.9	22 ± 1	14.0 ± 0.7

AR: Azúcares residuales; G: Glucosa; F: Fructosa; GAV: grado alcohólico volumétrico; AT: acidez titulable; AV: acidez volátil; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable.

TABLA A5. Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de los valores de los parámetros enológicos evaluados en los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura empleada, la temperatura de fermentación y la presencia o ausencia de SO₂ en los mostos.

MANOVA			
	Levadura	Temperatura	SO₂
<i>pH</i>	ns	ns	ns
<i>AR (G+F) (g/L)</i>	***	*	ns
<i>GAV (% v/v)</i>	***	ns	ns
<i>AT (g ácido tartárico/L)</i>	***	**	ns
<i>AV (g ácido acético/L)</i>	***	*	ns
<i>Ácido málico (g/L)</i>	***	**	ns
<i>NFA (mg/L)</i>	***	***	ns

AR: Azúcares residuales; G: Glucosa; F: Fructosa; GAV: grado alcohólico volumétrico; AT: acidez titulable; AV: acidez volátil; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable. ***: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99.9%; **: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99%; *: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 95%; “ns”: ausencia de diferencias significativas en las variables dependientes.

TABLA A6. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los ácidos grasos y alcoholes detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en presencia (+) de SO_2 .

<i>18 °C + SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Ácidos grasos	708 ± 23	4483 ± 292	2411 ± 132	4526 ± 173	5298 ± 230	1412 ± 65
<i>Ácido octanoico</i>	563 ± 16	3414 ± 238	1968 ± 97	3365 ± 123	4113 ± 171	1269 ± 59
<i>Ácido decanoico</i>	146 ± 7	1068 ± 78	443 ± 36	1161 ± 51	1184 ± 77	143 ± 6
Alcoholes (mg/L)	661 ± 4	930 ± 5	998 ± 13	690 ± 2	638 ± 7	677 ± 6
<i>Alcoholes isoamílicos (mg/L)</i>	166 ± 1	138 ± 2	234 ± 2	217 ± 0.7	219 ± 0.9	203.4 ± 0.4
<i>2-feniletanol (mg/L)</i>	43.1 ± 0.6	66.9 ± 0.8	79 ± 1	51.4 ± 0.5	35.5 ± 0.7	46.4 ± 0.4
<i>Metanol (mg/L)</i>	45 ± 3	52.7 ± 0.9	63 ± 1	57 ± 1	46.9 ± 0.9	45 ± 1
<i>Propanol (mg/L)</i>	14.4 ± 0.4	18.8 ± 0.3	25 ± 1	15.0 ± 0.9	14.2 ± 0.5	17.2 ± 0.2
<i>2,3-butanodiol (levo) (mg/L)</i>	289 ± 1	483 ± 6	435 ± 6	245.8 ± 0.6	222 ± 5	264 ± 6
<i>2,3-butanodiol (meso) (mg/L)</i>	89.2 ± 0.6	157.9 ± 0.7	130 ± 4	85 ± 2	78 ± 1	82.4 ± 0.6
<i>Isobutanol (mg/L)</i>	12.1 ± 0.2	11.17 ± 0.02	31.01 ± 0.06	17.0 ± 0.1	21.27 ± 0.03	16.5 ± 0.1
<i>Hexanol</i>	804 ± 21	779 ± 9	831 ± 10	826 ± 8	816 ± 40	674 ± 19
<i>2-etil-1-hexanol</i>	257 ± 11	393 ± 19	251 ± 14	289 ± 13	417 ± 18	296 ± 14
<i>1-octanol</i>	20.4 ± 0.8	67 ± 2	18 ± 1	28 ± 2	37 ± 1	40 ± 2
<i>1-decanol</i>	82 ± 4	69 ± 3	91 ± 5	113 ± 6	90 ± 2	101 ± 5
<i>Dodecanol</i>	27.3 ± 0.9	94 ± 6	66 ± 3	108 ± 4	120 ± 8	67 ± 5
<i>Guaiacol</i>	39 ± 2	34 ± 3	22 ± 2	55 ± 4	44 ± 4	36 ± 2
<i>4-vinilfenol</i>	134 ± 4	147 ± 10	127 ± 6	127 ± 9	189 ± 8	203 ± 16
<i>2-metoxi-4-vinilfenol</i>	95 ± 6	61 ± 3	57 ± 3	50 ± 2	197 ± 8	299 ± 16

TABLA A7. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los ácidos grasos y alcoholes detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en ausencia (-) de SO_2 .

<i>18 °C - SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Ácidos grasos	931 ± 45	2954 ± 166	6233 ± 257	4664 ± 93	1707 ± 67	2016 ± 115
<i>Ácido octanoico</i>	681 ± 34	2771 ± 169	5058 ± 209	3517 ± 90	1329 ± 44	1669 ± 96
<i>Ácido decanoico</i>	250 ± 19	183 ± 12	1175 ± 68	1147 ± 43	379 ± 22	346 ± 21
Alcoholes (mg/L)	616 ± 7	914 ± 8	787 ± 9	647 ± 6	666 ± 11	742 ± 16
<i>Alcoholes isoamílicos (mg/L)</i>	154 ± 6	133.6 ± 0.4	167.1 ± 0.2	199.3 ± 0.2	206 ± 2	209 ± 0.9
<i>2-feniletanol (mg/L)</i>	37.9 ± 0.3	72 ± 1	30.9 ± 0.3	49.8 ± 0.3	30.9 ± 0.7	48.8 ± 0.6
<i>Metanol (mg/L)</i>	44 ± 2	49.5 ± 0.8	61 ± 4	52.1 ± 0.6	47 ± 2	53 ± 2
<i>Propanol (mg/L)</i>	16.0 ± 0.3	22 ± 1	26 ± 1	16.3 ± 0.5	19 ± 1	20.1 ± 0.6
<i>2,3-butanodiol (levo) (mg/L)</i>	273 ± 3	472 ± 4	372 ± 7	233 ± 5	254 ± 8	303 ± 12
<i>2,3-butanodiol (meso) (mg/L)</i>	83 ± 2	153 ± 2	113 ± 2	79 ± 1	88 ± 1	90 ± 2
<i>Isobutanol (mg/L)</i>	11.1 ± 0.3	10 ± 0.7	15.8 ± 0.2	14.86 ± 0.09	19.5 ± 0.2	16.5 ± 0.1
<i>Hexanol</i>	818 ± 29	927 ± 34	895 ± 47	844 ± 2	800 ± 12	660 ± 39
<i>2-etil-1-hexanol</i>	297 ± 23	349 ± 19	276 ± 20	311 ± 13	309 ± 12	339 ± 23
<i>1-octanol</i>	26 ± 2	66 ± 3	18 ± 1	48 ± 3	31 ± 2	45 ± 3
<i>1-decanol</i>	96 ± 5	65 ± 3	100 ± 5	138 ± 5	62 ± 4	93 ± 5
<i>Dodecanol</i>	31 ± 2	60 ± 4	113 ± 5	105 ± 6	88 ± 5	130 ± 10
<i>Guaiacol</i>	41 ± 1	42 ± 3	41 ± 3	54 ± 3	39 ± 1	32 ± 2
<i>4-vinilfenol</i>	126 ± 6	215 ± 11	135 ± 5	123 ± 9	352 ± 18	183 ± 12
<i>2-metoxi-4-vinilfenol</i>	63 ± 2	64 ± 4	83 ± 4	38 ± 2	162 ± 12	238 ± 14

TABLA A8. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los ácidos grasos y alcoholes detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en presencia (+) de SO_2 .

<i>25 °C + SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Ácidos grasos	1978 ± 101	1842 ± 115	2801 ± 153	3035 ± 176	2038 ± 57	1889 ± +68
<i>Octanoico</i>	1607 ± 82	1635 ± 98	2400 ± 141	2135 ± 133	1704 ± 39	1365 ± 56
<i>Decanoico</i>	370 ± 20	207 ± 18	401 ± 13	900 ± 53	334 ± 19	524 ± 32
Alcoholes (mg/L)	819 ± 7	1359 ± 15	1068 ± 16	884 ± 12	776 ± 13	903 ± 15
<i>Alcoholes isoamílicos (mg/L)</i>	222.4 ± 0.9	164.5 ± 0.8	271 ± 1	295 ± 2	260 ± 1	263 ± 1
<i>2-feniletanol (mg/L)</i>	68.0 ± 0.3	80.2 ± 0.4	86 ± 0.3	93 ± 3	50.5 ± 0.7	80.9 ± 0.6
<i>Metanol (mg/L)</i>	47 ± 2	57 ± 4	63 ± 3	56 ± 4	54 ± 3	53 ± 2
<i>Propanol (mg/L)</i>	12.7 ± 0.2	19.6 ± 0.5	26.7 ± 0.9	17.7 ± 0.4	13.3 ± 0.7	18.5 ± 0.9
<i>2,3-butanodiol (levo) (mg/L)</i>	337 ± 4	765 ± 11	456 ± 11	292 ± 5	264 ± 8	355 ± 13
<i>2,3-butanodiol (meso) (mg/L)</i>	105 ± 1	260 ± 3	137.1 ± 3	100 ± 2	95 ± 2	107 ± 2
<i>Isobutanol (mg/L)</i>	24.16 ± 0.09	12.2 ± 0.3	29.5 ± 0.2	29.2 ± 0.8	38.4 ± 0.5	24.17 ± 0.02
<i>Hexanol</i>	749 ± 21	827 ± 25	920 ± 19	852 ± 30	822 ± 26	647 ± 35
<i>2-etil-1-hexanol</i>	427 ± 18	348 ± 11	319 ± 16	254 ± 13	346 ± 24	319 ± 21
<i>1-octanol</i>	33 ± 2	58 ± 3	87 ± 5	47 ± 48	45 ± 3	49 ± 2
<i>1-decanol</i>	122 ± 6	72 ± 2	124 ± 10	114 ± 2	82 ± 7	92 ± 6
<i>Dodecanol</i>	66 ± 3	69 ± 3	94 ± 4	127 ± 8	115 ± 6	145 ± 9
<i>Guaiacol</i>	37 ± 1	35 ± 2	33 ± 2	53 ± 15	35 ± 2	35 ± 3
<i>4-vinilfenol</i>	132 ± 9	158 ± 11	136 ± 7	153 ± 7	190 ± 8	190 ± 6
<i>2-metoxi-4-vinilfenol</i>	48 ± 4	45 ± 3	63 ± 3	40 ± 2	95 ± 6	185 ± 10

TABLA A9. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los ácidos grasos y alcoholes detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en ausencia (-) de SO_2 .

<i>25 °C - SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Ácidos grasos	1911 ± 146	1633 ± 116	3476 ± 189	3295 ± 107	3598 ± 112	1877 ± 105
<i>Octanoico</i>	1562 ± 107	1509 ± 108	3012 ± 165	2350 ± 69	3017 ± 78	1466 ± 86
<i>Decanoico</i>	349 ± 41	124 ± 9	464 ± 28	945 ± 38	581 ± 36	412 ± 28
Alcoholes (mg/L)	868 ± 14	1189 ± 19	964 ± 21	849 ± 15	758 ± 17	895 ± 10
<i>Alcoholes isoamílicos (mg/L)</i>	237 ± 3	151 ± 1	181 ± 1	279 ± 11	244 ± 1	258.3 ± 0.5
<i>2-feniletanol (mg/L)</i>	71.4 ± 0.6	71.1 ± 0.6	51 ± 2	94 ± 2	47 ± 0.7	73.8 ± 0.1
<i>Metanol (mg/L)</i>	50 ± 3	46 ± 2	64 ± 5	53 ± 4	52 ± 2	52 ± 1
<i>Propanol (mg/L)</i>	14.9 ± 0.3	19.4 ± 0.5	31.2 ± 0.4	13.6 ± 0.2	18.5 ± 0.4	19.6 ± 0.7
<i>2,3-butanodiol (levo) (mg/L)</i>	358 ± 9	665 ± 16	466 ± 9	283 ± 4	267 ± 9	356 ± 8
<i>2,3-butanodiol (meso) (mg/L)</i>	111 ± 3	221 ± 2	147 ± 6	96 ± 2	95 ± 3	110 ± 2
<i>Isobutanol (mg/L)</i>	24.7 ± 0.3	13.1 ± 0.2	21.6 ± 0.2	28.7 ± 0.2	37.8 ± 0.2	23.9 ± 0.6
<i>Hexanol</i>	775 ± 8	742 ± 20	873 ± 26	807 ± 10	835 ± 16	646 ± 7
<i>2-etil-1-hexanol</i>	300 ± 14	295 ± 8	359 ± 11	291 ± 9	350 ± 15	310 ± 14
<i>1-octanol</i>	37 ± 1	43 ± 3	38 ± 3	36 ± 1	50 ± 3	53 ± 3
<i>1-decanol</i>	117 ± 7	60 ± 5	84 ± 7	118 ± 8	86 ± 7	102 ± 6
<i>Dodecanol</i>	61 ± 2	74 ± 4	102 ± 8	190 ± 10	103 ± 6	170 ± 4
<i>Guaiacol</i>	46 ± 4	41 ± 3	29 ± 3	48 ± 2	29 ± 2	36 ± 2
<i>4-vinilfenol</i>	165 ± 9	192 ± 13	110 ± 8	133 ± 6	152 ± 5	182 ± 13
<i>2-metoxi-4-vinilfenol</i>	45 ± 3	38 ± 2	47 ± 3	53 ± 4	71 ± 5	167 ± 5

TABLA A10. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los ésteres etílicos detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a $18\text{ }^\circ\text{C}$ en presencia (+) de SO_2 .

<i>Ésteres etílicos (mg/L)</i>	<i>18 °C + SO₂</i>					
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
	17.2 ± 0.5	88 ± 4	28 ± 2	13.7 ± 0.4	12.9 ± 0.2	28 ± 2
<i>Propanoato de etilo</i>	46 ± 2	134 ± 4	72 ± 2	42 ± 2	57 ± 2	58 ± 3
<i>Butanoato de etilo</i>	207 ± 5	422 ± 8	326 ± 18	344 ± 13	404 ± 19	380 ± 16
<i>2-metilbutanoato de etilo</i>	1.59 ± 0.08	3.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.2 ± 0.1	1.67 ± 0.05	2.4 ± 0.5
<i>3-metilbutanoato de etilo</i>	5.73 ± 0.04	3.6 ± 0.1	7.8 ± 0.4	5.00 ± 0.06	4.3 ± 0.2	5.3 ± 0.5
<i>4-hidroxibutanoato de etilo</i>	1.86 ± 0.08	1.16 ± 0.07	6.9 ± 0.4	1.22 ± 0.09	1.7 ± 0.1	4.1 ± 0.2
<i>Hexanoato de etilo</i>	167 ± 4	618 ± 9	257 ± 6	422 ± 9	784 ± 22	748 ± 10
<i>Heptanoato de etilo</i>	0.175 ± 0.005	0.59 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.39 ± 0.01
<i>Octanoato de etilo</i>	73 ± 3	343 ± 3	124 ± 5	175 ± 4	278 ± 10	504 ± 4
<i>3-hidroxiocetanoato de etilo</i>	4.13 ± 0.09	11.2 ± 0.3	5.6 ± 0.2	4.1 ± 0.2	6.7 ± 0.3	2.4 ± 0.1
<i>Decanoato de etilo</i>	10.9 ± 0.6	148 ± 4	32. ± 1	25.9 ± 0.6	48.7 ± 0.7	75 ± 3
<i>Dodecanoato de etilo</i>	0.78 ± 0.03	6.8 ± 0.5	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.6 ± 0.2
<i>3-hidroxidodecanoato de etilo</i>	0.24 ± 0.02	4.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.96 ± 0.04	3.0 ± 0.2	1.22 ± 0.05
<i>Hexadecanoato de etilo</i>	2.41 ± 0.03	11.2 ± 0.3	9.7 ± 0.8	10.4 ± 0.8	52 ± 1	55 ± 2
<i>Fenilhexanoato de etilo</i>	0.355 ± 0.005	3.74 ± 0.06	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.01	1.31 ± 0.03	0.79 ± 0.03
<i>Fenilacetato de etilo</i>	37.1 ± 0.7	50 ± 1	69 ± 3	36 ± 2	36 ± 3	36 ± 1
<i>Isopentilsuccinato de etilo</i>	16.4 ± 0.7	24 ± 1	68 ± 4	30.7 ± 0.6	17.7 ± 0.7	15 ± 1
<i>Succinato de dietilo (mg/L)</i>	16.6 ± 0.5	86 ± 4	27 ± 2	12.6 ± 0.4	11.2 ± 0.3	26 ± 2

TABLA A11. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los ésteres etílicos detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a $18\text{ }^\circ\text{C}$ en ausencia (-) de SO_2 .

<i>18 °C - SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Ésteres etílicos (mg/L)	15.4 ± 0.8	51 ± 3	25 ± 1	13.0 ± 0.2	13.2 ± 0.5	43 ± 2
<i>Propanoato de etilo</i>	47 ± 3	209 ± 7	57 ± 2	37 ± 2	65 ± 3	67 ± 3
<i>Butanoato de etilo</i>	222 ± 5	368 ± 6	487 ± 15	322 ± 8	454 ± 15	399 ± 18
<i>2-metilbutanoato de etilo</i>	1.50 ± 0.09	3.31 ± 0.09	2.5 ± 0.1	1.68 ± 0.01	1.67 ± 0.08	1.70 ± 0.05
<i>3-metilbutanoato de etilo</i>	6.8 ± 0.4	4.1 ± 0.2	6.7 ± 0.3	4.6 ± 0.2	5.0 ± 0.3	4.5 ± 0.3
<i>4-hidroxibutanoato de etilo</i>	2.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	4.1 ± 0.2	1.35 ± 0.09	0.44 ± 0.04	5.3 ± 0.2
<i>Hexanoato de etilo</i>	216 ± 10	352 ± 9	503 ± 12	385 ± 5	856 ± 27	685 ± 26
<i>Heptanoato de etilo</i>	0.22 ± 0.01	0.54 ± 0.02	0.393 ± 0.006	0.37 ± 0.03	0.44 ± 0.02	0.37 ± 0.02
<i>Octanoato de etilo</i>	96 ± 3	230 ± 8	202 ± 3	177 ± 1	245 ± 11	438 ± 10
<i>3-hidroxi octanoato de etilo</i>	4.0 ± 0.2	13.7 ± 0.6	8.42 ± 0.45	3.6 ± 0.1	5.1 ± 0.2	3.3 ± 0.2
<i>Decanoato de etilo</i>	15.9 ± 0.7	62 ± 2	18 ± 1	28.5 ± 0.4	21.5 ± 0.6	59 ± 3
<i>Dodecanoato de etilo</i>	1.12 ± 0.04	3.8 ± 0.2	1.2 ± 0.1	2.4 ± 0.1	1.72 ± 0.04	3.18 ± 0.09
<i>3-hidroxidodecanoato de etilo</i>	0.24 ± 0.01	3.73 ± 0.05	1.94 ± 0.04	0.89 ± 0.03	1.90 ± 0.06	1.5 ± 0.1
<i>Hexadecanoato de etilo</i>	2.8 ± 0.2	13.6 ± 0.5	9.2 ± 0.7	11 ± 1	54 ± 4	74 ± 3
<i>Fenilhexanoato de etilo</i>	0.37 ± 0.02	1.36 ± 0.08	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.89 ± 0.06
<i>Fenilacetato de etilo</i>	33 ± 2	53 ± 4	35 ± 3	33.9 ± 0.7	37 ± 1	30 ± 2
<i>Isopentilsuccinato de etilo</i>	21 ± 1	25 ± 2	35 ± 1	29 ± 1	22 ± 2	20 ± 1
<i>Succinato de dietilo (mg/L)</i>	14.7 ± 0.8	50 ± 3	23 ± 1	12.0 ± 0.2	11.4 ± 0.5	41 ± 2

TABLA A12. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los ésteres etílicos detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a $25\text{ }^\circ\text{C}$ en presencia (+) de SO_2 .

$25\text{ }^\circ\text{C} + \text{SO}_2$						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Ésteres etílicos (mg/L)	17.7 \pm 0.6	103 \pm 6	29.9 \pm 0.9	16.5 \pm 0.4	14.9 \pm 0.8	39 \pm 2
<i>Propanoato de etilo</i>	47 \pm 1	38 \pm 2	67 \pm 3	54 \pm 4	36 \pm 2	60 \pm 3
<i>Butanoato de etilo</i>	227 \pm 6	274 \pm 15	326 \pm 17	287 \pm 19	315 \pm 18	338 \pm 17
<i>2-metilbutanoato de etilo</i>	2.9 \pm 0.1	2.12 \pm 0.09	3.7 \pm 0.2	3.6 \pm 0.3	2.02 \pm 0.06	3.26 \pm 0.09
<i>3-metilbutanoato de etilo</i>	9.3 \pm 0.7	3.39 \pm 0.1	8.6 \pm 0.5	8.6 \pm 0.3	5.3 \pm 0.2	5.4 \pm 0.4
<i>4-hidroxibutanoato de etilo</i>	5.0 \pm 0.3	0.58 \pm 0.07	7.6 \pm 0.4	1.28 \pm 0.08	0.64 \pm 0.06	11.9 \pm 0.8
<i>Hexanoato de etilo</i>	216 \pm 7	250 \pm 8	378 \pm 11	244 \pm 12	596 \pm 21	438 \pm 25
<i>Heptanoato de etilo</i>	0.31 \pm 0.02	0.22 \pm 0.01	0.38 \pm 0.02	0.35 \pm 0.02	0.34 \pm 0.01	0.40 \pm 0.01
<i>Octanoato de etilo</i>	113 \pm 3	161 \pm 11	137 \pm 2	112 \pm 3	262 \pm 7	367 \pm 13
<i>3-hidroxi octanoato de etilo</i>	4.6 \pm 0.3	7.3 \pm 0.2	8.7 \pm 0.4	3.1 \pm 0.2	4.8 \pm 0.2	3.1 \pm 0.1
<i>Decanoato de etilo</i>	23.3 \pm 0.7	68 \pm 1	29 \pm 1	18.2 \pm 0.5	54.3 \pm 0.5	50 \pm 2
<i>Dodecanoato de etilo</i>	2.4 \pm 0.1	5.8 \pm 0.2	1.6 \pm 0.1	2.86 \pm 0.07	2.79 \pm 0.07	5.0 \pm 0.3
<i>3-hidroxidodecanoato de etilo</i>	1.01 \pm 0.06	7.5 \pm 0.4	2.3 \pm 0.1	1.69 \pm 0.06	3.4 \pm 0.1	1.94 \pm 0.08
<i>Hexadecanoato de etilo</i>	3.6 \pm 0.2	22 \pm 1	8.2 \pm 0.3	17 \pm 3	82 \pm 2	108 \pm 5
<i>Fenilhexanoato de etilo</i>	0.42 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02	0.33 \pm 0.02	0.24 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02	0.35 \pm 0.02
<i>Fenilacetato de etilo</i>	68 \pm 4	61 \pm 5	84 \pm 5	77 \pm 5	67 \pm 4	49 \pm 3
<i>Isopentilsuccinato de etilo</i>	52 \pm 4	69 \pm 2	105 \pm 4	133 \pm 6	45 \pm 2	63 \pm 4
<i>Succinato de dietilo (mg/L)</i>	16.9 \pm 0.6	102 \pm 5	29 \pm 0.9	15.6 \pm 0.4	13.4 \pm 0.9	38 \pm 2

TABLA A13. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los ésteres etílicos detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en ausencia (-) de SO_2 .

<i>25 °C - SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Ésteres etílicos (mg/L)	19.5 ± 0.5	60 ± 3	30 ± 1	16.8 ± 0.5	13.5 ± 0.6	29 ± 2
<i>Propanoato de etilo</i>	65 ± 3	65 ± 3	53 ± 2	49 ± 2	35.8 ± 0.6	58.9 ± 0.7
<i>Butanoato de etilo</i>	311 ± 18	318 ± 14	330 ± 13	266 ± 1	325 ± 11	328 ± 9
<i>2-metilbutanoato de etilo</i>	3.3 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1	4.5 ± 0.2	1.83 ± 0.03	3.5 ± 0.1
<i>3-metilbutanoato de etilo</i>	7.7 ± 0.3	4.3 ± 0.1	6.8 ± 0.2	8.7 ± 0.3	4.8 ± 0.1	5.1 ± 0.3
<i>4-hidroxibutanoato de etilo</i>	2.77 ± 0.09	0.71 ± 0.07	4.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0.59 ± 0.04	14.1 ± 0.6
<i>Hexanoato de etilo</i>	216 ± 4	288 ± 15	426 ± 12	243 ± 5	607 ± 5	514 ± 6
<i>Heptanoato de etilo</i>	0.34 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.30 ± 0.01	0.45 ± 0.01
<i>Octanoato de etilo</i>	118 ± 2	152 ± 10	155 ± 6	108 ± 3	245 ± 5	429 ± 4
<i>3-hidroxiocetanoato de etilo</i>	3.8 ± 0.2	4.9 ± 0.3	5.5 ± 0.1	3.0 ± 0.2	5.0 ± 0.3	4.1 ± 0.1
<i>Decanoato de etilo</i>	21 ± 1	54 ± 2	18.5 ± 0.5	18.2 ± 0.7	50.3 ± 0.5	38.4 ± 0.2
<i>Dodecanoato de etilo</i>	1.44 ± 0.08	3.8 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.0 ± 0.1	3.8 ± 0.3	5.5 ± 0.4
<i>3-hidroxidodecanoato de etilo</i>	0.86 ± 0.04	2.9 ± 0.1	2.29 ± 0.09	1.44 ± 0.03	2.9 ± 0.2	2.90 ± 0.09
<i>Hexadecanoato de etilo</i>	4.1 ± 0.3	13.0 ± 0.5	9.9 ± 0.5	14.6 ± 0.7	75 ± 2	129 ± 5
<i>Fenilhexanoato de etilo</i>	0.33 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.41 ± 0.03
<i>Fenilacetato de etilo</i>	56 ± 1	67 ± 4	47.2 ± 0.6	80 ± 3	64.5 ± 0.7	51 ± 3
<i>Isopentilsuccinato de etilo</i>	27 ± 2	57 ± 3	79 ± 3	130 ± 3	43 ± 2	68 ± 2
<i>Succinato de dietilo (mg/L)</i>	19 ± 0.5	59 ± 3	28 ± 1	15.8 ± 0.5	12.0 ± 0.6	26.2 ± 0.6

TABLA A14. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los acetatos y lactonas detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a $18\text{ }^\circ\text{C}$ en presencia (+) de SO_2 .

<i>18 °C + SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Acetatos (mg/L)	17.4 ± 0.7	16 ± 0.3	39 ± 1	38 ± 2	34 ± 1	33 ± 1
<i>Acetato de isoamilo</i>	1080 ± 48	704 ± 5	2088 ± 52	3344 ± 135	1037 ± 53	2065 ± 77
<i>Acetato de etilo (mg/L)</i>	15.9 ± 0.7	14.7 ± 0.4	36 ± 1	34 ± 1	33 ± 1	30 ± 1
<i>Acetato de 2-feniletanol</i>	407 ± 9	473 ± 20	718 ± 18	629 ± 14	213 ± 7	494 ± 6
<i>Acetato de hexilo</i>	19.8 ± 0.5	34.05 ± 0.05	32.3 ± 0.8	86 ± 2	47 ± 1	82.3 ± 0.8
<i>Acetato de Z-3-hexenol</i>	0.62 ± 0.03	1.26 ± 0.03	1.35 ± 0.08	3.1 ± 0.2	1.8 ± 0.1	3.03 ± 0.08
Lactonas (mg/L)	40 ± 1	41 ± 2	46 ± 2	67 ± 2	44 ± 1	44 ± 1
<i>γ-crotonolactona (mg/L)</i>	30.1 ± 0.9	32 ± 1	33 ± 1	47 ± 2	31 ± 1	29 ± 1
<i>γ-butirolactona (mg/L)</i>	9.8 ± 0.2	9.0 ± 0.3	13.7 ± 0.6	19.3 ± 0.5	13.6 ± 0.4	14.3 ± 0.9
<i>γ-nonolactona</i>	8.74 ± 0.04	8.2 ± 0.3	8.2 ± 0.4	8.8 ± 0.4	8.3 ± 0.5	7.9 ± 0.3
<i>δ-undecalactona</i>	11.1 ± 0.5	10.7 ± 0.2	9.9 ± 0.2	9.9 ± 0.7	12.7 ± 0.5	9.2 ± 0.2
<i>γ-valerolactona</i>	22.1 ± 0.3	21 ± 1	36 ± 2	45 ± 4	30 ± 1	28 ± 2

TABLA A15. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los acetatos y lactonas detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ausencia (-) de SO_2 .

18 °C - SO₂

	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Acetatos (mg/L)	28.8 ± 0.5	14.9 ± 0.2	47 ± 2	38 ± 1	39 ± 2	33.7 ± 0.6
<i>Acetato de isoamilo</i>	1392 ± 76	484 ± 19	2129 ± 77	3385 ± 28	1116 ± 24	2162 ± 105
<i>Acetato de etilo (mg/L)</i>	27.0 ± 0.5	13.9 ± 0.2	44 ± 2	34 ± 1	37 ± 2	31.0 ± 0.7
<i>Acetato de 2-feniletanol</i>	369 ± 17	405 ± 18	318 ± 14	661 ± 4	212 ± 7	522 ± 24
<i>Acetato de hexilo</i>	26 ± 2	22 ± 1	65 ± 3	78.3 ± 0.4	49 ± 1	84 ± 4
<i>Acetato de Z-3-hexenol</i>	0.80 ± 0.05	0.52 ± 0.03	2.53 ± 0.03	2.7 ± 0.1	2.13 ± 0.05	3.1 ± 0.1
Lactonas (mg/L)	36 ± 1	34 ± 2	48 ± 2	55 ± 2	40 ± 2	42 ± 6
<i>γ-crotonolactona (mg/L)</i>	28 ± 1	27 ± 2	34 ± 1	40 ± 1	28 ± 1	29 ± 7
<i>γ-butirolactona (mg/L)</i>	8.2 ± 0.2	7.0 ± 0.3	13.9 ± 0.7	14.9 ± 0.8	11.6 ± 0.7	12.9 ± 0.4
<i>γ-nonolactona</i>	8.3 ± 0.4	7.7 ± 0.5	8.6 ± 0.4	8.8 ± 0.2	8.2 ± 0.3	7.7 ± 0.2
<i>δ-undecalactona</i>	11.5 ± 0.8	11.9 ± 0.9	12.0 ± 0.3	9.9 ± 0.4	15.9 ± 0.8	9.3 ± 0.5
<i>γ-valerolactona</i>	26 ± 1	18.5 ± 0.9	35 ± 3	44 ± 2	24 ± 1	28.0 ± 0.9

TABLA A16. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los acetatos y lactonas detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a $25\text{ }^\circ\text{C}$ en presencia (+) de SO_2 .

$25\text{ }^\circ\text{C} + \text{SO}_2$						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Acetatos (mg/L)	34 ± 1	17.0 ± 0.5	46 ± 2	43 ± 1	28 ± 1	35 ± 1
<i>Acetato de isoamilo</i>	1902 ± 85	591 ± 34	2457 ± 108	3378 ± 190	880 ± 46	2416 ± 116
<i>Acetato de etilo (mg/L)</i>	31 ± 2	15.9 ± 0.4	43 ± 2	39 ± 1	27 ± 1	31 ± 1
<i>Acetato de 2-feniletanol</i>	939 ± 47	521 ± 29	748 ± 49	1206 ± 77	245 ± 13	842 ± 35
<i>Acetato de hexilo</i>	26.3 ± 0.8	19.3 ± 0.6	54 ± 2	52 ± 2	34 ± 1	62 ± 4
<i>Acetato de Z-3-hexenol</i>	1.25 ± 0.08	0.56 ± 0.03	1.99 ± 0.09	2.1 ± 0.1	1.14 ± 0.06	2.4 ± 0.1
Lactonas (mg/L)	51 ± 2	45 ± 2	58 ± 4	64 ± 3	45 ± 1	45 ± 2
<i>γ-crotonolactona (mg/L)</i>	40 ± 2	36 ± 1	40 ± 2	46 ± 2	33 ± 1	32 ± 2
<i>γ-butirolactona (mg/L)</i>	11.00 ± 0.07	9.6 ± 0.3	18 ± 1	17.8 ± 0.9	12.4 ± 0.5	13.2 ± 0.6
<i>γ-nonalactona</i>	9.71 ± 0.05	8.2 ± 0.7	8.7 ± 0.4	11.1 ± 0.7	8.5 ± 0.3	8.1 ± 0.5
<i>δ-undecalactona</i>	12.6 ± 0.6	12.1 ± 0.8	11.4 ± 0.8	9.5 ± 0.4	17.2 ± 0.8	8.3 ± 0.3
<i>γ-valerolactona</i>	27 ± 2	24 ± 2	48 ± 3	56 ± 4	27 ± 2	36 ± 2

TABLA A17. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los acetatos y lactonas detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a $25\text{ }^\circ\text{C}$ en ausencia (-) de SO_2 .

$25\text{ }^\circ\text{C} - \text{SO}_2$						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Acetatos (mg/L)	35 ± 1	18.2 ± 0.3	43 ± 1	38 ± 2	31.8 ± 0.6	38 ± 1
<i>Acetato de isoamilo</i>	1939 ± 59	642 ± 30	1773 ± 38	3477 ± 51	862 ± 25	2328 ± 54
<i>Acetato de etilo (mg/L)</i>	32 ± 1	17.0 ± 0.4	40 ± 1	32 ± 2	30.6 ± 0.6	35 ± 1
<i>Acetato de 2-feniletanol</i>	810 ± 37	580 ± 23	553 ± 11	1212 ± 22	222 ± 3	796 ± 18
<i>Acetato de hexilo</i>	28.2 ± 0.4	17.3 ± 0.9	56 ± 2	52 ± 1	30.0 ± 0.1	77.4 ± 0.6
<i>Acetato de Z-3-hexenol</i>	1.3 ± 0.1	0.52 ± 0.02	2.4 ± 0.1	2.14 ± 0.08	0.85 ± 0.05	3.3 ± 0.1
Lactonas (mg/L)	40 ± 2	38 ± 2	48 ± 3	77 ± 3	40 ± 2	51 ± 3
<i>γ-crotonolactona (mg/L)</i>	30 ± 1	27 ± 1	33 ± 2	56 ± 2	29 ± 2	36 ± 2
<i>γ-butirolactona (mg/L)</i>	9.5 ± 0.5	10.9 ± 0.5	14.4 ± 0.7	21 ± 1	10.8 ± 0.3	14.7 ± 0.7
<i>γ-nonalactona</i>	8.5 ± 0.6	7.6 ± 0.7	8.49 ± 0.05	10.2 ± 0.7	8.41 ± 0.07	10.3 ± 0.5
<i>δ-undecalactona</i>	11.4 ± 0.7	13.2 ± 0.7	12.7 ± 0.7	9.7 ± 0.4	16.0 ± 0.4	9.2 ± 0.2
<i>γ-valerolactona</i>	28 ± 1	23 ± 2	38 ± 2	54 ± 4	25 ± 2	26 ± 1

TABLA A18. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de compuestos carbonílicos y sulfurados detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en presencia (+) de SO_2 .

	<i>18 °C + SO₂</i>					
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Compuestos carbonílicos (mg/L)	63 ± 4	87 ± 2	40 ± 2	85 ± 4	56.0 ± 0.9	58 ± 2
<i>Acetaldehído (mg/L)</i>	59 ± 4	75 ± 2	26 ± 2	74 ± 4	50 ± 1	51 ± 2
<i>Fenilacetaldehído</i>	9.34 ± 0.09	16.1 ± 0.3	17 ± 1	21 ± 2	15 ± 1	15.7 ± 0.5
<i>Acetoína (mg/L)</i>	2.7 ± 0.2	12.2 ± 0.5	13.1 ± 0.7	10.6 ± 0.6	6.1 ± 0.2	6.4 ± 0.3
<i>Heptanal</i>	1.27 ± 0.08	2.1 ± 0.2	1.15 ± 0.08	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1	1.26 ± 0.07
<i>Octanal</i>	4.1 ± 0.1	4.8 ± 0.2	2.5 ± 0.1	4.0 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.3
<i>Nonanal</i>	3.88 ± 0.09	2.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2	4.7 ± 0.3	11.3 ± 0.3	3.4 ± 0.2
<i>Decanal</i>	1.48 ± 0.05	4.4 ± 0.2	1.93 ± 0.09	3.0 ± 0.2	4.4 ± 0.3	1.5 ± 0.1
<i>Benzaldehído</i>	83 ± 3	83 ± 7	51 ± 3	84 ± 8	55 ± 3	38 ± 3
<i>4-metil-benzaldehído</i>	522 ± 22	65 ± 3	88 ± 1	57 ± 2	0 ± 0	0 ± 0
<i>6-metil-5-hepten-2-ona</i>	17.9 ± 0.3	8.9 ± 0.7	11.6 ± 0.8	11.5 ± 0.6	11.7 ± 0.4	9.0 ± 0.6
Compuestos sulfurados	3.12 ± 0.03	2.56 ± 0.08	6.2 ± 0.2	2.2 ± 0.1	1.56 ± 0.05	3.0 ± 0.2
<i>Benzotiazol</i>	3.12 ± 0.03	2.56 ± 0.08	6.2 ± 0.2	2.2 ± 0.1	1.56 ± 0.05	3.0 ± 0.2

TABLA A19. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de compuestos carbonílicos y sulfurados detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en ausencia (-) de SO_2 .

		<i>18 °C - SO₂</i>					
		B1	B5	B6	B8	B29	LC
Compuestos carbonílicos (mg/L)		27 ± 2	38.6 ± 0.5	33 ± 2	33 ± 2	39 ± 1	29 ± 1
	<i>Acetaldehído (mg/L)</i>	24 ± 2	30.8 ± 0.5	18.0 ± 0.9	25 ± 1	31 ± 2	22.6 ± 0.9
	<i>Fenilacetaldehído</i>	42 ± 2	18 ± 1	17.1 ± 0.8	15 ± 2	23 ± 2	13.9 ± 0.9
	<i>Acetoína (mg/L)</i>	1.8 ± 0.1	7.7 ± 0.2	15.3 ± 0.9	8.0 ± 0.4	7.5 ± 0.4	6.0 ± 0.6
	<i>Heptanal</i>	2.1 ± 0.1	1.07 ± 0.04	1.38 ± 0.07	1.5 ± 0.1	1.01 ± 0.05	1.4 ± 0.1
	<i>Octanal</i>	5.7 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.9 ± 0.3	2.6 ± 0.1	4.7 ± 0.2
	<i>Nonanal</i>	7.1 ± 0.4	1.54 ± 0.09	7.7 ± 0.3	3.2 ± 0.1	10.1 ± 0.6	6.7 ± 0.3
	<i>Decanal</i>	2.9 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.14 ± 0.07	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.68 ± 0.08
	<i>Benzaldehído</i>	99 ± 6	51 ± 3	81 ± 4	105 ± 6	44 ± 3	43 ± 2
	<i>4-metil-benzaldehído</i>	489 ± 26	34 ± 2	52 ± 2	73 ± 3	0 ± 0	0 ± 0
	<i>6-metil-5-hepten-2-ona</i>	18 ± 1	10.9 ± 0.6	12.4 ± 0.5	12.9 ± 0.2	13.5 ± 0.8	9.6 ± 0.4
Compuestos sulfurados		3.2 ± 0.2	2.06 ± 0.07	3.2 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.63 ± 0.07	2.55 ± 0.08
	<i>Benzotiazol</i>	3.2 ± 0.2	2.06 ± 0.07	3.2 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.63 ± 0.07	2.55 ± 0.08

TABLA A20. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de compuestos carbonílicos y sulfurados detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en presencia (+) de SO_2 .

	25 °C + SO_2					
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Compuestos carbonílicos (mg/L)	75 ± 3	121 ± 4	45.7 ± 0.8	163 ± 2	67 ± 3	53 ± 2
<i>Acetaldehído (mg/L)</i>	68 ± 3	84 ± 2	35.3 ± 0.9	143 ± 1	52 ± 2	48 ± 2
<i>Fenilacetaldehído</i>	30 ± 2	19 ± 1	24 ± 2	15 ± 1	21 ± 1	13 ± 1
<i>Acetoína (mg/L)</i>	7.0 ± 0.2	37 ± 2	10.1 ± 0.6	20 ± 1	14.2 ± 0.5	5 ± 1
<i>Heptanal</i>	3.1 ± 0.1	1.61 ± 0.07	2.8 ± 0.1	1.13 ± 0.08	1.64 ± 0.07	1.3 ± 0.1
<i>Octanal</i>	6.5 ± 0.3	3.6 ± 0.2	6.5 ± 0.4	3.1 ± 0.2	3.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2
<i>Nonanal</i>	8.8 ± 0.6	2.1 ± 0.2	9.6 ± 0.6	3 ± 1	10.1 ± 0.2	6.8 ± 0.3
<i>Decanal</i>	5.7 ± 0.5	3.2 ± 0.2	3.9 ± 0.3	1.79 ± 0.08	2.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1
<i>Benzaldehído</i>	115 ± 4	51 ± 3	75 ± 12	78 ± 3	64 ± 3	43 ± 3
<i>4-metil-benzaldehído</i>	199 ± 14	176 ± 9	177 ± 10	37 ± 7	0 ± 0	0 ± 0
<i>6-metil-5-hepten-2-ona</i>	26 ± 2	10.8 ± 0.3	13.2 ± 0.9	10.1 ± 0.7	12.1 ± 0.6	9.9 ± 0.5
Compuestos sulfurados	3.9 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4.6 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.6 ± 0.2
<i>Benzotiazol</i>	3.9 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4.6 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.6 ± 0.2

TABLA A21. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de compuestos carbonílicos y sulfurados detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en ausencia (-) de SO_2 .

	25 °C - SO_2					
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
Compuestos carbonílicos (mg/L)	48 ± 3	67 ± 2	42 ± 2	52 ± 1	36 ± 2	50 ± 1
<i>Acetaldehído (mg/L)</i>	42 ± 3	54 ± 2	24.1 ± 0.8	45 ± 1	24 ± 2	42 ± 1
<i>Fenilacetaldéhído</i>	21 ± 2	19 ± 2	17.9 ± 0.5	25 ± 2	13 ± 1	20 ± 1
<i>Acetoína (mg/L)</i>	5.8 ± 0.2	12.8 ± 0.7	17.5 ± 0.8	6.3 ± 0.4	13 ± 1	8.1 ± 0.1
<i>Heptanal</i>	1.33 ± 0.08	1.15 ± 0.05	1.95 ± 0.09	0.91 ± 0.04	1.44 ± 0.06	2.04 ± 0.06
<i>Octanal</i>	3.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.3	2.9 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.3 ± 0.2
<i>Nonanal</i>	1.46 ± 0.07	2.11 ± 0.09	7.6 ± 0.5	3.2 ± 0.2	9.7 ± 0.4	8.2 ± 0.4
<i>Decanal</i>	2.4 ± 0.2	2.05 ± 0.08	3.5 ± 0.2	1.8 ± 0.2	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1
<i>Benzaldehído</i>	85 ± 6	54 ± 4	83 ± 7	97 ± 4	42 ± 3	52 ± 2
<i>4-metil-benzaldehído</i>	43 ± 2	44 ± 2	50 ± 2	81 ± 4	0 ± 0	0 ± 0
<i>6-metil-5-hepten-2-ona</i>	10.0 ± 0.6	11.2 ± 0.5	11.2 ± 0.6	11.8 ± 0.1	11.4 ± 0.5	14 ± 1
Compuestos sulfurados	2.2 ± 0.1	3.9 ± 0.2	7.7 ± 0.2	3.3 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.28 ± 0.06
<i>Benzotiazol</i>	2.2 ± 0.1	3.9 ± 0.2	7.7 ± 0.2	3.3 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.28 ± 0.06

TABLA A22. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los nor-isoprenoides y terpenoides detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en presencia (+) de SO_2 .

<i>18 °C + SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>Nor-isoprenoides</i>	149 ± 5	244 ± 14	151 ± 10	273 ± 8	367 ± 5	389 ± 19
<i>β-damascenona</i>	144 ± 5	242 ± 14	148 ± 10	271 ± 8	345 ± 4	382 ± 18
<i>B-ionona</i>	1.51 ± 0.01	1.483 ± 0.006	1.507 ± 0.006	1.49 ± 0.03	1.59 ± 0.02	1.55 ± 0.01
<i>Vitispirano</i>	2.85 ± 0.08	0 ± 0	2.1 ± 0.4	0.68 ± 0.06	20 ± 2	5.7 ± 0.4
<i>Terpenoides</i>	124.2 ± 0.4	120 ± 1	110 ± 3	95 ± 2	124 ± 2	112 ± 1
<i>Linalool</i>	1.13 ± 0.05	0 ± 0	3.7 ± 0.1	0.58 ± 0.03	0 ± 0	0.49 ± 0.04
<i>Limoneno</i>	61.8 ± 0.3	53.4 ± 0.8	35 ± 1	28 ± 2	48 ± 2	33.1 ± 0.5
<i>β-farneseno</i>	10.45 ± 0.08	10.59 ± 0.02	10.64 ± 0.07	10.5 ± 0.1	11.0 ± 0.1	11.6 ± 0.2
<i>E-nerolidol</i>	10.87 ± 0.03	11.2 ± 0.3	14.0 ± 0.9	11.6 ± 0.3	12.3 ± 0.3	14.5 ± 0.4
<i>Z-dihidrofarnesol</i>	10.82 ± 0.05	11.1 ± 0.1	12.5 ± 0.2	12.3 ± 0.1	12.10 ± 0.09	13.4 ± 0.2
<i>Farnesol 3</i>	10.66 ± 0.05	14.3 ± 0.3	15.4 ± 0.6	13.8 ± 0.5	20.6 ± 0.5	19.8 ± 0.8
<i>Geranil acetona</i>	13.5 ± 0.2	14.5 ± 0.4	14.1 ± 0.6	13.3 ± 0.9	14.4 ± 0.6	13.9 ± 0.5
<i>E-metil dihidrojasmonato</i>	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4.8 ± 0.3	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.3	5.0 ± 0.2

TABLA A23. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los nor-isoprenoides y terpenoides detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C en ausencia (-) de SO_2 .

	<i>18 °C - SO₂</i>					
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>Nor-isoprenoides</i>	152 ± 8	229 ± 8	276 ± 13	298 ± 11	517 ± 16	375 ± 14
<i>β-damascenona</i>	146 ± 8	228 ± 8	256 ± 14	294 ± 11	491 ± 15	351 ± 9
<i>B-ionona</i>	1.513 ± 0.006	1.503 ± 0.006	1.51 ± 0.01	1.493 ± 0.006	1.65 ± 0.03	1.56 ± 0.02
<i>Vitispirano</i>	3.7 ± 0.2	0 ± 0	18.7 ± 0.8	2.8 ± 0.1	23 ± 1	22 ± 4
<i>Terpenoides</i>	131 ± 3	115 ± 3	104 ± 1	98.2 ± 0.5	126 ± 1	114 ± 3
<i>Linalool</i>	1.47 ± 0.04	0 ± 0	0.99 ± 0.07	1.11 ± 0.04	0 ± 0	0.19 ± 0.02
<i>Limoneno</i>	68 ± 3	51 ± 2	37 ± 2	29 ± 1	51 ± 2	37.4 ± 0.5
<i>β-farneseno</i>	10.40 ± 0.03	10.62 ± 0.05	10.5 ± 0.2	10.54 ± 0.07	11.14 ± 0.07	11.2 ± 0.2
<i>E-nerolidol</i>	10.9 ± 0.1	10.8 ± 0.1	11.9 ± 0.6	11.8 ± 0.1	11.96 ± 0.08	12.9 ± 0.6
<i>Z-dihidrofarnesol</i>	10.9 ± 0.2	11.2 ± 0.1	11.37 ± 0.07	12.9 ± 0.2	11.8 ± 0.2	11.8 ± 0.3
<i>Farnesol 3</i>	10.9 ± 0.2	13.1 ± 0.3	13.2 ± 0.2	14.467 ± 0.006	20.7 ± 0.8	21.5 ± 0.8
<i>Geranil acetona</i>	13.5 ± 0.5	13.7 ± 0.4	13.7 ± 0.7	13.6 ± 0.7	13.9 ± 0.5	13.8 ± 0.9
<i>E-metil dihidrojasmonato</i>	5.3 ± 0.3	4.9 ± 0.3	5.3 ± 0.3	4.9 ± 0.1	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.2

TABLA A24. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los nor-isoprenoides y terpenoides detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en presencia (+) de SO_2 .

<i>25 °C + SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>Nor-isoprenoides</i>	162 ± 7	257 ± 11	209 ± 4	303 ± 13	356 ± 12	332 ± 17
<i>β-damascenona</i>	156 ± 7	254 ± 11	188 ± 5	297 ± 13	329 ± 11	303 ± 17
<i>B-ionona</i>	1.52 ± 0.01	1 ± 0	1.5 ± 0.01	1.50 ± 0.02	1.617 ± 0.006	1.557 ± 0.006
<i>Vitispirano</i>	4.6 ± 0.2	2.0 ± 0.1	20 ± 1	4.7 ± 0.2	26.0 ± 0.8	27 ± 2
<i>Terpenoides</i>	137 ± 4	117 ± 2	108 ± 2	113 ± 4	118 ± 2	114 ± 1
<i>Linalool</i>	3.0 ± 0.2	0 ± 0	3.9 ± 0.3	3.4 ± 0.3	0 ± 0	1.47 ± 0.08
<i>Limoneno</i>	65 ± 4	48 ± 1	35 ± 2	30 ± 2	49 ± 2	37 ± 1
<i>β-farneseno</i>	10.63 ± 0.05	10.68 ± 0.08	10.7 ± 0.2	11.1 ± 0.1	10.9 ± 0.2	11 ± 0.1
<i>E-nerolidol</i>	12.1 ± 0.1	11.8 ± 0.8	13.4 ± 0.2	14.7 ± 0.3	12.20 ± 0.08	15.1 ± 0.3
<i>Z-dihidrofarnesol</i>	11.5 ± 0.3	10.9 ± 0.4	12.0 ± 0.5	13.5 ± 0.2	10.7 ± 0.2	12.5 ± 0.3
<i>Farnesol 3</i>	14.3 ± 0.3	14.4 ± 0.4	14.1 ± 0.7	20.9 ± 0.9	16.4 ± 0.5	19.32 ± 0.08
<i>Geranil acetona</i>	14.7 ± 0.5	15.4 ± 0.9	13.9 ± 0.7	14 ± 1	14.0 ± 0.3	13.7 ± 0.2
<i>E-metil dihidrojasmonato</i>	5.7 ± 0.2	5.2 ± 0.4	5.4 ± 0.5	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.3	4.73 ± 0.04

TABLA A25. Niveles promedio ($\mu\text{g/L}$) de los nor-isoprenoides y terpenoides detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C en ausencia (-) de SO_2 .

<i>25 °C - SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>Nor-isoprenoides</i>	151 ± 6	185 ± 10	253 ± 9	244 ± 7	476 ± 22	393 ± 21
<i>β-damascenona</i>	147 ± 6	181 ± 10	233 ± 8	237 ± 7	449 ± 21	364 ± 21
<i>B-ionona</i>	1.50 ± 0.01	1.503 ± 0.006	1.503 ± 0.006	1.49 ± 0.01	1.607 ± 0.006	1.52 ± 0.02
<i>Vitispirano</i>	1.66 ± 0.05	2.1 ± 0.1	18 ± 2	5.8 ± 0.3	24.8 ± 0.7	27 ± 2
<i>Terpenoides</i>	135 ± 4	116 ± 3	101 ± 2	108 ± 2	116 ± 2	120.8 ± 0.5
<i>Linalool</i>	2.6 ± 0.1	0 ± 0	2.40 ± 0.07	3.6 ± 0.2	0 ± 0	0.98 ± 0.07
<i>Limoneno</i>	65 ± 2	50 ± 4	33 ± 2	30 ± 2	46 ± 2	35 ± 1
<i>β-farneseno</i>	10.86 ± 0.07	10.9 ± 0.3	10.5 ± 0.1	11.0 ± 0.2	10.85 ± 0.09	10.9 ± 0.1
<i>E-nerolidol</i>	12.1 ± 0.2	11.3 ± 0.1	12.2 ± 0.8	13.21 ± 0.09	12.2 ± 0.1	15.8 ± 0.6
<i>Z-dihidrofarnesol</i>	11.7 ± 0.1	10.6 ± 0.3	11.4 ± 0.2	12.5 ± 0.2	11.0 ± 0.3	13.7 ± 0.2
<i>Farnesol 3</i>	15 ± 1	13.8 ± 0.3	13.3 ± 0.3	18.1 ± 0.3	17.1 ± 0.2	25.2 ± 0.8
<i>Geranil acetona</i>	13.2 ± 0.6	13.6 ± 0.4	13.6 ± 0.7	14.9 ± 0.5	14.30 ± 0.08	14.4 ± 0.3
<i>E-metil dihidrojasmonato</i>	4.4 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.1	5.4 ± 0.2	5.1 ± 0.2	4.6 ± 0.2

TABLA A26. Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de las concentraciones de los ácidos grasos, alcoholes y ésteres etílicos volátiles detectados en los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura empleada (L), la temperatura de fermentación (T) y la presencia o ausencia de SO₂ en los mostos (S).

	MANOVA		
	L	T	S
Ácidos grasos	***	**	ns
<i>Ácido octanoico</i>	***	*	ns
<i>Ácido decanoico</i>	***	**	ns
Alcoholes	***	***	**
<i>Alcoholes isoamílicos</i>	***	***	***
<i>2-feniletanol</i>	***	***	***
<i>Metanol</i>	***	**	ns
<i>Propanol</i>	***	ns	***
<i>2,3-butanodiol (levo)</i>	***	***	ns
<i>2,3-butanodiol (meso)</i>	***	***	ns
<i>Isobutanol</i>	***	***	*
<i>Hexanol</i>	***	ns	ns
<i>2-etil-1-hexanol</i>	**	ns	ns
<i>1-octanol</i>	**	**	ns
<i>1-decanol</i>	***	*	ns
<i>Dodecanol</i>	***	***	*
<i>Guaiacol</i>	***	ns	ns
<i>4-vinilfenol</i>	***	ns	ns
<i>2-metoxi-4-vinilfenol</i>	***	***	*

	MANOVA		
	L	T	S
Ésteres etílicos	***	ns	**
<i>Propanoato de etilo</i>	***	**	ns
<i>Butanoato de etilo</i>	***	***	*
<i>2-metilbutanoato de etilo</i>	***	***	ns
<i>3-metilbutanoato de etilo</i>	***	***	ns
<i>4-hidroxibutanoato de etilo</i>	***	***	ns
<i>Hexanoato de etilo</i>	***	***	ns
<i>Heptanoato de etilo</i>	***	*	ns
<i>Octanoato de etilo</i>	***	***	ns
<i>3-hidroxiocetanoato de etilo</i>	***	**	ns
<i>Decanoato de etilo</i>	***	*	***
<i>Dodecanoato de etilo</i>	***	***	ns
<i>3-hidroxidodecanoato de etilo</i>	***	***	**
<i>Hexadecanoato de etilo</i>	***	***	ns
<i>Fenilhexanoato de etilo</i>	***	***	ns
<i>Fenilacetato de etilo</i>	***	***	**
<i>Isopentilsuccinato de etilo</i>	***	***	ns
<i>Succinato de dietilo</i>	***	ns	**

***: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99.9%; **: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99%; *: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 95%; "ns": ausencia de diferencias significativas en las variables dependientes.

TABLA A27. Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de las concentraciones de los acetatos, lactonas, compuestos carbonílicos, compuestos sulfurados, nor-isoprenoides y terpenoides volátiles detectados en los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura empleada (L), la temperatura de fermentación (T) y la presencia o ausencia de SO₂ en los mostos (S).

	MANOVA		
	L	T	S
Acetatos	***	**	*
<i>Acetato de isoamilo</i>	***	**	ns
<i>Acetato de etilo</i>	***	*	*
<i>Acetato de 2-feniletanol</i>	***	***	*
<i>Acetato de hexilo</i>	***	***	ns
<i>Acetato de Z-3-hexenol</i>	***	*	ns
Lactonas	***	***	**
<i>γ-crotonolactona</i>	***	***	**
<i>γ-butirolactona</i>	***	***	**
<i>γ-nonolactona</i>	***	***	ns
<i>δ-undecalactona</i>	***	**	**
<i>γ-valerolactona</i>	***	***	***

	MANOVA		
	L	T	S
Compuestos carbonílicos	***	***	***
<i>Acetaldehído</i>	***	***	***
<i>Fenilacetaldehído</i>	***	***	***
<i>Acetoína</i>	***	***	*
<i>Heptanal</i>	ns	ns	**
<i>Octanal</i>	*	ns	ns
<i>Nonanal</i>	***	ns	ns
<i>Decanal</i>	**	*	**
<i>Benzaldehído</i>	***	ns	ns
<i>4-metil-benzaldehído</i>	***	*	ns
<i>6-metil-5-hepten-2-ona</i>	***	ns	ns
Compuestos sulfurados	***	***	ns
<i>Benzotiazol</i>	***	***	ns

	MANOVA		
	L	T	S
Nor-isoprenoides	***	ns	**
<i>β-damascenona</i>	***	ns	**
<i>B-ionona</i>	***	ns	ns
<i>Vitispirano</i>	***	***	**
Terpenoides	***	*	ns
<i>Linalool</i>	***	***	*
<i>Limoneno</i>	***	ns	ns
<i>β-farneseno</i>	***	ns	ns
<i>E-nerolidol</i>	***	***	**
<i>Z-dihidrofarnesol</i>	***	ns	ns
<i>Farnesol 3</i>	***	*	ns
<i>Geranil acetona</i>	ns	*	ns
<i>E-metil dihidrojasmonato</i>	ns	ns	ns

***: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99.9%; **: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99%; *: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 95%; “ns”: ausencia de diferencias significativas en las variables dependientes.

TABLA A28. VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en presencia (+) de SO₂.

<i>18 °C + SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>Frutal</i>	83 ± 3	175 ± 1	141 ± 3	202 ± 3	176 ± 6	252 ± 5
<i>Fruta verde</i>	14.0 ± 0.3	45.9 ± 0.7	21.3 ± 0.4	32.2 ± 0.6	58 ± 2	55.7 ± 0.9
<i>Verde</i>	4.30 ± 0.05	6.3 ± 0.1	5.8 ± 0.3	7.7 ± 0.5	5.8 ± 0.3	5.7 ± 0.1
<i>Cre moso</i>	2.94 ± 0.07	3.38 ± 0.06	3.35 ± 0.08	3.6 ± 0.1	3.09 ± 0.06	2.8 ± 0.3
<i>Cítrico</i>	11.1 ± 0.1	12.1 ± 0.3	8.4 ± 0.2	9.2 ± 0.3	15.0 ± 0.2	8.1 ± 0.3
<i>Químico</i>	16.0 ± 0.2	15.9 ± 0.1	18.2 ± 0.2	19.1 ± 0.3	19.2 ± 0.1	16.7 ± 0.2
<i>Meloso</i>	4.11 ± 0.02	6.1 ± 0.1	7.4 ± 0.3	8.0 ± 0.4	4.6 ± 0.2	6.0 ± 0.1
<i>Ceroso</i>	16.1 ± 0.5	73.2 ± 0.7	27 ± 1	37.9 ± 0.8	60 ± 2	103 ± 1
<i>Graso</i>	1.51 ± 0.03	8.1 ± 0.5	4.6 ± 0.2	8.2 ± 0.3	9.7 ± 0.4	3.0 ± 0.1
<i>Especiado</i>	3.70 ± 0.04	2.33 ± 0.09	3.9 ± 0.2	4.7 ± 0.4	3.0 ± 0.1	2.8 ± 0.2
<i>Herbáceo</i>	44.9 ± 0.6	58 ± 2	47 ± 1	65 ± 1	76 ± 1	80 ± 3
<i>Floral</i>	49.9 ± 0.5	66 ± 2	56 ± 1	70 ± 1	79 ± 1	86 ± 3
<i>Ahumado</i>	2.9 ± 0.2	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.97 ± 0.05	5.5 ± 0.2	8.0 ± 0.4

TABLA A29. VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en ausencia (-) de SO₂.

<i>18 °C - SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>Frutal</i>	102 ± 4	131 ± 3	182 ± 4	199 ± 2	181 ± 6	239 ± 9
<i>Fruta verde</i>	17.9 ± 0.7	27.0 ± 0.6	39 ± 1	29.4 ± 0.4	63 ± 2	51 ± 2
<i>Verde</i>	12.3 ± 0.5	6.1 ± 0.3	5.8 ± 0.2	5.5 ± 0.4	7.4 ± 0.6	5.0 ± 0.2
<i>Cre moso</i>	2.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.50 ± 0.05	3.2 ± 0.1	3.30 ± 0.03	2.9 ± 0.2
<i>Cítrico</i>	14.9 ± 0.6	9.0 ± 0.4	10.5 ± 0.4	7.5 ± 0.4	11.8 ± 0.4	9.9 ± 0.3
<i>Químico</i>	17.3 ± 0.3	13.8 ± 0.2	17.2 ± 0.3	16.1 ± 0.4	20.3 ± 0.5	16.99 ± 0.05
<i>Meloso</i>	12.0 ± 0.4	6.4 ± 0.4	5.7 ± 0.2	6.6 ± 0.4	6.8 ± 0.6	5.7 ± 0.1
<i>Ceroso</i>	21.9 ± 0.8	48 ± 2	42.6 ± 0.7	37.3 ± 0.3	51 ± 2	90 ± 2
<i>Graso</i>	1.89 ± 0.09	5.9 ± 0.3	11.6 ± 0.5	8.6 ± 0.2	3.2 ± 0.1	4.0 ± 0.2
<i>Especiado</i>	3.96 ± 0.05	1.9 ± 0.1	3.7 ± 0.3	4.6 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.80 ± 0.09
<i>Herbáceo</i>	46 ± 1	56 ± 1	62 ± 2	68 ± 2	97 ± 2	76 ± 2
<i>Floral</i>	49.6 ± 1.1	65 ± 1	64 ± 2	73 ± 2	100 ± 2	82 ± 2
<i>Ahumado</i>	2.13 ± 0.06	2.16 ± 0.08	2.62 ± 0.05	1.66 ± 0.08	4.6 ± 0.3	6.4 ± 0.3

TABLA A30. VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 25 °C en presencia (+) de SO₂.

	<i>25 °C + SO₂</i>					
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>Frutal</i>	123.4 ± 4.1	92 ± 2	165 ± 6	177 ± 5	148 ± 5	212 ± 9
<i>Fruta verde</i>	18.8 ± 0.7	19.3 ± 0.7	30 ± 1	20.8 ± 0.9	45 ± 2	34 ± 2
<i>Verde</i>	10.3 ± 0.5	7.0 ± 0.3	8.3 ± 0.4	6.3 ± 0.3	7.1 ± 0.4	5.1 ± 0.2
<i>Creoso</i>	3.54 ± 0.02	4.36 ± 0.07	3.9 ± 0.2	3.71 ± 0.04	3.64 ± 0.09	2.97 ± 0.08
<i>Cítrico</i>	18.2 ± 0.9	9.9 ± 0.2	14 ± 1	7.7 ± 0.7	12.9 ± 0.1	8.7 ± 0.4
<i>Químico</i>	20.6 ± 0.3	17.5 ± 0.1	20.7 ± 0.3	35.3 ± 0.3	20.2 ± 0.2	19.29 ± 0.05
<i>Meloso</i>	11.5 ± 0.8	7.2 ± 0.4	9.4 ± 0.6	8.8 ± 0.5	6.4 ± 0.4	6.9 ± 0.4
<i>Ceroso</i>	27.6 ± 0.9	35.4 ± 2.3	31.1 ± 0.4	24.4 ± 0.7	55 ± 1	75 ± 3
<i>Graso</i>	3.94 ± 0.09	3.7 ± 0.2	5.6 ± 0.3	5.5 ± 0.3	4.0 ± 0.1	3.6 ± 0.1
<i>Especiado</i>	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.8 ± 0.4	2.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2
<i>Herbáceo</i>	47 ± 1	60 ± 1	53.6 ± 0.9	70 ± 2	73 ± 2	70 ± 2
<i>Floral</i>	57 ± 1	69 ± 2	62.5 ± 0.9	81 ± 2	78 ± 2	79.5 ± 3
<i>Ahumado</i>	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.01 ± 0.09	1.7 ± 0.2	2.8 ± 0.2	5.1 ± 0.3

TABLA A31. VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de las muestras de vinificaciones obtenidas con las cepas de levadura de estudio a 18 °C en presencia (+) de SO₂.

		<i>25 °C - SO₂</i>					
		B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>Frutal</i>		131 ± 3	99 ± 2	147 ± 4	178 ± 2	145 ± 2	226 ± 2
<i>Fruta verde</i>		18.4 ± 0.3	22 ± 1	33.1 ± 0.8	20.8 ± 0.4	45.2 ± 0.4	38.9 ± 0.5
<i>Verde</i>		6.9 ± 0.5	6.5 ± 0.4	6.2 ± 0.1	7.8 ± 0.4	4.8 ± 0.3	7.0 ± 0.3
<i>Cremoso</i>		3.1 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.73 ± 0.06	4.0 ± 0.1	3.39 ± 0.07	3.30 ± 0.08
<i>Cítrico</i>		10.9 ± 0.4	9.4 ± 0.4	11.5 ± 0.6	7.5 ± 0.1	12.7 ± 0.3	10.9 ± 0.3
<i>Químico</i>		21.3 ± 0.3	14.8 ± 0.3	16.6 ± 0.2	19.2 ± 0.8	19.3 ± 0.3	19.4 ± 0.3
<i>Meloso</i>		8.6 ± 0.4	7.3 ± 0.4	6.89 ± 0.08	11.4 ± 0.5	4.3 ± 0.3	8.4 ± 0.3
<i>Ceroso</i>		26.0 ± 0.6	32 ± 2	34 ± 1	23.7 ± 0.7	52 ± 1	88.9 ± 0.9
<i>Graso</i>		3.8 ± 0.3	3.3 ± 0.2	6.7 ± 0.3	6.0 ± 0.2	6.9 ± 0.2	3.6 ± 0.2
<i>Especiado</i>		2.9 ± 0.1	2.4 ± 0.2	3.9 ± 0.2	5.6 ± 0.4	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.1
<i>Herbáceo</i>		46 ± 1	50 ± 2	59 ± 1	61 ± 1	90 ± 3	77 ± 3
<i>Floral</i>		55.2 ± 0.9	59 ± 2	64 ± 1	72 ± 1	95 ± 3	87 ± 3
<i>Ahumado</i>		1.7 ± 0.1	1.50 ± 0.08	1.6 ± 0.1	1.96 ± 0.09	2.2 ± 0.1	4.7 ± 0.2

TABLA A32. Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de los VAOs de las series aromáticas contribuyentes al aroma de los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura empleada, la temperatura de fermentación y la presencia o ausencia de SO₂ en los mostos.

	MANOVA		
	Levadura	Temperatura	SO ₂
<i>Frutal</i>	***	***	ns
<i>Fruta verde</i>	***	***	ns
<i>Verde</i>	***	ns	ns
<i>Cremoso</i>	***	***	ns
<i>Cítrico</i>	***	ns	ns
<i>Químico</i>	***	***	**
<i>Meloso</i>	***	**	ns
<i>Ceroso</i>	***	***	ns
<i>Graso</i>	***	*	ns
<i>Especiado</i>	***	**	***
<i>Herbáceo</i>	***	ns	**
<i>Floral</i>	***	ns	*
<i>Ahumado</i>	***	***	**

***: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99.9%; **: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99%; *: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 95%; “ns”: ausencia de diferencias significativas en las variables dependientes.

TABLA A33. Contribución de las series aromáticas a las componentes seleccionadas para los Análisis de Componentes Principales (PCA) de los vinos fermentados a 18 y 25 °C.

	<i>18 °C</i>			<i>25 °C</i>		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
<i>Frutal</i>	0,353483	-0,0981545	0,146999	0,273038	-0,30343	0,39589
<i>Fruta verde</i>	0,404281	0,107204	0,138159	0,360522	0,0828373	-0,123863
<i>Verde</i>	-0,175357	0,496815	0,230971	-0,302768	0,049286	0,322649
<i>Creinoso</i>	-0,0366765	-0,355069	0,485126	-0,229994	-0,0982852	-0,322755
<i>Cítrico</i>	-0,0538719	0,424447	0,0808759	-0,0949654	0,285284	0,101737
<i>Químico</i>	0,112032	0,257991	0,480978	-0,0078168	-0,462791	0,104771
<i>Meloso</i>	-0,20937	0,40109	0,211556	-0,283873	-0,196348	0,438559
<i>Ceroso</i>	0,371255	0,0167899	-0,166533	0,381321	0,168371	0,230458
<i>Graso</i>	0,049959	-0,371006	0,39348	0,0216533	-0,37377	-0,367138
<i>Especiado</i>	-0,222627	-0,0826333	0,318416	-0,137074	-0,562493	0,103879
<i>Herbáceo</i>	0,386534	0,0991829	0,187904	0,378421	-0,158701	-0,179388
<i>Floral</i>	0,39447	0,0758289	0,154023	0,372817	-0,206686	-0,106456
<i>Ahumado</i>	0,354002	0,195047	-0,212114	0,338211	0,0500751	0,404708

TABLA A34. Contribución de las series aromáticas a las componentes seleccionadas para los Análisis de Componentes Principales (PCA) de los vinos fermentados en presencia (75 mg/L) y ausencia (0 mg/L) de SO₂.

	<i>75 mg/L SO₂</i>			<i>0 mg/L SO₂</i>		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
<i>Frutal</i>	0,322255	0,29195	-0,0208059	0,321001	0,0726703	0,373931
<i>Fruta verde</i>	0,370143	0,0677795	0,289706	0,395032	-0,0591675	0,004394
<i>Verde</i>	-0,215853	0,285282	0,463156	-0,254104	-0,421155	0,175134
<i>Creinoso</i>	-0,256223	0,261707	0,115972	-0,0822188	0,362299	0,198694
<i>Cítrico</i>	-0,128299	-0,0513003	0,579759	-0,0138063	-0,450221	-0,18617
<i>Químico</i>	-0,0910542	0,470608	-0,289052	0,0985458	-0,269891	0,410026
<i>Meloso</i>	-0,244569	0,373029	0,17239	-0,286113	-0,287709	0,391747
<i>Ceroso</i>	0,389898	-0,0003957	0,154061	0,366398	-0,0851456	-0,0711965
<i>Graso</i>	0,0776042	0,255204	0,291546	0,0372915	0,486911	0,0841117
<i>Especiado</i>	-0,182286	0,359498	-0,355375	-0,186877	0,153417	0,606213
<i>Herbáceo</i>	0,350608	0,283109	-0,0145247	0,382458	-0,02409	0,137943
<i>Floral</i>	0,323941	0,342482	-0,0530314	0,380689	-0,0210927	0,169628
<i>Ahumado</i>	0,378421	-0,0722991	-0,0153719	0,340672	-0,235321	0,0794976

TABLA A35. Niveles promedio (mg/L) de los compuestos mayoritarios detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C con SO₂ en los mostos.

	<i>18 °C + SO₂</i>					
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>2-feniletanol</i>	43.1 ± 0.6	66.9 ± 0.8	79 ± 1	51.4 ± 0.5	35.5 ± 0.7	46.4 ± 0.4
<i>Alcoholes isoamílicos</i>	166 ± 1	138 ± 2	234 ± 2	217 ± 0.7	219 ± 0.9	203.4 ± 0.4
<i>Isobutanol</i>	12.1 ± 0.2	11.17 ± 0.02	31.01 ± 0.06	17.0 ± 0.1	21.27 ± 0.03	16.5 ± 0.1
<i>Metanol</i>	45 ± 3	52.7 ± 0.9	63 ± 1	57 ± 1	46.9 ± 0.9	45 ± 1
<i>Propanol</i>	14.4 ± 0.4	18.8 ± 0.3	25 ± 1	15.0 ± 0.9	14.2 ± 0.5	17.2 ± 0.2
<i>2,3-butanodiol (levo)</i>	289 ± 1	483 ± 6	435 ± 6	245.8 ± 0.6	222 ± 5	264 ± 6
<i>2,3-butanodiol (meso)</i>	89.2 ± 0.6	157.9 ± 0.7	130 ± 4	85 ± 2	78 ± 1	82.4 ± 0.6
<i>Glicerina</i>	5052 ± 128	6402 ± 173	7611 ± 245	5091 ± 194	4967 ± 156	5277 ± 196
<i>Acetato de etilo</i>	15.9 ± 0.7	14.7 ± 0.4	36 ± 1	34 ± 1	33 ± 1	30 ± 1
<i>Succinato de dietilo</i>	16.6 ± 0.5	86 ± 4	27 ± 2	12.6 ± 0.4	11.2 ± 0.3	26 ± 2
<i>Acetaldehído</i>	59 ± 4	75 ± 2	26 ± 2	74 ± 4	50 ± 1	51 ± 2
<i>Acetoína</i>	2.7 ± 0.2	12.2 ± 0.5	13.1 ± 0.7	10.6 ± 0.6	6.1 ± 0.2	6.4 ± 0.3

TABLA A36. Niveles promedio (mg/L) de los compuestos mayoritarios detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 18 °C sin SO₂ en los mostos.

	<i>18 °C - SO₂</i>					
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>2-feniletanol</i>	37.9 ± 0.3	72 ± 1	30.9 ± 0.3	49.8 ± 0.3	30.9 ± 0.7	48.8 ± 0.6
<i>Alcoholes isoamílicos</i>	154 ± 6	133.6 ± 0.4	167.1 ± 0.2	199.3 ± 0.2	206 ± 2	209 ± 0.9
<i>Isobutanol</i>	11.1 ± 0.3	10 ± 0.7	15.8 ± 0.2	14.86 ± 0.09	19.5 ± 0.2	16.5 ± 0.1
<i>Metanol</i>	44 ± 2	49.5 ± 0.8	61 ± 4	52.1 ± 0.6	47 ± 2	53 ± 2
<i>Propanol</i>	16.0 ± 0.3	22 ± 1	26 ± 1	16.3 ± 0.5	19 ± 1	20.1 ± 0.6
<i>2,3-butanodiol (levo)</i>	273 ± 3	472 ± 4	372 ± 7	233 ± 5	254 ± 8	303 ± 12
<i>2,3-butanodiol (meso)</i>	83 ± 2	153 ± 2	113 ± 2	79 ± 1	88 ± 1	90 ± 2
<i>Glicerina</i>	5317 ± 175	5593 ± 100	6855 ± 150	4373 ± 167	4738 ± 213	5835 ± 221
<i>Acetato de etilo</i>	27.0 ± 0.5	13.9 ± 0.2	44 ± 2	34 ± 1	37 ± 2	31.0 ± 0.7
<i>Succinato de dietilo</i>	14.7 ± 0.8	50 ± 3	23 ± 1	12.0 ± 0.2	11.4 ± 0.5	41 ± 2
<i>Acetaldehído</i>	24 ± 2	30.8 ± 0.5	18.0 ± 0.9	25 ± 1	31 ± 2	22.6 ± 0.9
<i>Acetoína</i>	1.8 ± 0.1	7.7 ± 0.2	15.3 ± 0.9	8.0 ± 0.4	7.5 ± 0.4	6.0 ± 0.6

TABLA A37. Niveles promedio (mg/L) de los compuestos mayoritarios detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C con de SO₂ en los mostos.

<i>25 °C + SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>2-feniletanol</i>	68.0 ± 0.3	80.2 ± 0.4	86 ± 0.3	93 ± 3	50.5 ± 0.7	80.9 ± 0.6
<i>Alcoholes isoamílicos</i>	222.4 ± 0.9	164.5 ± 0.8	271 ± 1	295 ± 2	260 ± 1	263 ± 1
<i>Isobutanol</i>	24.16 ± 0.09	12.2 ± 0.3	29.5 ± 0.2	29.2 ± 0.8	38.4 ± 0.5	24.17 ± 0.02
<i>Metanol</i>	47 ± 2	57 ± 4	63 ± 3	56 ± 4	54 ± 3	53 ± 2
<i>Propanol</i>	12.7 ± 0.2	19.6 ± 0.5	26.7 ± 0.9	17.7 ± 0.4	13.3 ± 0.7	18.5 ± 0.9
<i>2,3-butanodiol (levo)</i>	337 ± 4	765 ± 11	456 ± 11	292 ± 5	264 ± 8	355 ± 13
<i>2,3-butanodiol (meso)</i>	105 ± 1	260 ± 3	137.1 ± 3	100 ± 2	95 ± 2	107 ± 2
<i>Glicerina</i>	6828 ± 292	6726 ± 176	9132 ± 390	4903 ± 131	7008 ± 318	6355 ± 182
<i>Acetato de etilo</i>	31 ± 2	15.9 ± 0.4	43 ± 2	39 ± 1	27 ± 1	31 ± 1
<i>Succinato de dietilo</i>	16.9 ± 0.6	102 ± 5	29 ± 0.9	15.6 ± 0.4	13.4 ± 0.9	38 ± 2
<i>Acetaldehído</i>	68 ± 3	84 ± 2	35.3 ± 0.9	143 ± 1	52 ± 2	48 ± 2
<i>Acetoína</i>	7.0 ± 0.2	37 ± 2	10.1 ± 0.6	20 ± 1	14.2 ± 0.5	5 ± 1

TABLA A38. Niveles promedio (mg/L) de los compuestos mayoritarios detectados en las muestras de vinificaciones obtenidas por las levaduras de estudio a 25 °C sin SO₂ en los mostos.

<i>25 °C - SO₂</i>						
	B1	B5	B6	B8	B29	LC
<i>2-feniletanol</i>	71.4 ± 0.6	71.1 ± 0.6	51 ± 2	94 ± 2	47 ± 0.7	73.8 ± 0.1
<i>Alcoholes isoamílicos</i>	237 ± 3	151 ± 1	181 ± 1	279 ± 11	244 ± 1	258.3 ± 0.5
<i>Isobutanol</i>	24.7 ± 0.3	13.1 ± 0.2	21.6 ± 0.2	28.7 ± 0.2	37.8 ± 0.2	23.9 ± 0.6
<i>Metanol</i>	50 ± 3	46 ± 2	64 ± 5	53 ± 4	52 ± 2	52 ± 1
<i>Propanol</i>	14.9 ± 0.3	19.4 ± 0.5	31.2 ± 0.4	13.6 ± 0.2	18.5 ± 0.4	19.6 ± 0.7
<i>2,3-butanodiol (levo)</i>	358 ± 9	665 ± 16	466 ± 9	283 ± 4	267 ± 9	356 ± 8
<i>2,3-butanodiol (meso)</i>	111 ± 3	221 ± 2	147 ± 6	96 ± 2	95 ± 3	110 ± 2
<i>Glicerina</i>	6598 ± 257	6088 ± 176	7776 ± 221	4158 ± 239	6092 ± 204	6577 ± 308
<i>Acetato de etilo</i>	32 ± 1	17.0 ± 0.4	40 ± 1	32 ± 2	30.6 ± 0.6	35 ± 1
<i>Succinato de dietilo</i>	19 ± 0.5	59 ± 3	28 ± 1	15.8 ± 0.5	12.0 ± 0.6	26.2 ± 0.6
<i>Acetaldehído</i>	42 ± 3	54 ± 2	24.1 ± 0.8	45 ± 1	24 ± 2	42 ± 1
<i>Acetoína</i>	5.8 ± 0.2	12.8 ± 0.7	17.5 ± 0.8	6.3 ± 0.4	13 ± 1	8.1 ± 0.1

TABLA A39. Resultados del análisis multivariante (MANOVA) de las concentraciones de los compuestos mayoritarios detectados en los vinos de estudio, utilizando como factores de clasificación la cepa de levadura empleada, la temperatura de fermentación y la presencia o ausencia de SO₂ en los mostos.

	MANOVA		
	Levadura	Temperatura	SO ₂
<i>2-feniletanol</i>	***	***	***
<i>Alcoholes isoamílicos</i>	***	***	***
<i>Isobutanol</i>	***	***	*
<i>Metanol</i>	***	**	ns
<i>Propanol</i>	***	ns	***
<i>2,3-butanodiol (levo)</i>	***	***	ns
<i>2,3-butanodiol (meso)</i>	***	***	ns
<i>Glicerina</i>	***	***	***
<i>Acetato de etilo</i>	***	*	*
<i>Succinato de dietilo</i>	***	ns	**
<i>Acetaldehído</i>	***	***	***
<i>Acetoína</i>	***	***	*

***: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99.9%; **: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 99%; *: diferencias en las variables dependientes con un nivel de confianza del 95%; “ns”: ausencia de diferencias significativas en las variables dependientes.

TABLA A40. Contribución de los compuestos mayoritarios a las componentes seleccionadas para los Análisis de Componentes Principales (PCA) de los vinos fermentados a 18 y 25 °C.

	<i>18 °C</i>			<i>25 °C</i>		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
<i>2-feniletanol</i>	0,318753	-0,0786253	0,346291	0,0220352	0,24627	0,542941
<i>Alcoholes isoamílicos</i>	-0,143428	0,40886	0,387308	-0,3663	0,0603394	0,316891
<i>Isobutanol</i>	0,0472838	0,43519	0,304958	-0,364755	-0,0758612	-0,0371009
<i>Metanol</i>	0,277458	0,321374	0,100875	0,0250015	-0,444518	0,40675
<i>Propanol</i>	0,337812	0,216933	-0,361131	0,137854	-0,515278	0,16279
<i>2,3-butanodiol (levo)</i>	0,419006	-0,121671	-0,0592173	0,422512	-0,0435656	0,0186693
<i>2,3-butanodiol (meso)</i>	0,407437	-0,155017	-0,00668061	0,425863	-0,00299437	0,00927843
<i>Glicerina</i>	0,364849	0,174827	-0,0292835	0,0832948	-0,490909	-0,0823547
<i>Acetato de etilo</i>	-0,0910836	0,479633	-0,142298	-0,284847	-0,32615	0,302461
<i>Succinato de dietilo</i>	0,325487	-0,266647	0,0895846	0,410114	0,051024	0,0760676
<i>Acetaldehído</i>	-0,0176207	-0,231135	0,672733	0,0574295	0,339035	0,488365
<i>Acetoína</i>	0,308635	0,250897	0,105979	0,305321	-0,00515833	0,261701

TABLA A41. Contribución de los compuestos mayoritarios a las componentes seleccionadas para los Análisis de Componentes Principales (PCA) de los vinos fermentados en presencia (75 mg/L) y ausencia (0 mg/L) de SO₂.

	<i>75 mg/L SO₂</i>			<i>0 mg/L SO₂</i>		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
<i>2-feniletanol</i>	0,298383	0,272193	0,248136	0,0869742	0,319995	0,43477
<i>Alcoholes isoamílicos</i>	-0,120023	0,446273	0,250991	-0,310157	0,044545	0,485418
<i>Isobutanol</i>	-0,0837333	0,433077	0,0632702	-0,222527	-0,0822698	0,50678
<i>Metanol</i>	0,262103	0,333723	0,007192	0,0484924	-0,41976	0,219314
<i>Propanol</i>	0,2797	0,276652	-0,23831	0,26449	-0,409319	-0,0324465
<i>2,3-butanodiol (levo)</i>	0,442381	-0,0648587	-0,0577004	0,458427	0,0599828	0,11639
<i>2,3-butanodiol (meso)</i>	0,436917	-0,0972505	0,00964899	0,448175	0,0844286	0,133639
<i>Glicerina</i>	0,241381	0,295534	-0,376481	0,243099	-0,316704	0,184571
<i>Acetato de etilo</i>	-0,129354	0,439318	0,0889031	-0,227255	-0,389264	0,126609
<i>Succinato de dietilo</i>	0,391524	-0,216381	-0,0357523	0,420824	0,130252	-0,0257321
<i>Acetaldehído</i>	0,0485317	-0,0982512	0,72693	0,137761	0,367468	0,367518
<i>Acetoína</i>	0,354089	-0,0284687	0,363065	0,237875	-0,361328	0,228327

Sección VIII

ANEXO II
CONTRIBUCIONES
CIENTÍFICAS

8. ANEXO II. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

8.1. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

8.1.1. Publicación científica

Martín-García, F. J., Palacios-Fernández, S., De Lerma, N. L., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., Peinado, R. A. (2023). The effect of yeast, sugar and sulfur dioxide on the volatile compounds in wine. *Fermentation*, 9(6), 541. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060541>

8.1.2. Comunicaciones en congresos

Martín-García, F. J., Tirado, V., Puig-Pujol, A., Mauricio, J. C., Peinado, R. (2021). Empleo de levaduras vínicas como modo de mitigar los efectos del cambio climático. *XXVIII Congreso Sociedad Española de Microbiología*. Comunicación oral.

Martín-García, F. J., Martínez-García, R., Tirado, V., Puig-Pujol, A., Mauricio, J. C., Peinado, R. (2020). Evaluación de la eficiencia fermentativa de levaduras seleccionadas para combatir los efectos del cambio climático. *XV Congreso Nacional de Investigación Enológica (GIENOL)*. Comunicación oral.

Martín-García, F. J., Tirado, V., Puig-Pujol, A., Mauricio, J. C., Peinado, R. (2019). Levaduras osmotolerantes como estrategia de lucha frente al cambio climático. *II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias*. Comunicación oral.

Martín-García, F. J., Palacios, S., Puig-Pujol, A., López de Lerma, N., Mauricio, J. C., Peinado, R. (2019). Evaluación de la eficiencia fermentativa de levaduras resistentes a los efectos del cambio climático en la vid. *XLI Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros*. Comunicación oral.

Martín-García, F. J., Palacios, S., López de Lerma, N., Martínez-García, R., González-Jiménez, M. C., Mauricio, J. C., Peinado, R. (2019). Selección de levaduras osmotolerantes y resistentes al SO₂ como estrategia de lucha contra el cambio climático. *I Congreso Internacional sobre los Vinos Tradicionales de Andalucía*. Comunicación oral.

Martín-García, F. J., Palacios, S., Puig-Pujol, A., Mauricio, J. C., Peinado, R. (2019). Retos de la enología frente al cambio climático. *VII Congreso Científico de Investigadores en Formación eida3-ceiA3*. Comunicación oral.

Martín-García, F. J., López de Lerma, N., García-Martínez, T., Peinado, R., Mauricio, J. C. (2018). Estudios proteómicos y exo-metabólicomicos de levaduras vínicas sometidas a diferentes condiciones enológicas. *VIII Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología en la Universidad de Córdoba*. Comunicación oral.

8.1.3. Reconocimientos

Premio a la Mejor Comunicación en Formato Oral en el panel científico de Biotecnología Agroalimentaria y Bioprocesos Agroindustriales (*II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias*) (2019).

Premio al Mejor Monólogo Científico en el Certamen Cuéntame tu Tesis 2022, organizado por la Unidad de Cultura Científica y de la Innovación de la Universidad de Córdoba y celebrado en el programa de la Noche Europea de los Investigadores (2022).

8.2. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS NO DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

8.2.1. Publicación científica

Moreno-García, J., Martín-García, F. J., Ogawa, M., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J. C., Bisson, L. F. (2018). *FLO1*, *FLO5* and *FLO11* flocculation gene

expression impacts *Saccharomyces cerevisiae* attachment to *Penicillium chrysogenum* in a co-immobilization technique. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02586>

8.2.2. Comunicaciones en congresos

Martín-García, F. J., Vararu, F., Roldán-Romero, Y., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., Moreno, J. (2018). Caracterización de vinos Moscatel mediante análisis sensorial y aplicación de programas estadísticos. *XL Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros*. Comunicación oral.

Moreno-García, J., Martín-García, F. J., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J. C., Bisson, L. F. (2017). Effect of the yeast co-flocculation genes *FLO1*, *FLO5* and *FLO11* expression on the yeast-filamentous fungus co-adhesion in a novel immobilization method, "yeasts biocapsules". 7th Congress of European Microbiologists (FEMS). Participación como segundo autor.

Martín-García, F. J., García-Martínez, T., González-Jiménez, M. C., Martínez-García, R., Porras-Agüera, J. A., Mauricio, J. C. (2017). Estudio del fenotipo killer de levaduras vínicas de la Denominación de Origen Montilla-Moriles. *XXXIX Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros*. Comunicación oral.