

UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**INFLUENCIA DE LAS LEVADURAS NO-*Saccharomyces* EN LA GENERACIÓN
DE COMPUESTOS AROMÁTICOS DURANTE LA FERMENTACIÓN
ALCOHÓLICA**

ANÍBAL ESTEBAN QUIÑONES SILVA

**SANTIAGO-CHILE
2013**

UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**INFLUENCIA DE LAS LEVADURAS NO-*saccharomyces* EN LA GENERACIÓN
DE COMPUESTOS AROMÁTICOS DURANTE LA FERMENTACIÓN
ALCOHÓLICA**

**INFLUENCE OF NON-*Saccharomyces* YEAST IN THE GENERATION OF
AROMATIC COMPOUNDS DURING THE ALCOHOLIC FERMENTATION.**

ANÍBAL ESTEBAN QUIÑONES SILVA

**SANTIAGO-CHILE
2013**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**INFLUENCIA DE LAS LEVADURAS NO-*Saccharomyces* EN LA GENERACIÓN
DE COMPUESTOS AROMÁTICOS DURANTE LA FERMENTACIÓN
ALCOHÓLICA**

Memoria para optar al Título Profesional
de Ingeniero Agrónomo

ANÍBAL ESTEBAN QUIÑONES SILVA

	Calificaciones
Profesores Guías	
Srta. Carla Jara C. Ingeniero Agrónomo Enólogo, Dr.	6,5
Sr. Jaime Romero O. Bioquímico, Dr.	6,4
Profesores Evaluadores	
Sra. Marcela Medel M. Ingeniero Agrónomo Enólogo, Dr.	6,4
Sra. Cielo Char A. Bioquímico, Dr.	6,5

SANTIAGO – CHILE

2013

“Hay otros Annapurna en la vida de los hombres...”

- Maurice Herzog

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quisiera agradecer a mis padres por darme la oportunidad de estudiar en la mejor universidad del país.

A mis profesores guías, Srta. Carla Jara y Sr. Jaime Romero, por su buena disposición, dedicación y enorme paciencia, factores invaluableles en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Palabras claves	1
ABSTRACT	2
Keywords:.....	2
INTRODUCCIÓN	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
Levaduras y el perfil aromático: Generalidades.....	6
Compuestos aromáticos producidos por levaduras vínicas.....	7
Ésteres	7
Alcoholes superiores	9
Terpenos derivados de la acción de las enzimas β -glucosidasas	11
Ecología de las levaduras en bayas, bodega y mosto.....	13
Factores físicos y nutricionales que afectan la supervivencia de las levaduras durante la fermentación alcohólica.	15
Factores fisicoquímicos.....	15
Etanol	15
Temperatura	16
pH.....	17
Disponibilidad de oxígeno	18
Factores nutricionales	19
Azúcares.....	19
Compuestos nitrogenados	20
Interacción de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> con el ecosistema presente en el mosto	20
Identificación de cepas de levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	22
Levaduras no- <i>Saccharomyces</i> que formen compuestos que modifiquen el aroma de los vinos...	23
Ejemplos de cultivos iniciadores mixtos comerciales e inoculación secuencial.....	27
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN

La composición aromática es una de las principales características en la que se basa el consumidor al comparar diferentes vinos. En los últimos años, se ha descrito la creciente demanda de los consumidores por nuevos estilos de vinos, que presenten un perfil organoléptico complejo y otorgue tipicidad con características sensoriales distintivas.

Con el objetivo de complejizar la mezcla de compuestos aromáticos en el vino, se han realizado múltiples estudios, en relación a la selección y utilización de levaduras no-*Saccharomyces* durante el proceso de vinificación. Estos estudios han demostrado el potencial tecnológico que tendrían estas levaduras, pertenecientes principalmente a los géneros *Torulaspora*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* y *Metschnikowia*. Estas levaduras son capaces de liberar diversos compuestos aromáticos, especialmente ésteres, por acción enzimática. Esto se traduce en un aumento de la componente frutal y floral en los vinos, características altamente apreciadas por los consumidores, a nivel nacional e internacional.

Palabras claves: levaduras no-*Saccharomyces*, aromas, ésteres, β - glucosidasa

ABSTRACT

Aromatic composition is one of the main features in which the consumer is based on comparing different wines. In recent years, the growing consumer demand for new styles of wine, which present a complex organoleptic profile and confers typicality with distinctive sensory characteristics has been described.

Aiming to obtain a more complex mixture of aromatic compounds in wine, many studies have been conducted in relation to the selection and use of non- *Saccharomyces* yeast during the vinification process. These studies have demonstrated the technological potential that these yeasts, belonging mainly to the genera *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* and *Metschnikowia* would have. These yeasts are capable of releasing various aromatic compounds, especially esters, by enzymatic action. These results will be described like an increase in fruit and floral component in wines, highly appreciated characteristics by consumers, at national and international level.

Keywords: non-*Saccharomyces* yeast, aroma, esters, β - glucosidase

INTRODUCCIÓN

El vino es el resultado de complejas interacciones entre el mosto de uva y diversos microorganismos, tales como: hongos, levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas (Arévalo, 2005). Sin embargo, las levaduras son quienes cumplen el rol más importante, ya que llevan a cabo el desarrollo de la fermentación alcohólica (Beltrán *et al.*, 2002). Este proceso corresponde a la conversión de los azúcares fermentables del mosto (glucosa y fructosa) en etanol y CO₂ (Jolly *et al.*, 2006; Escalante e Ibarra, 2007).

Las levaduras que participan durante el proceso de fermentación alcohólica se pueden clasificar en dos categorías: levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (Baleiras *et al.*, 2005). Las primeras son consideradas levaduras de alto poder fermentativo y que predominan durante el proceso de fermentación alcohólica (Manzanares y Vallés, 2005). Las segundas, corresponden a diversos géneros y especies de levaduras que exhiben un bajo poder de fermentación y que se presentan en las primeras etapas de la fermentación alcohólica (Bely *et al.*, 2008).

Las levaduras no-*Saccharomyces* forman parte de una sucesión natural de especies que interactúan durante el transcurso de la fermentación alcohólica (Plata *et al.*, 2003). Los primeros géneros de levaduras en colonizar el medio fermentativo corresponden a las levaduras no-*Saccharomyces* (Andorra *et al.*, 2012). Estas levaduras, pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces* y *Metschnikowia*, provienen principalmente de la superficie de las bayas, con poblaciones del orden de 10⁴-10⁶ UFC/g (Barata *et al.*, 2012). En cambio, levaduras del género *Saccharomyces*, específicamente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, se encuentran en poblaciones de menor número, alrededor de 10-100 UFC/g (Fleet, 2003). Debido a estas diferencias poblacionales, las levaduras no-*Saccharomyces* formarán parte importante del ecosistema presente en el mosto y predominarán durante las primeras etapas del proceso fermentativo, es decir, durante los primeros 4-6 días de iniciada la fermentación alcohólica. Luego, estas levaduras desaparecen debido al aumento de la concentración de etanol en el medio (Ciani *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010).

Durante el periodo en que las levaduras no-*Saccharomyces* se encuentran presentes en el medio fermentativo, éstas pueden ser capaces de influir indirectamente sobre el aroma primario del vino (Arévalo, 2005). El aroma primario o varietal, está formado por un conjunto de compuestos aromáticos provenientes de las uvas en buen estado fitosanitario (Cabrita *et al.*, 2007). Dentro de este grupo, los terpenos son uno de los compuestos más importantes (Arévalo *et al.*, 2006). Sus descriptores aromáticos están relacionados con aromas florales y aromas propios de cada cultivar (Swiegers *et al.*, 2005). Si bien, una parte de estos compuestos se encuentran presentes en forma volátil en las uvas y en el mosto, una gran cantidad de ellos se encuentra en forma glicoconjugada no-volátil (Mendes *et al.*, 2001). Una estrategia para liberar estos compuestos es mediante la adición exógena de enzimas β-glucosidasas (González-Pombo *et al.*, 2011). Diversos estudios, que revisaremos

más adelante, han demostrado la capacidad de algunos géneros de levaduras no-*Saccharomyces* para sintetizar enzimas β -glucosidasas (Arévalo, 2005; Arévalo *et al.*, 2006). En contraste, *Saccharomyces cerevisiae* no produce este tipo de enzimas, o bien las produce en baja cantidad y con escasa actividad, bajo las condiciones de vinificación (Strauss *et al.*, 2001).

Las levaduras no-*Saccharomyces* también pueden influir directamente sobre el aroma secundario (o fermentativo) del vino (Viana, 2011). Este aroma, que corresponde a la acción de diversos compuestos aromáticos producidos durante la fermentación alcohólica, generalmente es atribuido a la acción de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Viana, 2011). Sin embargo, estudios recientes que se revisarán en apartados posteriores, han demostrado que las levaduras no-*Saccharomyces* serían capaces de generar metabolitos secundarios (principalmente ésteres) en concentraciones mayores a los generados por *Saccharomyces cerevisiae* (Rojas *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2008; Viana *et al.*, 2008; Viana *et al.*, 2011). Estos compuestos volátiles aumentan y complejizan la componente aromática frutal y floral de los vinos, características altamente demandadas por los consumidores en la actualidad (Sumbly *et al.*, 2010).

Hoy en día, se cuestiona la inoculación de cultivos puros de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, debido a la pérdida de tipicidad de los vinos obtenidos (Viana *et al.*, 2011a). Sin embargo, a pesar de tener la capacidad de influir positivamente en el perfil aromático del vino, las levaduras no-*Saccharomyces* no pueden realizar por si solas el proceso de fermentación alcohólica, debido a su bajo poder fermentativo (Fleet, 2003). Es por esta razón, que las investigaciones apuntan a la selección de cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, con el fin de realizar una inoculación mixta, lo que implica una inoculación conjunta de cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, o bien, secuencial, que se refiere a la inoculación de cepas en diferentes etapas de la fermentación alcohólica (Fleet, 2008). Estas formas de inoculación permiten obtener mejores características de las levaduras no-*Saccharomyces* y asegurar que la fermentación alcohólica finalice de forma segura (Comitini *et al.*, 2011).

Investigaciones recientes, señalan un efecto positivo en el incremento del perfil aromático del vino por parte de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* (Rojas *et al.*, 2003; Viana, 2011). De esta manera, ya se encuentran disponibles en el mercado cultivos iniciadores mixtos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans*) y secuenciales (*Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*), comercializados por Chr. Hansen y Lallemand Inc respectivamente (Raynal *et al.*, 2011). A pesar de esto, la oferta en el mercado de estos cultivos comerciales, mixtos o secuenciales, es insuficiente.

El desarrollo de esta área puede convertirse en una estrategia importante para obtener vinos con variados perfiles aromáticos, que resalten las características deseables que el consumidor busca y exige cada vez más.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el objetivo de esta memoria de título es el siguiente:

Analizar y describir la evidencia existente acerca de la influencia de las levaduras no-*Saccharomyces* sobre la generación de compuestos que contribuyan al aroma del vino.

et al., 2005). Además, producen enzimas que actúan sobre precursores aromáticos no-volátiles, en mayor proporción que sus pares *Saccharomyces cerevisiae* (Clemente-Jiménez *et al.*, 2005; Fleet, 2008; Moreira *et al.*, 2008). De esta forma, se han realizado esfuerzos tendientes a seleccionar cepas de levaduras no-*Saccharomyces* que presenten características deseables en cuanto a la formación de metabolitos que potencien el perfil aromático del vino (Rojas *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2011).

Compuestos aromáticos producidos por levaduras vínicas

Los principales compuestos que influyen en el aroma del vino, generados por las levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica se detallan a continuación.

Ésteres

Los ésteres son el grupo de compuestos volátiles más amplio presentes en el vino (Viana, 2011). Son los responsables de la mayoría de los aromas afrutados del “bouquet” obtenido al término de la fermentación alcohólica (Viana *et al.*, 2008). Estos aromas son de gran importancia en vinos jóvenes, tanto blancos como tintos (Saerens *et al.*, 2008).

Los ésteres encontrados en el vino se pueden clasificar como ésteres etílicos y ésteres de acetato (Sumbly *et al.*, 2010). Los primeros, están formados por etanol y un ácido graso de cadena media (Plata *et al.*, 2003). Entre ellos, se incluye al hexanoato de etilo (aroma frutal, anís), octanoato de etilo (fruta madura, piña) y decanoato de etilo (aroma floral) (Lambrechts y Pretorius, 2000). Los segundos, corresponden a ésteres de acetato, los que se componen químicamente de un grupo ácido que corresponde al acetato y de un grupo alcohol, el cual puede ser etanol o algún otro alcohol perteneciente al grupo de los alcoholes superiores (Saerens *et al.*, 2010). Entre los esterres de acetato, encontramos el acetato de etilo que a bajas concentraciones, <80 mg/L, su descriptor es un aroma afrutado; a concentraciones más altas su descriptor más común es el barniz (Plata *et al.*, 2003). Además, podemos encontrar acetato de isoamilo (banana) y acetato de 2-feniletilo, asociado a descriptores florales (Jolly *et al.*, 2006). En el cuadro 1, se describen los principales ésteres junto a sus descriptores aromáticos y umbrales de detección.

En general, las levaduras producen ésteres mediante un proceso enzimático intracelular que depende de diversas variables, tales como los nutrientes presentes en el mosto, en particular las concentraciones de compuestos nitrogenados y la temperatura de fermentación (Sumbly *et al.*, 2010). Ugliano *et al.*, 2007, demostraron que las concentraciones de ésteres en un vino del cv. Chardonnay aumentaba a medida que la fracción YAN (Nitrógeno asimilable por las levaduras) era superior. Si bien, un vino realizado con contenido de YAN de 480

mg·L⁻¹ de N presentó mayor concentración de ésteres, en comparación a uno elaborado con un YAN de 320 mg·L⁻¹ de N. El vino resultante del primer caso, exhibió menores índices en los descriptores aromáticos “frutal y floral” y predominaron los descriptores tales como, vinagre y esmalte de uñas, los cuales están directamente asociados a un aumento en la concentración de ácido acético y acetato de etilo. De este modo, el conocer y manejar las concentraciones de compuestos nitrogenados presentes en el mosto tanto al inicio como durante la fermentación alcohólica es de vital importancia para obtener vinos con un perfil aromático atractivo.

Si bien, los factores antes mencionados son de gran relevancia, la concentración y la proporción de ésteres en el vino es dependiente del género, especie y cepa de levadura presente durante la fermentación alcohólica (Rojas *et al.*, 2001). No obstante, las cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas durante la fermentación alcohólica producen ésteres en cantidades variables (Sumbly *et al.*, 2010). Se ha demostrado que las levaduras no-*Saccharomyces* pueden producir estos compuestos en mayores concentraciones (Rojas *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2008; Viana *et al.*, 2008; Viana *et al.*, 2011). Es así como, Rojas *et al.* (2003) demostraron que una cepa de la especie *Hanseniaspora guilliermondii* produjo una mayor concentración de acetato de 2-feniletilo, compuesto asociado a descriptores aromáticos tales como floral, frutal y miel, en comparación a una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*. Esto confirma el potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* como una herramienta para incrementar las concentraciones de ésteres y así obtener vinos con aromas agradables, y es la razón de por qué se han realizado gran cantidad de investigaciones en torno a este tema durante los últimos años.

En el Cuadro 1, se describen las concentraciones de ésteres comúnmente descritas en vinos. Estos compuestos, se encuentran generalmente en torno a los umbrales de detección (Sumbly *et al.*, 2010). De esta forma, una pequeña variación en la concentración de ésteres, podría significar que el aroma derivado de ellos pueda ser percibido por el consumidor (Viana, 2011). Se conoce que la producción de estos metabolitos secundarios depende, en gran medida, de las cepas de levaduras presentes durante la fermentación alcohólica. Se puede pronosticar que una correcta selección cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, podría aumentar la concentración de ésteres en el vino (Lambrechts y Pretorius, 2000; Saerens *et al.*, 2008; Andorrà *et al.*, 2012).

Cuadro 1: Descriptores aromáticos, concentración en vino y umbrales de detección de los principales ésteres producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica.

Compuesto	Descriptores aromáticos	Concentración en vino (mg/L)	Umbral de detección (mg/L)
Ésteres etílicos			
Butanoato de etilo	Floral, afrutado, frutilla, dulce.	0,07-0,53	0,001-0,02
Hexanoato de etilo	Afrutado, frutilla, manzana verde, anís, violetas.	0,15-1,64	0,005-0,85
Octanoato de etilo	Dulce, afrutado, fruta madura, piña.	0,14-2,61	0,002-0,58
Decanoato de etilo	Floral, afrutado.	0,01-0,70	0,2-0,51
Ésteres de acetato			
Acetato de etilo	Afrutado, barniz.	10-100	7,5-20
Acetato de isoamilo	Banana, afrutado.	0,03-8,1	0,26
Acetato de 2-feniletilo	Floral, rosas, miel.	Trazas-0,96	0,01-0,25
Acetato de hexilo	Herbáceo, afrutado, uva, manzana madura.	Trazas-3,9	0,002-0,67

Peinado *et al.*, 2004; Francis y Newton, 2005; Sumby *et al.*, 2010; Viana, 2011.

Alcoholes superiores

Se denominan alcoholes superiores a todos aquellos alcoholes que poseen más de 2 átomos de carbono y que presentan un peso molecular y punto de ebullición superior al del etanol (Viana, 2011). Los alcoholes superiores, corresponden a subproductos de la fermentación alcohólica. Son sintetizados por las levaduras mediante un mecanismo conocido como Reacción de *Ehrlich*, en la cual, como primer paso se produce la desaminación de los aminoácidos presentes en el medio (valina, leucina, isovalina, treonina y fenilalanina), formando ácidos cetónicos (Lambrechts y Pretorius, 2000). Estos compuestos posteriormente serán descarboxilados, obteniendo de esta forma aldehídos, los cuales finalmente serán reducidos formando alcoholes superiores (Mateos *et al.*, 2006).

Los alcoholes superiores, se dividen en alcoholes alifáticos (propanol, isobutanol, alcohol isoamílico, hexanol) y alcoholes aromáticos, tales como 2-feniletanol, tirosol, triptofol

(Moreira *et al.*, 2008). Estos compuestos pueden tener influencia positiva como negativa en el aroma del vino (Fleet, 2008). Cuando la concentración de alcoholes totales supera los 400 mg/L se les considera como un defecto sensorial, debido a que le confieren al vino aromas fuertes y pungentes que enmascaran a las demás características aromáticas (Swiegers *et al.*, 2005). En cambio, a concentraciones bajo los 300 mg·L⁻¹ los alcoholes superiores aportan a la componente frutal y floral del perfil aromático del vino (Rojas *et al.*, 2003). Su concentración en el vino puede ir desde los 100 mg·L⁻¹ hasta los 500 mg·L⁻¹ y en general se encuentran en mayor proporción en vinos tintos que en vinos blancos (Viana *et al.*, 2008). En el Cuadro 2, se pueden observar los principales alcoholes superiores encontrados en el vino, junto con sus descriptores aromáticos y umbrales de detección (Lambrechts y Pretorius, 2000).

Cuadro 2: Descriptores aromáticos, concentración en vino, umbrales de detección y aminoácidos que dan origen a los alcoholes superiores producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica.

Alcohol superior	Aminoácido	Descriptores aromáticos	Concentración en vino (mg·L ⁻¹)	Umbral de detección (mg·L ⁻¹)
Propanol	Treonina	Disolvente	9-68	306-500
Isobutanol	Valina	Alcohol	9-28	75-500
Alcohol isoamilico	Leucina	Mazapán	45-490	60-300
Hexanol	-	Herbáceo	0,3-12	4
Tirosol	Tirosina	Miel	-	-
2-feniletanol	Fenilalanina	Floral, Rosas	10-180	125

Lambrechts y Pretorius, 2000; Peinado *et al.*, 2004.

Las levaduras son los microorganismos responsables de la producción de estos compuestos y su concentración es dependiente de la cepa de levadura presente durante la fermentación alcohólica (Torija, 2002; Moreira *et al.*, 2011). Algunos estudios indican que fermentaciones llevadas a cabo en presencia de levaduras no-*Saccharomyces* pueden aumentar la concentración de alcoholes superiores, sin sobrepasar el límite en que es considerado como defectuoso (Swiegers *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2008; Viana, 2011). Es así como se ha demostrado que cepas de la especie *Pichia fermentans* aumentan el contenido 2-feniletanol en el vino, compuesto asociado principalmente a aromas florales (Clemente-Jiménez *et al.*, 2004). Sin embargo, la importancia de los alcoholes superiores en relación al aroma del vino, radica en que son precursores en la formación de ésteres de

acetato por parte de las levaduras, los cuales, como vimos anteriormente, están asociados a aromas agradables (Viana, 2011).

Terpenos derivados de la acción de las enzimas β -glucosidasas

Los compuestos terpénicos son unos de los componentes principales en el aroma primario o varietal de los vinos, particularmente en vinos blancos (Arévalo, 2005). Estos compuestos provienen de las uvas, por lo tanto, su concentración va a depender de la variedad utilizada para la elaboración del vino (Cabrita *et al.*, 2007). Las siguientes variedades se han descrito como aromáticas ricas en compuestos terpénicos: Gewürztraminer, Riesling, Moscatel, Chardonnay, Cabernet Sauvignon, entre otras (Swiegers y Pretorius, 2005).

Los terpenos se pueden encontrar en la naturaleza en dos modalidades. La primera, de forma libre, dónde expresan sus aromas característicos y la segunda de forma glicoconjugada no volátil (Arévalo *et al.*, 2006). Esta última es la más abundante, tanto en la uva como en el mosto, y se les considera precursores aromáticos (Cordero-Otero *et al.*, 2003). En su forma libre, los terpenos se asocian con descriptores aromáticos agradables, tales como flores y miel (Arévalo *et al.*, 2006). Los terpenos más importantes son el linalol (flor de naranjo), geraniol (rosas), citronelol (rosas), α -terpineol (coníferas) y hotrienol (jacinto) (Villena *et al.*, 2007). En el Cuadro 3, se detallan los principales compuestos terpénicos presentes en el vino, junto con sus descriptores aromáticos, umbrales de detección y concentraciones descritas en el vino.

La liberación de estos compuestos volátiles reviste gran importancia para el perfil aromático del vino, debido a que podrían acrecentar los aromas varietales (Strauss *et al.*, 2001). Una estrategia para liberar estos compuestos volátiles, desde su forma glicoconjugada es mediante la adición de enzimas β -glucosidasas (González-Pombo *et al.*, 2011). Estas enzimas se encuentran en la uva, en hongos y en levaduras. Las enzimas que se encuentran en la uva presentan baja actividad a pH 3-4 (valores generalmente encontrados en el vino), siendo su óptimo un pH 5. Además, son fuertemente inhibidas por altas concentraciones de glucosa y etanol, por tanto, no intervienen mayormente en la liberación de los compuestos terpénicos (Arévalo *et al.*, 2006).

Cuadro 3: Principales compuestos terpénicos descritos en vinos.

Terpenos	Descriptor aromáticos	Concentración mínima en vino ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentración máxima en vino ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Umbral de detección ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Linalol	Flor de naranjo	6	375	100
Nerol	Rosa, magnolia	trazas	43	400
Geraniol	Rosa, miel	trazas	187	130
Citronelol	Rosa, citronela	1	5	100
α -terpineol	Coníferas, aceite de pino	5	399	450
Ho-trienol	Tilo, Jacinto	3	117	100

Catania y Avagnina, 2007; Cabrita *et al.*, 2007

Actualmente, en el proceso de vinificación, se utilizan enzimas comerciales extraídas principalmente de *Aspergillus spp*, las cuales corresponden en realidad a mezclas de glucanasas inespecíficas (Villena *et al.*, 2007). Sin embargo, estas enzimas no son eficientes en la liberación de compuestos volátiles ya que no actúan específicamente sobre el enlace β -glucosídico que une el terpeno con el azúcar (Van Rensburg y Pretorius, 2000). Además, presentan el inconveniente que pueden desencadenar reacciones de hidrólisis perjudiciales para el vino, debido principalmente a la presencia de esterases. Estas enzimas actúan sobre esteres cinámicos produciendo finalmente vinil fenoles, los cuales se asocian a aromas desagradables como tinta y ténpera (Arévalo., 2005).

Es bien sabido, que la especie *Saccharomyces cerevisiae* no se caracteriza por producir enzimas β -glucosidasas (Viana, 2005). Las cepas de esta especie, que son capaces de producirlas lo hacen en bajas cantidades y las enzimas son inhibidas por la concentración de glucosa y etanol presentes durante el proceso de vinificación (Zott *et al.*, 2008). Es por esto, que se ha estudiado como alternativa, el empleo de levaduras no-*Saccharomyces*, debido a las enzimas que producen (Cordero *et al.*, 2003; González-Pombo *et al.*, 2011). Diversos estudios han demostrado que las levaduras pertenecientes a los géneros *Issatchenkia*, *Debaryomyces*, *Candida* y *Pichia* son capaces de producir enzimas β -glucosidasas que actúen bajo las condiciones de vinificación (Viana, 2005; González-Pombo *et al.*, 2011).

En ensayos realizados por González-Pombo *et al.*, (2011), se han logrado obtener extractos enzimáticos de *Issatchenkia terricola*, los cuales exhiben una mayor tolerancia al etanol en comparación a la mayoría de enzimas β -glucosidasas utilizadas en la actualidad. Además,

en este mismo estudio, se demostró que estas enzimas permanecen activas a altas concentraciones de glucosa, llegando a presentar un 80% de actividad en un medio con $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa. También se obtuvo que a pH normalmente encontrados en el vino (sobre 3), las enzimas β -glucosidasas sintetizadas por esta especie eran activas y estables. Todo esto se traduce en un aumento en la concentración de monoterpenos volátiles, los cuales se incrementaron de 1420 a $1914 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en este estudio, aumentando de esta forma el aroma varietal del vino.

Estudios realizados por Arévalo (2005), demostraron que la especie *Debaryomyces pseudopolymorphus* presenta la facultad de excretar enzimas β -glucosidasas hacia el medio de crecimiento, durante el proceso de fermentación alcohólica. Lo que se tradujo en el aumento de hasta un 44% del contenido de compuestos terpénicos en el vino en comparación al control, particularmente de citronelol (descriptor aromático que se asocia a rosas), geraniol (rosas, miel) y nerol, cuyo descriptor aromático es rosas y magnolia.

Ecología de las levaduras en bayas, bodega y mosto

La ecología microbiana corresponde al estudio de los ecosistemas con sus interacciones, vectores, fuentes y reservorios de los microorganismos (Barrajón, 2009). Para estudiar y comprender la ecología de las levaduras, se debe cuestionar el dónde y por qué estos microorganismos viven en un determinado hábitat y cómo las levaduras interactúan con otros microorganismos (Barata *et al.*, 2012).

Las levaduras pueden encontrarse en distintas etapas y lugares durante el proceso de elaboración del vino (Fleet, 2003). Proviene principalmente del viñedo, encontrándose en la superficie de las bayas como también en el equipamiento de bodega, donde finalmente pasan al mosto en el cual, en mayor o menor medida, llevarán a cabo el proceso de fermentación alcohólica (Ocón *et al.*, 2010). Su presencia y cantidad en las uvas van a estar determinados por varios factores, entre ellos factores climáticos y micro-climáticos, como temperatura, lluvias, exposición a la luz solar, etc., (Barata *et al.*, 2012). Los manejos que se realizan en campo también afectan la diversidad y número de especies de levaduras presentes en las bayas. El uso de fungicidas en épocas de lluvia para controlar hongos como *Botrytis cinerea* podrían resultar en una disminución de la población de levaduras existentes (Jolly *et al.*, 2006).

Factores bióticos como la presencia de vectores pueden determinar una mayor o menor dispersión de levaduras dentro del viñedo. Se ha determinado que ciertos insectos o aves pueden ser vectores de levaduras como *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Pichia membranifaciens*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Hanseniaspora uvarum* (Csoma y Sipiczki, 2008). Lo anterior indica que las características del lugar influirían en la cantidad

y diversidad de levaduras presentes en la uva. Sin embargo, no existen estudios que permitan concluir que un determinado *terroir* esté asociado a la presencia de especies o géneros específicos (Barata *et al.*, 2012).

En las uvas, las levaduras encuentran un ambiente apropiado para su desarrollo (Plata *et al.*, 2003). La superficie de las bayas pueden presentar micro-fisuras que proporcionen nutrientes a las levaduras (Barata *et al.*, 2012). En este ambiente, las levaduras que se encuentran en la superficie de las bayas durante el periodo de pinta hasta cosecha, corresponden a especies de géneros oxidativos. Estas levaduras, pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*, *Candida* y *Metschnikowia* se encuentran en un rango entre 10^3 – 10^5 UFC·mL⁻¹ y tienen un crecimiento sólo en la superficie del mosto, formando una película (Fugelsang y Edwards, 2007). En el caso que la materia prima corresponda a uva con deficiente estado fitosanitario, daños o roturas en la piel, este factor podría permitir el desarrollo de especies fermentativas, tales como *Zygosaccharomyces spp.*, *Torulaspora spp.* y *Saccharomyces spp.*, debido a la mayor disponibilidad de azúcar en la superficie de la baya (Jolly *et al.*, 2006).

Otro sitio importante que actúa como reservorio de las levaduras es la bodega de vinos, siendo la superficie de ésta y del equipamiento utilizado durante el proceso de vinificación (despalilladora, trituradoras, tanque de fermentación, etc.) una fuente potencial de inóculo, debido al contacto reiterado de las superficies con el mosto de uva (Ocón *et al.*, 2010). Se ha encontrado en estos lugares una gran diversidad de géneros y especies de levaduras, siendo las más abundantes aquellas que pertenecen a géneros de levaduras no-*Saccharomyces*, tales como *Torulaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Candida* y *Debaryomyces*. En menor medida, también se pueden detectar levaduras correspondientes al género *Saccharomyces* (Ocón *et al.*, 2010). Esta diversidad de géneros se ve afectado en parte por el sistema de limpieza utilizado en la bodega. Sin embargo, se ha demostrado que los métodos de limpieza no aseguran una erradicación total de estas levaduras, pudiendo sobrevivir a éstos para posteriormente alcanzar el mosto (Jolly *et al.*, 2006; Ocón *et al.*, 2010).

Durante la fermentación alcohólica, se produce una sucesión natural de especies de levaduras (Fleet., 2003). En la Figura 2, se puede observar el desarrollo secuencial de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Las levaduras dominantes de las fases iniciales del proceso fermentativo corresponden a levaduras no-*Saccharomyces* de los géneros *Kloeckera/Hanseniaspora* principalmente (Fleet, 2008). A medida que la fermentación alcohólica avanza también aumenta el contenido de etanol, disminuye la concentración de oxígeno y sumado a un pH bajo, presencia de SO₂, entre otros factores, las levaduras no-*Saccharomyces* disminuyen sus poblaciones, dando paso a que *Saccharomyces cerevisiae* tome el control y finalice la fermentación alcohólica (Fugelsang y Edwards, 2007; Barata *et al.*, 2012).

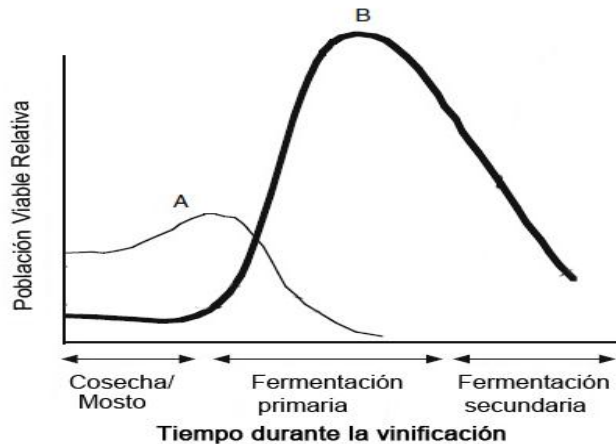


Figura 2. Crecimiento generalizado de (A) levaduras no-*Saccharomyces* y (B) *Saccharomyces* durante el proceso de vinificación. Fugelsang y Edwards, 2007.

Factores físicos y nutricionales que afectan la supervivencia de las levaduras durante la fermentación alcohólica

Diversos factores intervienen en el crecimiento y desarrollo de las poblaciones de levaduras durante el proceso de vinificación, pudiendo afectar el normal desarrollo de la fermentación alcohólica (Comitini *et al.*, 2011).

Los factores fisicoquímicos que afectan el desarrollo y supervivencia de las levaduras durante el proceso de vinificación corresponden a la temperatura de fermentación, concentración de etanol, el pH y los niveles de oxígeno (Valdés *et al.*, 2011). En tanto, los factores nutricionales que afectan en mayor medida la supervivencia de las levaduras durante la vinificación corresponden a la concentración de azúcares y compuestos nitrogenados (Aranda *et al.*, 2005).

Factores fisicoquímicos

Etanol. El etanol es el compuesto más importante producido por las levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica (Kitagaki *et al.*, 2007). Sin embargo, también es un producto altamente tóxico para las levaduras (Lei *et al.*, 2007). La presencia de etanol provoca principalmente cambios en la composición lipídica de la membrana celular, lo cual altera su fluidez y el transporte de glucosa y aminoácidos (You *et al.*, 2003).

Las levaduras poseen mecanismos de adaptación para sobrevivir a la creciente concentración de etanol en el medio, los cuales son dependientes de cada cepa (Aguilera *et al.*, 2006). Uno de estos mecanismos corresponde a la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados, los que incrementan la rigidez de la membrana evitando de esta forma el ingreso del etanol hacia el interior de la célula (Lei *et al.*, 2007). Sin embargo, estos compuestos sólo pueden ser sintetizados en un ambiente aeróbico, por lo que durante la fermentación alcohólica las levaduras no son capaces de producirlos, sin embargo, pueden ser adicionados de manera exógena (Barrajón, 2009).

En general, se describe como limitante para la supervivencia de las levaduras no-*Saccharomyces* concentraciones de etanol entre 5-7% v/v (Fleet, 2003). Pina *et al.*, 2004, también demostraron que la tolerancia a altas concentraciones de etanol, es dependiente de cada cepa de levadura. Las levaduras no-*Saccharomyces* son menos tolerantes que sus pares *Saccharomyces cerevisiae*. En este mismo estudio, se evaluó la adición exógena de lípidos, tales como ácido oleico y esteroides, demostrando que las cepas de *Hanseniaspora guilliermondii* fueron capaces de incorporar estos compuestos a su membrana celular. De esta forma, era factible aumentar su tolerancia al etanol, tal y como sucede con la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, en otras especies como *Torulaspora delbrueckii* y *Hanseniaspora uvarum* no se observó un aumento de la tolerancia al etanol, a pesar de incorporar estos compuestos en su estructura. Por otra parte, *Debaryomyces hansenii* ni siquiera incorporó estos lípidos en su membrana celular. Estos resultados demuestran que los principios, extensamente estudiados, en relación a levaduras *Saccharomyces*, no siempre tendrán los mismos efectos en las levaduras no-*Saccharomyces*. Aún se tienen insuficientes antecedentes sobre sus mecanismos de tolerancia al etanol y aún menos sobre posibles formas de mejorar estas características (Pina *et al.*, 2004).

Temperatura. La temperatura de fermentación afecta la viabilidad de las levaduras en el mosto durante la fermentación alcohólica (Lucero *et al.*, 2000). Beltrán *et al.*, (2008) demostraron que temperaturas de fermentación de 35°C disminuyen la viabilidad celular de las levaduras. Esto podría deberse a una acumulación de etanol intracelular superior a lo normal, provocando toxicidad celular y alteraciones en la membrana celular, lo cual conllevaría a una merma de su funcionalidad. El uso de temperaturas de fermentación sobre 35°C genera un ambiente muy restrictivo, obteniendo como resultado una fermentación incompleta con alto contenido de azúcares y baja concentración de etanol (Torija *et al.*, 2003).

A su vez, las temperaturas de fermentación bajas, entre 10-15°C, son cada vez más frecuentes en vinificaciones de vinos blancos, debido a la necesidad de obtener vinos con un perfil aromático más pronunciado (Jolly, *et al.*, 2006; Masneuf-Pomarède *et al.*, 2006). El mayor desarrollo de los aromas en fermentaciones a bajas temperaturas, se debería a una mayor retención de compuestos terpénicos (aroma varietal), reducción en la síntesis de alcoholes superiores y aumento de la proporción de ésteres etílicos (aromas florales) y ésteres de acetato (aromas frutales) en la composición volátil del vino (Manzanares *et al.*, 2005).

Se ha descrito que temperaturas de fermentación entre 15°C y 25°C pueden disminuir la sensibilidad al etanol de especies tales como *Kloeckera apiculata* y *Candida stellata* (Mills *et al.*, 2002). Debido a esto, la ecología microbiana del mosto-vino será diferente dependiendo de la temperatura de fermentación utilizada (Jolly *et al.*, 2006). Estos cambios poblacionales permitirían obtener una mayor contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* al perfil aromático del vino, en condiciones de bajas temperaturas de fermentación, lo cual puede resultar beneficioso en la elaboración de vinos blancos (Fleet, 2003).

La supervivencia de las levaduras a temperaturas que no superen los 15°C va a depender de su capacidad de adaptación al medio. La modificación en la composición de la membrana plasmática es una de las principales adaptaciones a las bajas temperaturas, particularmente los cambios en la composición lipídica de la membrana (Torija, 2002). En las condiciones de vinificación, de vinos blancos principalmente, las bajas temperaturas de fermentación y la ausencia de oxígeno son una de las principales características (Beltrán *et al.*, 2008). Bajo estas condiciones, las levaduras ven limitada su capacidad de sintetizar ácidos grasos insaturados y esteroides. Estos compuestos son constituyentes de la membrana celular, los cuales actúan como protectores frente al estrés producido por el etanol a bajas temperaturas (Lucero *et al.*, 2000). Una estrategia utilizada por las levaduras para adaptarse y sobrevivir a estas condiciones es la síntesis de ácidos grasos de cadena media (C6-C14), los cuales le permiten a la célula ajustar la integridad funcional y estructural de la membrana (Torija *et al.*, 2003). Por otra parte, la síntesis de ácidos grasos de cadena media puede ser negativa para las levaduras debido a su toxicidad, pudiendo inhibir su crecimiento (Masneuf-Pomarède *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que el aumento de la concentración de ácidos grasos en el medio no sería suficiente para ocasionar estos problemas bajo las condiciones de vinificación antes descritas (Torija *et al.*, 2002).

pH. El pH del mosto se encuentra generalmente dentro del rango de 2,75–4,2. Estos valores contribuyen a prevenir contaminaciones por microorganismos alterantes y permiten el crecimiento de las especies de levaduras que participarán durante el proceso de fermentación alcohólica. En el Cuadro 4, se puede observar que variaciones en el pH del mosto en un rango de 3,0-4,0 no afectaron el crecimiento y desarrollo celular de especies *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (Charoenchai *et al.*, 1998).

Por otra parte, el pH intracelular puede afectar el crecimiento de las levaduras (Guldfeldt y Arneborg, 1998). Al interior de la célula, el pH es cercano a la neutralidad, y por tanto más alto que en el medio exterior, por lo que los ácidos orgánicos débiles presentes en el mosto, como el ácido acético, pueden difundir e ingresar a través de la membrana hacia el medio intracelular (Arneborg *et al.*, 2000). El ácido acético presenta un $pK = 4,75$, más alto que el pH del medio extracelular y una vez dentro de la célula se disocia debido al pH. De esta manera, se produce una acidificación de la célula de levadura, lo cual desencadena la reacción de la ATPasa que envía estos ácidos fuera de la membrana celular, con el consiguiente gasto de energía, la cual podría haber sido utilizada en el crecimiento de la levadura (Arroyo-López *et al.*, 2009).

Cuadro 4: Biomasa celular máxima ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de diversas especies y cepas de levaduras durante la fermentación alcohólica de un mosto a diferentes valores de pH.

Cepa	pH 3,0	pH 3,5	pH 4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HB350	2,10	2,20	2,30
<i>Kloeckera apiculata</i> FRR2168	1,09	0,94	1,04
<i>Kloeckera apiculata</i> 401	1,55	1,31	1,38
<i>Candida stellata</i> 8008	2,25	2,25	2,10
<i>Candida colliculosa</i> 9003	1,90	1,90	1,90
<i>Candida pulcherrima</i> 1000	1,02	0,90	0,87
<i>Torulaspota delbrueckii</i> 6005	1,35	1,50	1,50
<i>Pichia anómala</i> 703300	0,60	0,90	0,52

Charoenchai *et al.*, 1998.

Disponibilidad de oxígeno. Las levaduras presentes durante el proceso de fermentación alcohólica requieren de oxígeno para sintetizar lípidos, tales como esteroides y ácidos grasos insaturados, los cuales son constituyentes esenciales de la membrana plasmática (du Toit *et al.*, 2006). Estos componentes actúan sobre la fluidez de la membrana, influyendo directamente en la capacidad fermentativa, viabilidad celular y tolerancia a concentraciones crecientes de etanol en el medio (Varela *et al.*, 2012).

En un estudio realizado por Hansen *et al.*, (2001), se demostró que especies tales como *Torulaspota delbrueckii* y *Kloeckera thermotolerans* se ven afectadas en mayor medida que *Saccharomyces cerevisiae* cuando el oxígeno disponible disminuye. Este mismo estudio concluye que la baja disponibilidad de oxígeno en etapas avanzadas de la fermentación alcohólica es causal de la temprana desaparición de las levaduras no-*Saccharomyces* del medio fermentativo y explicaría la sucesión de especies que ocurre durante este proceso.

En condiciones de anaerobiosis estricta, la falta de oxígeno puede provocar en las levaduras una inhibición de la absorción de azúcares y por consiguiente, una baja tasa de crecimiento, lo cual puede llevar a una fermentación incompleta (Varela *et al.*, 2012). Salmon, (2006), demostró que para obtener una óptima síntesis de lípidos y crecimiento celular durante la

fermentación alcohólica, se requiere entre 5-7 mg·L⁻¹ de oxígeno en el medio. Debido a esto, en situaciones en que la cinética de fermentación decae, un manejo habitual (en cepas tintas principalmente), consiste en oxigenar el mosto en fermentación, de esta forma se promueve la síntesis de biomasa por parte de las levaduras y se logra una fermentación completa (Salmon, 2006).

Factores nutricionales

Azúcares. Al inicio de la fermentación alcohólica las levaduras se encuentran en un medio con altos niveles de azúcar, generalmente entre 200-250 g·L⁻¹ (Bely *et al.*, 2008). Esta condición puede afectar su desarrollo, debido al estrés osmótico generado (Jiménez *et al.*, 2011)

Sin embargo, las levaduras en su medio natural, como pueden ser las microfisuras en una baya de uva, también se enfrentan a ambientes con alta concentración de azúcares (Folch *et al.*, 2004). Por lo tanto, es de esperar que estos microorganismos posean mecanismos de respuesta al estrés osmótico, pudiendo desarrollarse adecuadamente en un ambiente con las características de un mosto de uva (Cardona *et al.*, 2007).

Numerosos estudios han descrito también la capacidad de algunas levaduras no-*Saccharomyces* para sobrevivir al proceso de fermentación alcohólica en medios con alto contenido de azúcar (Bely *et al.*, 2008; Rantsiou *et al.*, 2012). Se ha demostrado que especies como *Torulaspota delbrueckii* y *Candida zemplinina* pueden participar en fases iniciales del proceso fermentativo de mostos con altos niveles de azúcar (350-450 g·L⁻¹) en cultivos mixtos junto a *Saccharomyces cerevisiae* (Rantsiou *et al.*, 2012). Estas especies presentan la ventaja de producir bajas cantidades de ácido acético en este tipo de ambientes, lo cual posibilitaría su uso en cultivos mixtos o secuenciales junto a *Saccharomyces cerevisiae* (Bely *et al.*, 2012).

Uno de los mecanismos de osmorregulación celular más estudiado corresponde a la síntesis y acumulación de glicerol, por parte de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Erasmus *et al.*, 2003). El glicerol es sintetizado por las levaduras durante la fermentación alcohólica. Actúa como osmolito protector, impidiendo la pérdida de turgor debido a la compensación de la presión osmótica (Folch *et al.*, 2004). Sin embargo, esta especie de levadura también produce cantidades elevadas de ácido acético, en respuesta al estrés osmótico en mostos con alto contenido de azúcar (350-400 g·L⁻¹). Bajo estas condiciones, pueden llegar a sintetizar cantidades de 1,35 g·L⁻¹ de ácido acético. En mostos con un contenido de azúcares más bajo (220 g·L⁻¹), la producción de ácido acético está alrededor de 0,3 g·L⁻¹ (Rantsiou *et al.*, 2012). De esta forma, la acidez volátil en mostos con niveles altos de azúcares puede llegar a superar 1,5 g·L⁻¹ expresado en ácido acético (Bely *et al.*, 2008).

Compuestos nitrogenados. El nitrógeno, es el macronutriente más abundante en la vid y por ende en el mosto. Juega un rol importante en muchas de las funciones biológicas de las levaduras, lo cual repercute en la cinética de fermentación y por consiguiente en la calidad del vino (Valdés *et al.*, 2011).

El nitrógeno se encuentra presente en el mosto en forma inorgánica (amonio y sales de amonio) y en forma orgánica como proteínas y aminoácidos (Carrau *et al.*, 2010). Los aminoácidos más abundantes en el mosto corresponden a la prolina, arginina, ácido glutámico, treonina y serina (Bell y Henschke, 2005). Todos estos compuestos nitrogenados, exceptuando la prolina que no es asimilable por la levadura en condiciones anaeróbicas, constituyen lo que se conoce como Nitrógeno Asimilable por las Levaduras (YAN) (Taillandier *et al.*, 2007).

Para llevar a cabo una fermentación alcohólica de forma correcta, a menudo se cita una concentración mínima de $140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de N asimilable, especialmente en mostos con bajo contenido de sólidos (Varela *et al.*, 2012; Vilanova *et al.*, 2007). La concentración óptima es alrededor de $150\text{-}200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Nitrógeno asimilable, valor que dependerá de la cepa de levadura y del tipo de vino, entre otros factores (Ugliano *et al.*, 2007).

Una pobre concentración de YAN ($<140 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$) puede conducir a obtener bajas poblaciones de levaduras y a un pobre vigor de fermentación, aumentando el riesgo de fermentaciones lentas o detenidas (Bell y Henschke, 2005). A su vez, aumenta la síntesis de alcoholes superiores y tioles indeseables (sulfuro de hidrógeno) y disminuye la producción de ésteres y ácidos grasos volátiles de cadena larga. Por el contrario, valores de YAN elevados (sobre $400 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$) conducen al aumento de la biomasa de levaduras y de la acidez volátil, debido a la síntesis de acetato de etilo y ácido acético (Valdes *et al.*, 2011).

La suplementación de compuestos nitrogenados debe ser realizada en función de cada cepa y de las condiciones del medio, para evitar una adición excesiva o deficiente que puedan llevar a una disminución de la eficiencia de fermentación, síntesis de metabolitos indeseables y menor producción de compuestos deseables (Zott *et al.*, 2008).

Interacción de las levaduras no-*Saccharomyces* con el ecosistema presente en el mosto

Durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica, las levaduras no-*Saccharomyces* son quienes predominan en el medio (Ciani *et al.*, 2009). Estas levaduras provienen principalmente de las uvas y del ambiente de la bodega (Ocón *et al.*, 2010). Generalmente, levaduras apiculadas tales como *Hanseniaspora* y su fase anamórfica *Kloeckera*, así como levaduras oxidativas entre las que se encuentran *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Rhodotorula* son quienes inician el proceso fermentativo (Zott *et al.*, 2008). Estas levaduras se desarrollan hasta alcanzar $10^6\text{-}10^7 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, pero a medida que la fermentación alcohólica avanza, las levaduras no-*Saccharomyces* comienzan a desaparecer (Fleet, 2003).

La muerte paulatina de las levaduras no-*Saccharomyces* se atribuye principalmente a la creciente concentración de etanol presente en el medio fermentativo (Querol *et al.*, 2003). Se ha descrito que concentraciones superiores a 5-7% (v/v) de etanol ocasionarían la desaparición de las levaduras no-*Saccharomyces* del medio, lo que ocurre generalmente entre el quinto y sexto día de fermentación (Fleet, 2003). Esta situación, deriva en un estrés químico, que para las levaduras trae como consecuencia una mayor fluidez de la membrana plasmática, debido a cambios provocados en la composición lipídica. Esta situación afecta los mecanismos de ingreso de nutrientes y a la permeabilidad selectiva de la membrana celular (Pina *et al.*, 2004). Aunque, especies como *Torulaspora delbrueckii* presentan una mayor tolerancia al etanol, pueden estar presentes durante la fermentación alcohólica hasta que la concentración de etanol en el medio alcance 9-11% v/v (Viana, 2011). Posteriormente, la especie *Saccharomyces cerevisiae* comienza a predominar el medio fermentativo, llegando a poblaciones de 10^7 - 10^8 UFC·ml⁻¹, hasta concluir la fermentación alcohólica (Fleet, 2008).

La temperatura de fermentación, es un factor importante que influye en la temprana desaparición de las levaduras no-*Saccharomyces* (Torija, 2002). Temperaturas bajas de fermentación (15-20°C) producen una disminución de la sensibilidad al etanol en las levaduras, pudiendo sobrevivir de mejor forma bajo estas condiciones (Querol *et al.*, 2003). De esta manera, se han reportado poblaciones de *Hanseniaspora* y *Candida* en números similares a *Saccharomyces cerevisiae* (10^7 - 10^8 UFC·ml⁻¹) en vinificaciones de vinos blancos llevadas a cabo en este rango de temperaturas (Torija *et al.*, 2002). Esto concuerda con lo descrito por Moreira *et al.*, (2010), quienes observaron una fuerte presencia de levaduras apiculadas al inicio de la fermentación alcohólica a 21°C, las cuales al 4-5^{to} día comenzaron a disminuir su nivel poblacional. Sin embargo, su presencia se mantuvo en números contables (10^6 - 10^7 UFC·ml⁻¹) hasta el final de la fermentación alcohólica con un nivel de etanol de 12,5% v/v.

El oxígeno disponible es otro parámetro importante que incide en la temprana muerte de las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica. Se ha demostrado que las levaduras no-*Saccharomyces* son menos tolerantes a bajas concentraciones de oxígeno disponible en comparación a *Saccharomyces cerevisiae* (Zott *et al.*, 2008). Hansen *et al.*, (2001), demostraron que en un medio con baja concentración de oxígeno disponible (0,09 mg/L) las especies *Kloeckera thermotolerans* y *Torulaspora delbrueckii* comienzan a desaparecer al segundo día de iniciada la fermentación alcohólica, a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, que no parece verse afectada por esta baja disponibilidad de oxígeno.

Debido a todas estas limitantes, se considera que las levaduras no-*Saccharomyces* no tienen la capacidad de llevar a cabo por si solas la fermentación alcohólica (Fleet, 2003). Sin embargo, debido a su potencial influencia sobre la generación de compuestos aromáticos deseables, se han realizado múltiples estudios tendientes a evaluar la posibilidad de utilizarlas en conjunto con *Saccharomyces cerevisiae*, y de esta manera obtener las mejores características de cada especie.

Identificación de cepas de levaduras no-*Saccharomyces*

Debido a la importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* en el perfil aromático del vino, se han desarrollado métodos para identificar especies y cepas con el fin de caracterizar la diversidad de las levaduras que participan durante el proceso fermentativo (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Los primeros métodos utilizados para identificar especies de levaduras corresponden a aquellos que se basan en las características morfológicas y fisiológicas de estos microorganismos (Loureiro y Malfeito Ferreira, 2003). Estos métodos presentan grandes desventajas, ya que se deben realizar entre 50 a 100 pruebas para obtener un resultado confiable, lo cual requiere de tiempo. Además, es un trabajo complejo y que a menudo conduce a resultados erróneos (Granchi *et al.*, 1999; Sabate *et al.*, 2002).

Posteriormente, se han desarrollado otros métodos, también dependientes de la fisiología de las levaduras, entre los cuales se encuentran los análisis de proteínas totales, ácidos grasos de cadena larga y perfiles isoenzimáticos (Fernández *et al.*, 2011). Sin embargo, estas técnicas son de baja reproducibilidad, debido a que dependen del estado fisiológico de las levaduras, el cual puede verse alterado según las condiciones del cultivo (Zott *et al.*, 2008).

En la actualidad, los avances en el campo de la biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas herramientas para la identificación de microorganismos, siendo los análisis basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los que han demostrado ser los más eficaces para identificar especies y cepas de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (Orberá, 2004).

Numerosos estudios demuestran que la utilización del PCR-RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción), para el análisis de la región ARNr 5,8S-ITS, es una herramienta útil para identificar géneros y especies de levaduras no-*Saccharomyces* (Clemente-Jiménez *et al.*, 2004). Esta técnica se basa en el principio que las levaduras comúnmente encontradas durante el proceso de fermentación alcohólica pueden ser identificadas por el tamaño y polimorfismo de su región ITS1-5,8S-ITS2 (Sipiczki, 2004). De esta manera, la utilización de esta herramienta ha demostrado ser apropiada para la rápida identificación de especies de levaduras no-*Saccharomyces*.

En cuanto a la identificación de levaduras no-*Saccharomyces* a nivel de cepas, diversos estudios indican que el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLP-mtADN) es uno de los métodos más eficientes para identificar diferentes cepas dentro de una misma especie de levaduras (Sabate *et al.*, 2001). Se trata de un sistema rápido, confiable y económico, el cual se fundamenta en la gran variabilidad que presentan las levaduras con respecto al tamaño del ADN mitocondrial, lo cual permite diferenciar las distintas cepas dentro de una misma especie (Rodríguez *et al.*, 2011).

Otra técnica menos utilizada para identificar cepas de levaduras no-*Saccharomyces* es el análisis del polimorfismo del ADN aleatoriamente amplificado (RAPD), el cual consiste en

la amplificación del ADN mediante la utilización de PCR (Tofalo *et al.*, 2012). En este proceso, el partidor utilizado se une a sitios inespecíficos del genoma, lo cual permite amplificar sectores polimórficos del ADN (Capece *et al.*, 2003). Los fragmentos de ADN amplificados, observados por medio de electroforesis, presentan diversos pesos moleculares y son característicos de cada cepa de levadura (Orberá, 2004; Fernández-Espinar *et al.*, 2011).

En la actualidad, la identificación de levaduras no-*Saccharomyces* por medio de análisis morfológicos o fisiológicos se encuentra en desuso (Fernández-Espinar *et al.*, 2011). Esto, debido al tiempo prolongado que se requiere para su ejecución, además de presentar resultados poco confiables (Orberá, 2004). Por el contrario, diversos estudios demuestran que el método más favorable para realizar identificación de géneros y especies corresponde a la amplificación de fragmentos del ADN ribosomal mediante PCR-RFLP debido a su rapidez y confiabilidad (Clemente-Jiménez *et al.*, 2004). A nivel de cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, se ha descrito que la utilización de RFLP-mtADN es la más eficiente, debido a que permite identificar en un breve periodo de tiempo un mayor número de cepas que cualquier otro método, además de ser confiable, simple y económico, ya que no requiere material complejo ni personal especializado (Torija., 2002; Rodríguez *et al.*, 2011).

Levaduras no-*Saccharomyces* que formen compuestos que modifiquen el aroma de los vinos

Hasta hace un tiempo, se consideraba que la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* durante el proceso de vinificación representaba una amenaza para la calidad del vino a producir y eran comúnmente denominadas “levaduras alterantes”. Esto, debido a que eran asociadas a una alta producción de ácido acético, formación de velo, síntesis de acetaldehído, acetoína y acetato de etilo, lo cual produce un aumento en la acidez volátil del vino y altera sus características sensoriales de forma negativa (Domizio *et al.*, 2011). Sin embargo, durante los últimos años diversos estudios han llevado a cabo una nueva evaluación de los potenciales beneficios que estas levaduras podrían otorgar al vino, principalmente en lo que respecta a la generación de compuestos aromáticos agradables (Fleet, 2008). Se ha demostrado que las características de las levaduras, tanto favorables como desfavorables, son altamente dependientes de las cepas. Estudios realizados sobre levaduras no-*Saccharomyces* son conducentes a la selección de cepas que confieran características aromáticas positivas al vino y minimicen las negativas (Lambrechts y Pretorius, 2000; Ciani *et al.*, 2009; Viana, 2011).

Los géneros de levaduras no-*Saccharomyces* comúnmente encontrados durante el proceso de fermentación alcohólica corresponden a: *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces* y *Pichia* (Fleet., 2008). Estas levaduras se han estudiado con el propósito de utilizarlas en conjunto con *Saccharomyces cerevisiae*, ya sea en cultivos

mixtos o secuenciales, debido a su potencial de influir de manera positiva en el perfil aromático del vino gracias a la capacidad de producir compuestos aromáticos, principalmente ésteres, en concentraciones superiores a *Saccharomyces cerevisiae* (Moreira *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2011).

Dentro del grupo de levaduras no-*Saccharomyces* que participan durante la fermentación alcohólica, el género de levaduras apiculadas *Hanseniaspora* y su forma anamórfica *Kloeckera*, son quienes dominan las primeras etapas de la fermentación alcohólica (Fleet, 2008). Durante el tiempo que se encuentran presentes en el proceso de vinificación (4-5 días), estas levaduras son capaces de utilizar los nutrientes que se encuentran en el medio y formar compuestos aromáticos, que serán parte de la composición final del vino (Viana, 2011). Diversos estudios, han demostrado que cepas de *Hanseniaspora guilliermondii* tienen la capacidad de producir altas concentraciones de ésteres de acetato en el vino, particularmente acetato de 2-feniletilo (aroma floral) y acetato de isoamilo, descriptor banana, afrutado (Rojas *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2010). La utilización de esta cepa en conjunto con *Saccharomyces cerevisiae*, ha dado origen a altas concentraciones de 2-feniletanol, además de poseer la capacidad de esterificar diversos alcoholes, tales como, etanol, geraniol, 2-feniletanol y alcohol isoamílico, mejorando notablemente el perfil aromático del vino (Moreira *et al.*, 2005).

En la Figura 3, se observa la producción de 2-feniletanol y acetato de 2-feniletilo por parte de cepas seleccionadas de *Hanseniaspora guilliermondii* y *Hanseniaspora uvarum* durante el proceso de fermentación alcohólica llevado a cabo en condiciones de laboratorio y en un medio comercial. Tanto en cultivos puros como en mixtos, junto a *Saccharomyces cerevisiae*, se observan diferencias significativas en la producción de 2-feniletanol y acetato de 2-feniletilo. *Hanseniaspora guilliermondii* presentó una mayor producción de estos compuestos, tanto en cultivos puros como mixtos (Moreira *et al.*, 2005).

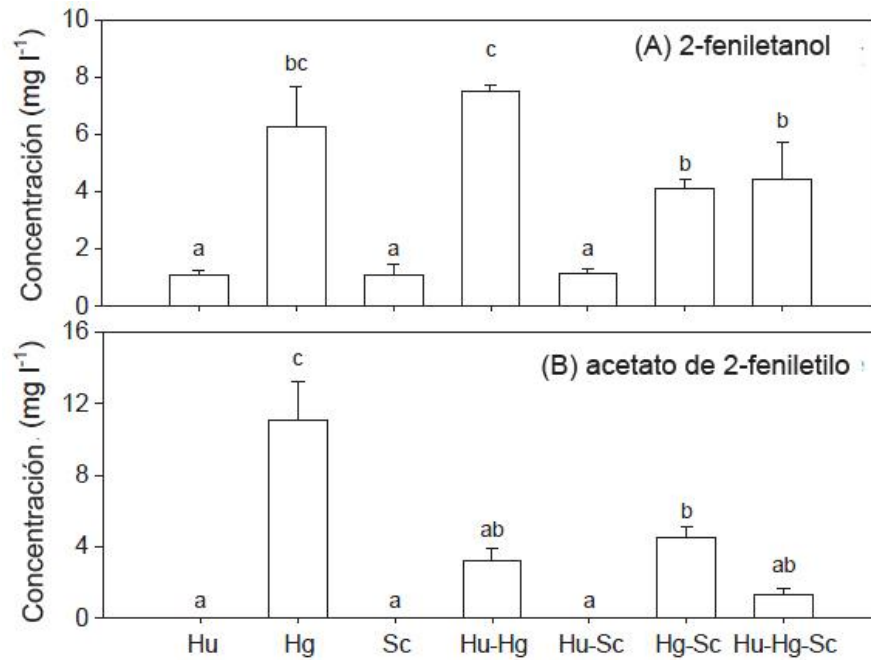


Figura 3. Concentración de (A) 2-feniletanol y (B) acetato de 2-feniletilo en cultivos puros y mixtos de *Hanseniaspora uvarum* (Hu), *Hanseniaspora guilliermondii* (Hg) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Los valores que no comparten la misma letra presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey. Moreira *et al.*, 2005

El género *Candida* también se encuentra presente de forma importante durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica (Fleet, 2003). Se ha demostrado que en cultivos secuenciales con *Saccharomyces cerevisiae*, las cepas de *Candida stellata* aumentan la concentración de ésteres en el vino, particularmente acetato de 2-feniletilo (Soden *et al.*, 2000). Además, se ha reportado que cepas de *Candida guilliermondii* y *Candida pulcherrima* son buenas productoras de enzimas β -glucosidasas, aumentando el aroma varietal del vino, debido al incremento de la concentración de terpenos tales como, nerol (aromas florales), α -terpineol (coníferas) y geraniol, descriptores rosas y miel (Rodríguez *et al.*, 2010). De esta manera, se ha demostrado que realizando una apropiada selección de cepas y escogiendo una adecuada forma de inoculación en conjunto con *Saccharomyces cerevisiae*, cepas seleccionadas de especies del género *Candida* pueden mejorar ostensiblemente el perfil aromático del vino, en especial los aromas florales y afrutados (Zohre y Erten, 2002).

Las levaduras no-*Saccharomyces* también se han estudiado para evaluar su utilización en la fermentación de mostos con altos contenidos de azúcar (350-400 g/L) (Magyar y Tóth, 2011). Generalmente, los vinos dulces provenientes de mostos de uva botritizada, pudrición noble, presentan una alta acidez volátil, a veces superior a 1,8 g·L⁻¹ expresado en ácido acético (Sipiczki, 2004). La principal responsable de esta alza de acidez volátil, es la especie *Saccharomyces cerevisiae*, esto se debe a la respuesta al estrés osmótico de la

célula, producido por la alta concentración de azúcar, generando altas cantidades de ácido acético (Viana, 2011).

Bajo estas condiciones, se han utilizado cepas de *Torulaspota delbrueckii*, las cuales se caracterizan por producir bajas cantidades de acetaldehído, acetoina, acetato de etilo y ácido acético (Renault *et al.*, 2009). Estas levaduras, producen estos compuestos en bajas concentraciones y de manera constante durante la fermentación alcohólica. A diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual produce cerca del 35% de la acidez volátil durante las primeras etapas del proceso fermentativo, bajo condiciones de estrés osmótico (Fleet, 2008). Es por esto, que se ha estudiado la potencial utilización de cepas de *Torulaspota delbrueckii* en cultivos mixtos junto a *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados obtenidos demuestran que la inoculación mixta reduce alrededor de 55% la acidez volátil en vinos dulces (Bely *et al.*, 2008).

El género *Kluyveromyces* también participa del proceso de fermentación alcohólica. Se caracteriza principalmente por sintetizar ácido láctico, lo cual repercute en un aumento de la acidez total y disminución del pH del vino (Comitini *et al.*, 2011). Sin embargo, también pueden intervenir directamente en el aroma del vino (Fleet, 2008). Se ha demostrado que cepas de *Kluyveromyces thermotolerans*, en inoculación mixta con *Saccharomyces cerevisiae*, disminuyen la acidez volátil y aumentan significativamente la concentración de 2-feniletanol. Gobbi *et al.*, 2013, demostraron que un vino del cultivar Sangiovese inoculado tanto de forma secuencial como mixta, con *Kluyveromyces thermotolerans* y *Saccharomyces cerevisiae*, obtuvo un incremento de los aromas especiados y un aumento en el contenido de glicerol en comparación a un vino de las mismas características inoculado solamente con *Saccharomyces cerevisiae*.

Por otra parte, el género *Pichia* ha sido estudiado, en relación a su capacidad de producir tioles volátiles como el 3-mercaptohexil-acetato y 3-mercaptohexanol, compuestos que contribuyen al aroma varietal en Sauvignon Blanc y cuyos descriptores se asocian a grosellas, maracuyá y guayaba (Coetzee y du Toit, 2012). Se ha demostrado que la concentración de estos compuestos, aumenta cuando se inoculan cepas de *Pichia kluyveri* en conjunto con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Anfang *et al.*, 2009). El umbral de detección del 3-mercaptohexil-acetato y 3-mercaptohexanol es tan sólo de 4,2 y 60 ng·L⁻¹ respectivamente, lo cual los convierte en uno de los compuestos aromáticos más potentes en Sauvignon Blanc y su concentración en vinos puede ir de 0 a 60 ng·L⁻¹ (Coetzee y du Toit, 2012).

Además, se ha investigado la síntesis de enzimas β -glucosidasas en cepas de *Pichia anomala*, obteniéndose como resultado que las enzimas sintetizadas son inhibidas completamente en presencia de concentraciones de glucosa de 20% p/v. Por el contrario, la enzima presenta su actividad máxima a concentraciones de etanol de 12% v/v (Swangkeaw *et al.*, 2011). Debido a esto, las enzimas producidas por *Pichia anomala* podrían ser utilizadas en etapas finales de la fermentación alcohólica, en momentos en que la concentración de azúcares es mínima y el contenido de etanol no supere el 15% v/v.

Estos resultados ponen de manifiesto que ciertas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* pueden influir de manera positiva en el perfil aromático del vino y es posible utilizarlas en inoculaciones mixtas y secuenciales dependiendo de las características del mosto o del vino que se pretenda producir.

Ejemplos de cultivos iniciadores mixtos comerciales e inoculación secuencial.

Una forma de aprovechar los beneficios que aporta el realizar la fermentación alcohólica en presencia de levaduras no-*Saccharomyces*, es el empleo de inóculos comerciales, ya sea mediante cultivos iniciadores mixtos o en inoculación secuencial (Raynal *et al.*, 2011). Es así como ya se comercializan diversos cultivos iniciadores mixtos y secuenciales que aseguran obtener una mayor concentración de compuestos aromáticos agradables sin el riesgo de una fermentación detenida o de la aparición de compuestos indeseables (Viana *et al.*, 2011b).

La inoculación secuencial de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, corresponde a la inoculación del mosto con levaduras seleccionadas, aplicadas en diferentes momentos del proceso fermentativo (Gobbi *et al.*, 2013). Generalmente, se realiza la inoculación de las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* en primer lugar, con el objetivo que éstas colonicen rápidamente el medio y así logren el efecto esperado, la liberación de compuestos aromáticos deseables. Posteriormente, se realiza la inoculación de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, de esta manera se evita que las levaduras no-*Saccharomyces* sean inhibidas y se asegura que la fermentación alcohólica se realice completamente (Viana *et al.*, 2011a). La inoculación secuencial se realiza con el objetivo de intentar reproducir la sucesión de especies de levaduras que intervienen durante la fermentación alcohólica, pero con la ventaja de llevarlo a cabo de forma controlada y segura, obteniendo de esta forma las características sensoriales que se buscan, sin el riesgo de paradas de fermentación o aparición de compuestos alterantes (Clemente-Jiménez *et al.*, 2005).

Un ejemplo de inóculo comercial, utilizado en inoculación secuencial es la cepa *Torulaspora delbrueckii* 291 Level 2TD, comercializada por Lallemand y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Para esto, Raynal *et al.*, (2011) llevaron a cabo un estudio, el cual concluyó que utilizando inoculación secuencial, con la presencia de la cepa *Torulaspora delbrueckii* 291 se puede obtener un perfil aromático más complejo. Posteriormente, se evaluaron distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a fin de obtener una que fuese compatible con la cepa *Torulaspora delbrueckii* 291 y así obtener un vino con una complejidad aromática superior a los obtenidos mediante el método de inoculación tradicional de un monocultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. Una de las ventajas de la utilización de la cepa *Torulaspora delbrueckii* 291, junto a *Saccharomyces cerevisiae* tiene que ver con la disminución de la acidez volátil final del vino, debido a la modulación que realiza *Torulaspora delbrueckii*. En diversos ensayos realizados, a nivel de laboratorio e industrial, se observó una disminución significativa de la acidez volátil de los vinos, lo cual

puede servir como herramienta para ambientes dónde existan fermentaciones de mostos provenientes de vendimias tardías con altos contenidos de azúcar (Raynal *et al.*, 2011).

En cuanto a la presencia de compuestos aromáticos, la inoculación secuencial, aumentó la concentración de ésteres y terpenos en el vino en comparación a una inoculación clásica de *Saccharomyces cerevisiae*. Los vinos resultantes fueron sometidos a la evaluación de un panel sensorial y se obtuvo vinos más complejos e intensos aromáticamente, comparado con el vino obtenido mediante la inoculación tradicional (Raynal *et al.*, 2011).

En contraste, los cultivos mixtos corresponden a la inoculación conjunta de cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, las cuales se encuentran presentes en el mosto desde el inicio de la fermentación alcohólica (Escalante e Ibarra, 2007). En la actualidad, a pesar de no ser común su presencia en el mercado, existen cultivos mixtos de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans*, comercializados por Chr. Hansen, (no se encuentran disponibles en Chile), entre los que destacan (Viniflora® Harmony.nsac y Viniflora® MELODY.nsac). Estos inóculos mixtos se diferencian en el porcentaje de *Saccharomyces cerevisiae* que contienen (80% y 60% respectivamente). También, es posible escoger una mezcla que contenga solamente 2 cepas de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces thermotolerans* (Viniflora® SYMPHONY.nsac y Viniflora® RHYTHM.nsac) variando ambas en el porcentaje inicial de *Saccharomyces cerevisiae* que contiene la mezcla, al igual que en el caso anterior de un 80% y 60%, respectivamente (Viana, 2011).

La inoculación de estos cultivos mixtos se realiza tanto para vinos blancos (Chardonnay, Pinot blanc, Pinot gris, Riesling), como para vinos tintos (Cabernet Sauvignon, Pinot noir, Syrah, Merlot). Esta combinación de cepas y especies de levaduras ha sido realizada con el objetivo de mejorar las características organolépticas del vino. En el caso de los vinos blancos se observaría un aumento en los aromas tropicales y florales, y en el caso de los vinos tintos se obtendría una mayor complejidad (Jolly *et al.*, 2006).

Lai (2010), realizó un estudio de comparación entre vinos Chardonnay, fermentado con una mezcla comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans*, Viniflora® Harmony.nsac y vinos fermentados sólo con *Saccharomyces cerevisiae* (control). El vino resultante del primer caso, presentó un perfil aromático más agradable y complejo, destacándose una mayor componente frutal, así como también una mayor intensidad en los descriptores mango, manzana y durazno, y un menor amargor que los vinos control (Figura 4).

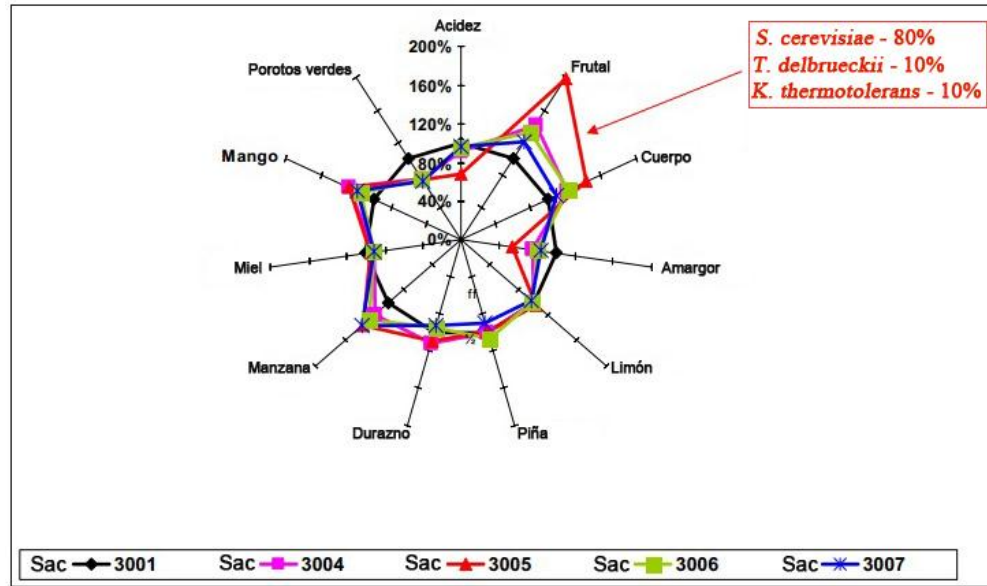


Figura 4. Gráfico de red que representa descriptores aromáticos de vinos fermentados con inóculos puros de *Saccharomyces cerevisiae* y mixtos, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans* (Lai, 2010).

Si bien, estos cultivos mixtos no se encuentran disponibles en Chile, de igual forma constituyen un avance para la industria enológica, ya que demuestran que es posible su utilización a nivel industrial, lo cual reafirma lo expuesto en relación al aporte de las levaduras no-*Saccharomyces* al perfil aromático del vino.

CONCLUSIONES

Las levaduras no-*Saccharomyces* constituyen una alternativa válida para ser utilizadas durante el proceso de vinificación. Se ha demostrado, a través de numerosas investigaciones, que una correcta selección de cepas no-*Saccharomyces* puede contribuir positivamente al perfil aromático del vino.

La oferta de inóculos de levaduras no-*Saccharomyces* en el mercado, aún es escasa. Si bien, la información existente es extensa, la mayoría de las investigaciones se han realizado a nivel de laboratorio. Debido a esto, se debiese avanzar en la aplicación de este conocimiento a nivel industrial. Resuelto este punto, la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* por parte de la industria enológica se vislumbra como una herramienta útil para obtener vinos aromáticamente más complejos.

En base a las evidencias presentadas, se observa que la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* es un tema que concita el interés científico, en respuesta a una necesidad del consumidor y por lo tanto, de la industria enológica. Por consiguiente, y conforme a lo revisado en este trabajo de investigación bibliográfica, se puede pronosticar que la utilización de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* será cada vez más común en el corto o mediano plazo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, F.; R. Peinado; C. Millán; J. Ortega and J. Mauricio. 2006. Relationship between ethanol tolerance. H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology* 110: 34–42.
- Andorra, I.; M. Berradre; A. Mas; B. Esteve-Zarzoso and J. Guillamón. 2012. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT - Food Science and Technology* 49: 8-13.
- Anfang, N.; M. Brajkovich and M. Goddard. 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 1–8.
- Aranda, A.; E. Matallana y M. del Olmo. 2005. Levaduras *Saccharomyces*. Levaduras de primera fermentación. pp 19-50. En: *Microbiología del vino*. Ediciones Antonio Madrid Vicente. Madrid, España. 398p.
- Arévalo, M. 2005. Estudio de la actividad β -glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología. Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Castilla-La Mancha. Ciudad Real, España. 158h.
- Arévalo, M.; J. Úbeda; R. Cordero and A. Brione. 2006. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 229-234.
- Arneborg, N.; L. Jespersen and M. Jakobsen. 2000. Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygoaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. *Archives of Microbiology* 174: 125-128.
- Arroyo-López, F.; S. Orlic; A. Querol and E. Barrio. 2009. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrids. *International Journal of Food Microbiology* 131: 120–127.
- Baleiras, M.; R.G. Reizinho; and F.L Duarte. 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non- *Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 102: 49-56.
- Barata, A.; M. Malfeito-Ferreira and V. Loureiro. 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153: 243-259.
- Barrajón, N. 2009. Competencia entre levaduras espontáneas y comerciales en vinificación: estudio de posibles factores implicados. Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Castilla-La Mancha. Ciudad Real, España. 146h.

- Bell, S and P. Henschke. 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 242–295.
- Beltrán, G.; M.J. Torija; M. Novo; N. Ferrer; M. Poblet; J.M Guillamón. *et al.* 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 287–293.
- Beltrán, G.; M. Torija; M. Novo; N. Ferrer; M. Poblet; J. Guillamón. *et al.* 2008. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology* 121: 169–177.
- Bely, M.; P. Stoeckle; I. Masneuf-Pomarède and D. Dubourdieu. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122: 312–320.
- Cabrita, MJ.; A. Freitas; O. Laureano; D. Borsa and R. Di Stefano. 2007. Aroma compounds in varietal wines from Alentejo, Portugal. *Journal of Food Composition and Analysis* 20:375–390.
- Capece, A.; G. Salzano and P. Romano. 2003. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *International Journal of Food Microbiology* 84: 33-39.
- Cardona, F.; P. Carrasco; J. Pérez-Ortín; M. del Olmo and A. Aranda. 2007. A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 114: 83–91.
- Carrau, F.; K. Medina; L. Farina; E. Boido and E. Dellacassa. 2010. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *International Journal of Food Microbiology* 143: 81-85.
- Catania, C y S. Avagnina. 2007. Los estímulos dulces del vino. En: Curso superior de degustación de vinos. Material de curso. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza. INTA. Sección 13.
- Charoenchai, C.; G. Fleet; P. Henschke and B. Todd. 1998. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 283–288.
- Ciani, M.; F. Comitini; I. Mannazzu and P. Domizio. 2009. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10: 123-133.
- Clemente-Jiménez, J.; M. Mingorance-Cazorla; L. Martínez; S. Heras-Vázquez and F. Rodríguez-Vico. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21: 149–155.

- Clemente-Jimenez, J.; M. Mingorance-Cazorla and S. Martínez. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 98: 301-308.
- Coetzee, C and W. du Toit. 2012. A comprehensive review on Sauvignon Blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International* 47: 287–298.
- Comitini, F.; M. Gobbi.; P. Domizio.; C. Romani and M. Ciani. 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28: 873-882.
- Cordero-Otero, R.; R. Ubeda-Iranzo; J. Briones-Pérez; A. Potgieter; M. Pretorius and P. Rensburg. 2003. Characterization of the beta-glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science* 68: 2564–2569.
- Csoma, H and M. Sipiczki. 2008. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 8: 328-336.
- Domizio, P.; C. Romani; L. Lencioni; F. Comitini; M. Gobbi; I. Mannazzu *et al.* 2011. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 147: 170-180.
- Erasmus, D.; G. van der Merwe and H. van Vuuren. 2003. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research* 4: 375–399.
- Escalante, P y V. Ibarra. 2007. Los Cultivos Mixtos y las Fermentaciones Alcohólicas. *Revista Biotecnología* Vol.11 N°3: 28-33.
- Fernández-Espinar, M.; S. Llopis; A. Querol and E. Barrio. Molecular Identification and Characterization of Wine Yeasts. 2011 In: A, Carrascosa.; R. Muñoz and R. Gonzalez (Eds). *Molecular Wine Microbiology*, 1st ed. Elsevier, Academic Press, London, UK, 111-141.
- Fleet, G. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86: 11–22.
- Fleet, G. 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* 8: 979–995.
- Folch, J.; A. Garay-Arroyo; F. Lledías y A. Covarrubias. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 46: 24 – 46.
- Francis, I and J. Newton. 2005. Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 114–126.

- Fugelsang, K and G. Edwards. 2007. Wine microbiology: Practical applications and procedures. Second edition. New York, USA: The Chapman and Hall Enology Library 408p.
- Gobbi, M.; F. Comitini; P. Domizio; C. Romani; L. Lencioni; I. Mannazzu. *et al.* 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology* 33: 271-281.
- González-Pombo, P.; L. Fariña; F. Carrau; F. Batista-Viera and B. Brena. 2011. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry* 46: 385–389.
- Granchi, L.; M. Bosco; A. Messini and M. Vincenzini. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*. 87: 949–956.
- Guldfeldt, L and N. Arneborg. 1998. Measurement of the effects of acetic acid and extracellular pH on intracellular pH of non-fermenting, individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 530-534.
- Hansen, E.; P. Nissen; P. Sommer; J. Nielsen and N. Arneborg. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentation of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 91: 541– 547.
- Hernández-Orte, P.; M. Cersosimo; N. Loscos; J. Cachos and V. Ferreira. 2008. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry* 107: 1064-1077.
- Jiménez, E.; A. Zuzuarregui; M. Gomar-Alba; D. Gutiérrez; C. Gil and M. del Olmo. 2011. Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. *International Journal of Food Microbiology* 145: 211-220.
- Jolly, N.; O. Augustyn and I.S. Pretorius. 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal for Enology and Viticulture* 27: 15–39.
- Kitagaki, H.; Y. Araki; K. Funato and H. Shinori. 2007. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Letters* 581: 2935-2942.
- Lambrechts, M.G and I.S. Pretorius. 2000. Yeast and its importance to wine aroma. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21: 97–129.
- Lai, Q. 2010. Utilisation de levures non *Saccharomyces* en œnologie: études des interactions entre *Torulasporea delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. Tesis Doctoral. Universidad de Toulouse. Toulouse, Francia. 180h.

- Lei, J.; X. Zhao; X. Ge and F. Bai. 2007. Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. *Journal of Biotechnology* 131: 270–275.
- Loureiro, V and M. Malfeito-Ferreira. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86: 23-50.
- Lucero, P.; E. Peñalver; E. Moreno and R. Lagunas. 2000. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4456–4461.
- Magyar, I and T. Tóth. 2011. Comparative evaluation of some enological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28: 94-100.
- Manzanares, P y S. Vallés. 2005. Levaduras No-*Saccharomyces* pp. 114-142. *En: Microbiología del vino*. Ediciones Antonio Madrid Vicente. Madrid, España. 398p.
- Masneuf-Pomarède, I.; C. Mansour; M. Murat; T. Tominaga and D. Dubourdieu. 2006. Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon Blanc wines. *International Journal of Food Microbiology* 108: 385–390.
- Mateos, J.; F. Pérez-Nevaldo and M. Ramírez. 2006. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 151–157.
- Mendes, A.; M. Clímaco and A. Mendes-Faia. 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components—a preliminary study. *Journal of Applied Microbiology* 91: 67–71.
- Mills, D.; E. Johannsen and L. Cocolin. 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4884–4893.
- Moreira, N.; F. Mendes; T. Hogg and I. Vasconcelos. 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 103: 285-294.
- Moreira, N.; F. Mendes; P. Guedes de Pinho; T. Hogg and I. Vasconcelos. 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology* 124: 231–238.
- Moreira, N.; C. Pina; F. Mendez; J. Couto; T. Hogg and I. Vasconcelos. 2011. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control* 22: 662-667.

- Ocón, E.; A. Gutiérrez; P. Garijo; R. López and P. Santamaría. 2010. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology* 27: 1023-1027.
- Orberá, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21: 15–9.
- Peinado, R.; J. Moreno.; J. Bueno.; J. Moreno and J.C Mauricio. 2004. Comparative study of aromatic series in two young white wines subjected to prefermentative cryomaceration. *Food Chemistry*. 84: 585-90.
- Pina, C.; C. Santos; J. Couto and T. Hogg. 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-influence of different culture conditions. *Food Microbiology* 21: 439–447.
- Plata, C.; C. Millán.; J.C. Mauricio and J.M. Ortega. 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology* 20: 217– 224.
- Querol, A.; M. Fernández; M. del Olmo and E. Barrio. 2003. Adaptative evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology* 86: 3–10.
- Rantsiou, K.; P. Dolci; S. Giacosa; F. Torchio; R. Tofalo; S. Torriani *et al.* 2012. *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1987-1994.
- Raynal, C.; F. Wardrop; P. Languet; J. Heras; A. Dummont y A. Ortiz. 2011. Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-*Saccharomyces* de una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una herramienta innovadora para el enólogo. *Alimentaria* 428: 83-92.
- Regodón, J.; F. Pérez-Nevado and M. Fernandez. 2006. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 151–157.
- Renault, P.; C. Miot-Sertier; P. Marullo; P. Hernández-Orte; L. Lagarrigue; A. Lonvaud-Funel and M. Bely. 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 134: 201–210.
- Rodríguez, M.; C. Lopes.; R. Barbagelata.; N. Barda and A. Caballero. 2010. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *International Journal of Food Microbiology* 138: 19-25.
- Rodríguez, M.; J. Infante; M. Molina; L. Rebordinos and J. Cantoral. 2011. Using RFLP-mtDNA for the rapid monitoring of the dominant inoculated yeast strain in industrial wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 138: 19-25.

- Rojas, V.; J. Gil; F. Piñaga and P. Manzanares. 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 70: 283–289.
- Rojas, V.; J. Gil; F. Piñaga and P. Manzanares. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 86:181-188.
- Sabate, J.; J. Cano; B. Esteve-Zarzoso and J. Guillamón. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes. *Microbiological Research* 157:1–8.
- Saerens, S.; F. Delvaux; K. Verstrepen; P. Van Dijck; J. Thevelein and F. Delvaux. 2008. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 454–461.
- Saerens, S.; F. Delvaux; K. Verstrepen and J. Thevelein. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology* 3:165-177.
- Saerens, S.; F. Delvaux; K. Verstrepen and J. Thevelein. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology* 3: 165-177.
- Saerens, S.; F. Delvaux; K. Verstrepen; P. Van Dijck; J. Thevelein and F. Delvaux. 2008. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 454–461.
- Salmon, J. 2006. Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: practical implications. *LWT-Food Science and Technology* 39: 959–965.
- Sipiczki, M. 2004. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *Journal of Basic Microbiology* 44:471–479.
- Soden, A.; I. Francis.; H. Oakey and P. Henschke. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 21–30.
- Strauss, M.; N. Jolly; M.Lambrechts and P. Van Rensburg. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 91: 182–190.
- Sumby, K.; P. Grbin and V. Jiranek. 2010. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*. 121: 1-16.
- Swangkeaw, J.; V. Sukanda; C. Butzuke and K. Vichitphan. 2011. Characterization of β -glucosidase from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing

capability in juice and wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 423–430.

Swiegers, JH.; EJ. Bartowsky; PA. Henschke and IS. Pretorius. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11:139–173.

Swiegers, J and I. Pretorius. 2005. Yeast Modulation of Wine Flavor. *Advances in Applied Microbiology* 57: 131-175.

Taillandier, P.; F. Portugal; A. Fuster and P. Strehaiano. 2007. Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology* 24: 95–100.

Tofalo, R.; M. Schirone; S. Torriani; K. Rantsiou; L. Cocolin; G. Perpetuini *et al.* 2012. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiology*. 29: 18 –26.

Toit, W.; J. Marais; I. Pretorius and M. Toit. 2006. Oxygen in must and wine – A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 27: 76–94.

Torija, M. 2002. Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Tesis Doctoral. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, España. 260h.

Torija, M.; N. Rozés; N. Poblet; J.M. Guillamón and A. Mas. 2002. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 80: 47– 53.

Torija, M.; G. Beltran; M. Novo; M. Poblet; J.M. Guillamón; A. Mas *et al.* 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology* 85: 127–136.

Ugliano, M.; P. Henschke; M. Herderich; I. Pretorius. 2007. Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Wine Industry Journal* 22: 24-30.

Valdés, E.; M. Vilanova; E. Sabio and M.J. Benalte. 2011. Clarifying agents effect on the nitrogen composition in must and wine during fermentation. *Food Chemistry* 125: 430-437.

Van Rensburg, P and Pretorius, I.S. 2000. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21: 52–73.

Varela, C.; D. Torrea; S. Schmidt; C. Ancín and P. Henschke. 2012. Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry* 135: 2863-2871.

- Viana, F.; J. Gil; S. Genovés; S. Vallés and P. Manzanares. 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25: 778–785.
- Viana, F. 2011. Levaduras no-*Saccharomyces* para modular el aroma secundario de los vinos: Incremento del acetato de 2-feniletilo mediante cultivos iniciadores mixtos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 206h.
- Viana, F.; C. Belloch; F. Vallés and P. Manzanares. 2011a. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*–*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production." *International Journal of Food Microbiology* 151: 235-240.
- Viana, F.; P. Taillandier; S. Vallés; P. Strehaiano and P. Manzanares. 2011b. 2-Phenylethyl Acetate Formation by Immobilized Cells of *Hanseniaspora vineae* in Sequential Mixed Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 122-126.
- Vilanova, M.; M. Ugliano; C. Varela; T. Siebert; I. Pretorius and P. Henschke. 2007. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 145–157.
- Villena, M.; J. Iranzo and A. Pérez. 2007. B-Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 420–425.
- You, K.; C. Rosenfield and D. Knipple. 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1499–1503.
- Zohre, D and H. Erten. 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry* 38: 319 – 324.
- Zott, K.; C. Miot-Sertier; O. Claisse; A. Lonvaud-Funel and I. Masneuf-Pomarede. 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125: 197–203.