

## EVALUACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DE VINO BLANCO PRODUCIDO CON CEPAS RESULTANTES DE LA FUSIÓN DE PROTOPLASTOS DE LEVADURAS

**Dra. María Berradre<sup>3</sup>, Dra. Ana Cáceres<sup>2</sup>, MSc. Zulay Mármol<sup>1</sup>, MSc. Johanna Raga<sup>1</sup>, MSc. Marisela Rincón<sup>1</sup>, Dra. Karelen Araujo<sup>1\*</sup>,**

<sup>1</sup>Laboratorio de Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales. Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Venezuela.

<sup>2</sup>Laboratorio de Desarrollo de Métodos de Análisis. Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Venezuela.

<sup>3</sup>Laboratorio de Alimentos. Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Venezuela.

\*Autor para la correspondencia. E-mail: [karelenaraujo@gmail.com](mailto:karelenaraujo@gmail.com)

Recibido: 06-02-2019 / Aceptado: 20-05-2019 / Publicación: 30-05-2019

Editor Académico: Dra. María del Rosario Brunetto

### RESUMEN

El estudio de diferentes estrategias para conseguir mayor complejidad aromática a los vinos, es una inquietud constante dentro del campo de la enología debido a que el aroma es uno de los atributos más importantes implicados en la calidad del vino. El objetivo del presente trabajo es determinar el perfil aromático de vino blanco producido mediante fermentación alcohólica de la cepa híbrida SCHLUZ2014 resultante de la fusión intergénica de protoplastos de la levadura autóctona *Saccharomyces cerevisiae* SCVMLUZ 2008 y la levadura comercial *Hanseniaspora guilliermondii* CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) 11102. Se realizaron vinificaciones en blanco con mosto de uva de la variedad Malvasía, además se realizaron fermentaciones con las levaduras parentales por separado y con un cultivo mixto de éstas. Se midieron los compuestos volátiles mayoritarios originados en la etapa de fermentación: acetato de isoamilo, acetato de etilo, hexanoato de etilo, n-propanol, isobutanol, alcohol isoamílico, acetaldehído y diacetilo. El perfil aromático fue determinado utilizando la técnica de espacio de cabeza acoplada a un cromatógrafo de gases con detector FID y ECD. La levadura híbrida produjo cantidades aceptables de alcoholes superiores y de acetaldehído. El vino generado con ésta cepa presentó mayor cantidad de hexanoato de etilo que la levadura autóctona *S.cerevisiae*, *H.guilliermondii* y la mezcla de ambas, por lo que ésta levadura representa una alternativa para la elaboración de vinos blancos con aroma a fruta agradable y matices propios de la región zuliana.

**Palabras clave:** vino blanco, levadura híbrida, aroma, compuestos volátiles.

## EVALUATION OF THE AROMATIC PROFILE OF WHITE WINE PRODUCED WITH STRAINS RESULTING FROM THE FUSION OF YEAST PROTOPLASTS

## ABSTRACT

The study of different strategies to achieve greater aromatic intensity to wines, is a constant concern in the field of winemaking because the aroma is one of the most important attributes involved in the quality of wine. The aim of the present work is to determine the aromatic profile of white wine produced by alcoholic fermentation of the hybrid strain resulting from the intergenic fusion of protoplasts of the indigenous yeast *Saccharomyces cerevisiae* SCVMLUZ 2008 and the commercial yeast *Hanseniaspora guilliermondii* CECT (Spanish Collection of Type Crops) 11102. Fermentations of white wine were made with grape must of the variety Malvasía, besides making fermentations with the parental yeasts separately and with a mixed culture of these. The majority volatile compounds produced in the fermentation stage were measured: isoamyl acetate, ethyl acetate, ethyl hexanoate, n-propanol, isobutanol, isoamyl alcohol, acetaldehyde and diacetyl. The aromatic profile was used in the technique of coupled head space and gas chromatograph with FID and ECD detector. The hybrid yeast produces acceptable quantities of higher alcohols and acetaldehyde. The wine generated with this strain presented a greater amount of ethyl hexanoate than the indigenous yeast *S. cerevisiae*, *H. guilliermondii* and the mixture of both. The hybrid yeast represents an alternative for the production of white wines with pleasant fruit aroma and own nuances from the Zulia region.

**Key words:** white wine, hybrid yeast, aroma, GC headspace, volatile compounds.

## AVALIAÇÃO DO PERFIL AROMÁTICO DO VINHO BRANCO PRODUZIDO COM ESTIRPES RESULTANTES DA FUSÃO DE PROTOPLASTOS DE LEVEDURA

### RESUMO

O estudo de diferentes estratégias para alcançar uma maior intensidade aromática dos vinhos é uma preocupação constante no campo da vinificação, porque o aroma é um dos atributos mais importantes envolvidos na qualidade do vinho. O objetivo do presente trabalho é determinar o perfil aromático do vinho branco produzido pela fermentação alcoólica da cepa híbrida resultante da fusão intergênica dos protoplastos da levedura indígena *Saccharomyces cerevisiae* SCVMLUZ 2008 e da levedura comercial *Hanseniaspora guilliermondii* CECT (Coleção Espanhola de Culturas Tipo) 11102. As fermentações de vinho branco foram feitas com mosto de uva da variedade Malvasia, além de fermentações com as leveduras parentais separadamente e com uma cultura mista destas. Os principais compostos voláteis produzidos no estágio de fermentação foram medidos: acetato de isoamilo, acetato de etilo, hexanoato de etilo, n-propanol, isobutanol, álcool isoamilico, acetaldeído e diacetilo. O perfil aromático foi utilizado na técnica de cabeça acoplada e cromatógrafo a gás com detector FID e ECD. A levedura híbrida produz quantidades aceitáveis de álcoois superiores e acetaldeído. O vinho produzido com essa cepa mostrou maior quantidade de hexanoato de etilo do que a levedura indígena *S. cerevisiae*, *H. guilliermondii* e a mistura das duas, pelo qual, essa levedura representa uma alternativa para a produção de vinhos brancos com aroma a fruta agradável e nuances próprios da região de Zulia.

**Palavras chave:** vinho branco, levedura híbrida, aroma, Espaço livre do GC, compostos voláteis.

Citación sugerida: Araujo, K., Cáceres, A., Berradre, M., Mármol, Z., Raga, J., Rincón, M. (2019). Evaluación del perfil aromático de vino blanco producido con cepas resultantes de la fusión de protoplastos de levaduras. Revista Bases de la Ciencia, 4(2), 35-50. DOI: [https://doi.org/10.33936/rev\\_bas\\_de\\_la\\_ciencia.v4i2.1633](https://doi.org/10.33936/rev_bas_de_la_ciencia.v4i2.1633) Recuperado de: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/view/1633>

Orcid IDs:

Karelen Araujo: <https://orcid.org/0000-0002-6505-8348>

María del Rosario Brunetto: <https://orcid.org/0000-0003-3848-5130>

## 1. INTRODUCCIÓN

El aroma es uno de los aspectos más importantes en la calidad de los vinos ya que está relacionado directamente con la aceptación del consumidor. Varias familias de compuestos de naturaleza volátil son responsables del aroma de vinos blancos jóvenes, entre los que se incluyen: propanol, 2-metilpropanol, 3-metilbutanol, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, diacetilo, acetato de etilo y acetaldehído (Wu *et al.*, 2016, Vilanova y col., 2013). Estos compuestos representan más de la mitad de los volátiles totales, mientras que el resto lo constituyen compuestos volátiles minoritarios presentes en el vino en muy bajas cantidades, tales como: acetatos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, heterocíclicos, ésteres polares, lactonas, terpenos, compuestos azufrados y otros alcoholes superiores (Regodón *et al.*, 2006). Dentro de la diferenciación de los vinos, el aroma global es uno de los aspectos más importantes y se atribuye mayoritariamente a compuestos formadores de aroma sintetizados por las levaduras (Zhu *et al.*, 2016; Uber, 2005). Dado que las levaduras proporcionan mayores posibilidades para modular el aroma fermentativo, el control de la selección e inoculación de cepas con características específicas son herramientas a disposición para obtener vinos con perfiles aromáticos determinados (Viana, 2011).

Las levaduras vínicas son principalmente del género *Saccharomyces* (Boulton *et al.*, 1999). La especie predominante, *S. cerevisiae*, es seleccionada usualmente para la elaboración de vino debido a que fermenta de forma eficiente los azúcares y produce altos rendimientos de etanol. Sin embargo, el perfil aromático es bastante sencillo y común. Por otro lado, las cepas del género no-*Saccharomyces*, tales como: *Candida*, *Kloeckera* y *Hanseniaspora* poseen características enológicas que pueden influenciar sobre las propiedades sensoriales de los vinos, específicamente mejorando el perfil aromático. No obstante, estas cepas no fermentan eficientemente el mosto de la uva por lo que usualmente no son empleadas como cultivos iniciadores en las fermentaciones, pero pueden ser utilizadas exitosamente como una cepa parental en un proceso de modificación genética (Raineri & Pretorius, 2000; Mateo & Maicas, 2016).

La búsqueda de vinos diferenciados vinculados a la identidad regional ha demostrado ser una excelente estrategia comercial nacional e internacional para incrementar la demanda de vinos en un mercado actual tan competitivo. Las técnicas de modificación genética entre las que destacan experimentos de mutagénesis y selección, hibridación, electroporación, tratamiento con sales de litios y fusión de protoplastos (Pretorius, 2000 y Carrascosa *et al.*, 2005) ofrecen la posibilidad de obtener nuevas cepas de levadura que se adapten mejor a las diferentes regiones vitícolas, a las variedades de la uva, a las prácticas culturales y a las condiciones de vinificación (Van Rensburg, 2006).

En un trabajo previo realizado por los autores se obtuvo mediante la técnica de fusión de protoplastos una cepa híbrida intergénica con potencialidades enológicas (Araujo *et al.*, 2016). La levadura autóctona *Saccharomyces cerevisiae* SCVMLUZ 2008 aislada del mosto en fermentación espontánea de la variedad Malvasía de la cosecha del Centro de Desarrollo Vitícola Socialista de Mara y la levadura comercial *Hanseniaspora guilliermondii* CECT 11102 actuaron como cepas parentales para generar una nueva levadura híbrida (SCHLUZ2014) capaz no solo de terminar la fermentación consumiendo la mayoría de los azúcares, sino también de formar etanol a concentraciones deseadas y generar un perfil de compuestos volátiles con características propias y únicas de la región Zuliana.

El objetivo del presente trabajo es determinar el perfil aromático de vino blanco producido mediante fermentación alcohólica de la cepa híbrida resultante de la fusión intergénica de protoplastos de la levadura autóctona *Saccharomyces cerevisiae* SCVMLUZ 2008 y la levadura comercial *Hanseniaspora guilliermondii* CECT 1102.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del mosto

El mosto de uva de la Variedad Malvasía se obtuvo del Centro de Desarrollo Agrícola "El Condado" ubicado en el Municipio Mara. Se obtuvo luego del prensado de uvas correspondiente a la cosecha de mayo de 2013. El proceso de fermentación se llevó a cabo de acuerdo al proceso corriente de vinificación en blanco a una temperatura entre 17-18°C, con adición de carbonato de etilo al inicio de la fermentación. Se realizaron cuatro bioprocesos en botellones de 5L por duplicado con los siguientes inóculos: a) *S. cerevisiae* SCMCVLUZ 2008, b) *H. guilliermondii* CECT 11102, c) levadura obtenida en la fusión de protoplastos y d) mezcla de cultivos *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii* (10 % / 90%). El proceso de elaboración de vino blanco se realizó con algunas modificaciones de acuerdo al esquema planteado por Hidalgo, (2011).

### Compuestos volátiles

La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles por cromatografía gaseosa acoplada con la técnica de espacio de cabeza se obtuvo usando un estándar interno (acetato de hexilo). El equipo utilizado es un Thermo Scientific TRACE GC Ultra acoplado a un automuesteador de espacio de cabeza HS 2000, el cual permite que un grupo de muestras puedan ser analizadas bajo condiciones analíticas programadas en la secuencia de muestras.

Se emplearon compuestos estándares de referencia marca Sigma-Aldrich (USA) para los volátiles mayoritarios acetaldehído, propanol, 2-metilpropanol (isobutanol), 3-metilbutanol (alcohol isoamílico), acetato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo. Las muestras se fortificaron con el estándar interno acetato de hexilo ( $2,72 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Se llenaron los viales con 10 mL de muestra más 100  $\mu\text{L}$  del estándar interno. Se emplearon las siguientes condiciones cromatográficas: la incubadora se programó a  $60^{\circ}\text{C}$  con agitación constante durante 10 min. Se empleó la columna TRACE™ TR-Wax de polietilenglicol (30 m x 0,32 mm diámetro interno x 0,25  $\mu\text{m}$  espesor de la película Thermo Scientific, USA).

La temperatura del horno se programó de la siguiente forma; inicialmente  $100^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, luego se elevó a  $160^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $11^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ , manteniendo esta temperatura por 5,50 min. Posteriormente se incrementó a  $200^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $120^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ . La temperatura se mantuvo por 7 min. Se utilizó el detector de ionización de llama (FID). La temperatura del inyector se mantuvo a  $130^{\circ}\text{C}$  y la del detector FID a  $275^{\circ}\text{C}$ . Se empleó Helio 5.0 como gas de arrastre. Se utilizó el modo split para la inyección de 2  $\mu\text{L}$  a un flujo de  $12 \text{ mL.min}^{-1}$ .

Para la determinación de diacetilo se utilizó el estándar interno 1,3-dicloropropano ( $47,12 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Se llenaron los viales con 10 mL de muestra más 100  $\mu\text{L}$  del estándar interno. La incubadora se programó a  $40^{\circ}\text{C}$  con agitación constante durante 5 min. Se utilizó la columna TraceGOLD TG-XLBMS (30 m x 0,25 mm diámetro interno x 0,1  $\mu\text{m}$  espesor de la película, Thermo Scientific, USA).

La temperatura del horno fue  $90^{\circ}\text{C}$  por 1 min, luego se elevó a  $200^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $18^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ . Esta temperatura se mantuvo por 4 min. Se empleó el detector de captura de electrones (ECD). Se empleó  $\text{H}_2$  (5.0) como gas de arrastre a  $12 \text{ mL.min}^{-1}$ . La cuantificación del análisis estuvo basada en el principio de que el área del pico del compuesto es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. La temperatura del inyector se mantuvo a  $125^{\circ}\text{C}$  y la del detector ECD a  $160^{\circ}\text{C}$ . La inyección de 2  $\mu\text{L}$  fue modo split a un flujo de  $20 \text{ mL.min}^{-1}$  (Rodríguez, R. & Suárez, B., 2007).

### **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron según un análisis de varianza de un solo factor. Éste análisis permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ( $K > 2$ ) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor agregado (Montgomery & Runger, 2005). Las pruebas de comparaciones de media se llevaron a cabo con los test de Índice de Tukey. Se fijó el nivel de significancia o nivel crítico en  $P \leq 0,05$ . Los

datos se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS 20.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Alcoholes superiores

Entre las diversas familias de compuestos químicos que proceden del metabolismo fermentativo de las levaduras, destacan los alcoholes superiores mayoritarios: propanol, 2-metilpropanol (isobutanol) y 3-metilbutanol (alcohol isoamílico). Este grupo es el más importante cuantitativamente entre los volátiles del vino (Moreno & Peinado, 2009). La producción de alcoholes superiores es una característica individual de cada levadura que puede traer impactos tanto positivos como negativos sobre el perfil aromático (Zambonelli, 2003). Se caracterizan por su penetrante olor y consecuentemente, pueden tener un significativo efecto en el sabor de los vinos.

Contribuyen al sabor dulce afrutado de la bebida, pero para que la sensación sea agradable deben estar equilibrados los sabores ácidos con el amargo y con el dulce. Los alcoholes presentan también otra peculiaridad, que es su impresión al tacto en la lengua con sensación ardiente, debido a su poder deshidratante y lipodisolvente (Cedrón, 2004).

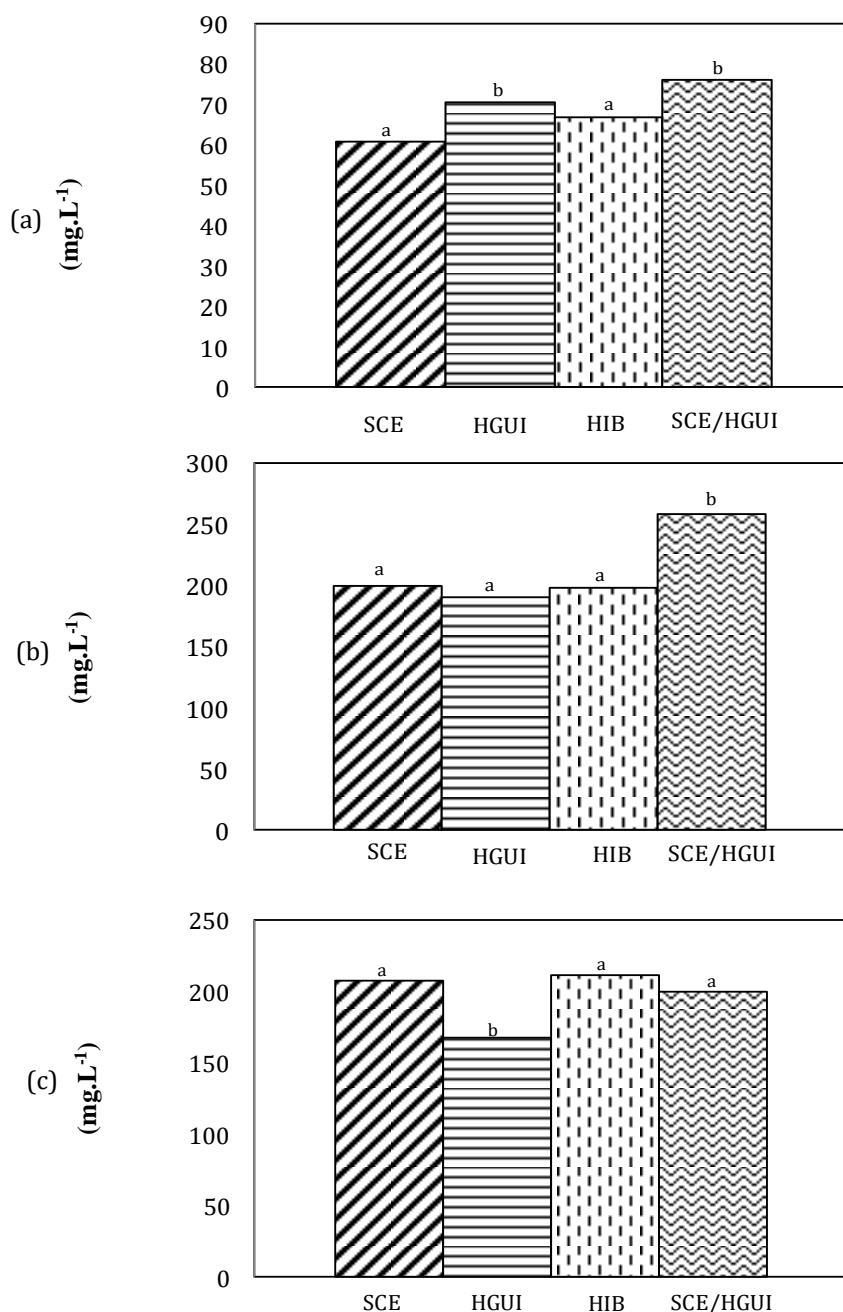
Los resultados de la composición de esta familia de compuestos en los vinos realizados con las diferentes especies de levaduras se muestran en la **Figura 1**. El contenido de propanol se muestra en la **Figura 1 (a)**. Se observa que los valores encontrados para la levadura producto de la fusión de protoplastos ( $67,19 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no difieren significativamente de los encontrados para *S. cerevisiae* ( $60,88 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Un comportamiento similar pero con valores superiores se obtuvo en los vinos elaborados con *H. guilliermondii* ( $77,11 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y el cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii* ( $76,27 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

La concentración de propanol es comparable con los valores reportados en el trabajo de Andorrà *et al.*, (2012) para vinos elaborados con *S. cerevisiae*, *Candida Zemplinina*, *H. uvarum* y mezcla de estos cultivos. Sin embargo, resultaron superiores a los contenidos de propanol encontrados por Romano *et al.*, (2003) y Regodón *et al.*, (2006), los cuales emplearon *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Candida stellata*, *Z. fermentati*, *S. ludwigii* y *S. cerevisiae*, respectivamente.

Al observar la **Figura 1 (b)** se aprecia que la concentración de 2-metilpropanol del vino elaborado con la levadura híbrida no difiere significativamente con los realizados con *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii*, mientras que el vino fermentado con el cultivo mixto *S. cerevisiae/H. guilliermondii* presentó una concentración significativamente mayor en comparación con el resto de los vinos. El



contenido de 2-metilpropanol en los vinos preparados con *S. cerevisiae*, *H. guilliermondii* y la levadura híbrida estuvo cercano a 200 mg.L<sup>-1</sup>. Se encontraron valores inferiores en los trabajos reportados por Romano *et al.*, (2003); Tufariello *et al.*, (2014); Lossada *et al.*, (2011); Mateo *et al.*, (2001); Regodón *et al.*, (2006) y Gómez-Míguez *et al.*, (2007).



**Figura 1.** Alcoholes mayoritarios en los vinos elaborados con las diferentes especies. (a) propanol, (b) 2-metilpropanol, (c) 3-metilbutanol SCE: *S. cerevisiae*; HGUI: *H. guilliermondii*; HIB: Híbrido; SCE/HGUI: *S. cerevisiae*/*H. guilliermondii*. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa (p<0,05)

En la **Figura 1 (c)** se encuentran representados los contenidos de 3-metilbutanol en los vinos elaborados con las levaduras de estudio. En este caso no hay diferencias significativas entre los vinos preparados con *S. cerevisiae*, el híbrido y el cultivo mixto. La concentración fue próxima a 200 mg.L<sup>-1</sup>.

Este valor es comparable con los obtenidos por Lossada *et al.*, (2011); Moreira *et al.*, (2011); Romano *et al.*, (2003) y Mateo *et al* (2001), mientras que el vino elaborado con la levadura comercial *H. guilliermondii* tuvo una concentración (168,02 mg.L<sup>-1</sup>) de 3-metilbutanol significativamente menor a la encontrada en los vinos fermentados con el resto de las levaduras.

Los alcoholes superiores generalmente se producen en cantidades elevadas y cuando su concentración supera los 400 mg.L<sup>-1</sup> se originan efectos no deseables en la percepción sensorial del vino (Nikolaou *et al.*, 2006). En esta investigación se obtuvieron valores superiores de 2-metilpropanol en comparación con los estudios antes mencionados. Estos tipos de alcoholes son formados por las levaduras, bien sea directamente de los azúcares o de los aminoácidos de la uva, por la reacción "Ehrlich", es decir; transaminación, descarboxilación y reducción de aminoácidos. La leucina conduce al alcohol 3-metilbutanol, mientras que el 2-metilpropanol y el propanol pueden ser producidos por valina y treonina (Moreira *et al.*, 2011).

La cantidad de alcoholes superiores sintetizados durante un proceso fermentativo depende de la concentración de aminoácidos presentes en el medio. La elevada concentración de propanol encontrada podría deberse a la composición de aminoácidos del mosto de uva utilizado. La producción de este grupo de alcoholes está en función del balance establecido entre sus rutas anabólicas y catabólicas y de la cantidad de nitrógeno disponible (Boulton *et al.*, 1999).

## Ésteres

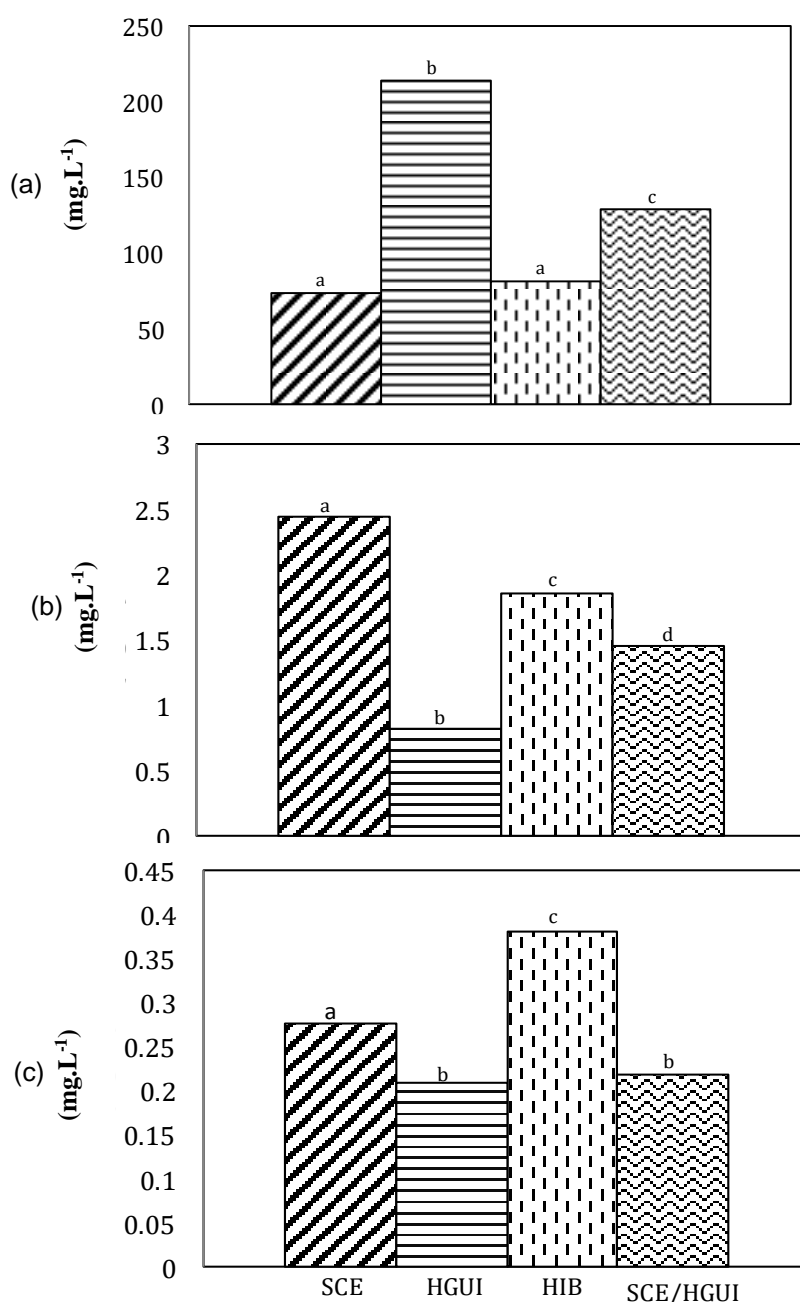
Otro grupo importante de compuestos volátiles encontrado en los vinos es representado por los ésteres. Se producen durante el proceso de fermentación en pequeñas cantidades y aunque en el transcurso del proceso pueden formarse varios tipos de ésteres, los más importantes son los apolares provenientes de alcoholes superiores y de ácidos grasos saturados; acetato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo (Uber, 2006). Las cepas analizadas en este estudio produjeron ésteres, los cuales son responsables de las notas afrutadas y florales de los vinos jugando un papel importante en sus características sensoriales (Callejon *et al.*, 2010).

Particularmente el acetato de etilo es uno de los principales, debido a que se encuentra en proporciones mayoritarias. Éste compuesto añade complejidad al aroma del vino con notas frutales



cuando su concentración está por debajo de  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ , mientras a altas concentraciones puede proporcionar un olor avinagrado desagradable (Clarke & Bakker, 2004).

En la **Figura 2** se presentan las concentraciones de los ésteres mayoritarios analizados. En la **Figura 2(a)** se muestra el contenido de acetato de etilo para cada uno de los vinos de estudio. Se aprecia que la levadura híbrida presentó una concentración menor a  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , lo que representa un punto a favor para esta cepa, ya que no supera el límite máximo recomendado y puede impartir al vino aromas afrutados agradables.



**Figura 2.** Ésteres mayoritarios en los vinos elaborados con las diferentes especies. (a) acetato de etilo, (b) acetato de isoamilo, (c) hexanoato de etilo. SCE: *S.cerevisiae*; HGUI: *H.guilliermondii*; HIB: Híbrido; SCE/HGUI: *S.cerevisiae*/*H.guilliermondii*. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Es de hacer notar que la concentración de acetato de etilo en éste vino ( $81,34 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no difirió significativamente con del vino producido con *S. cerevisiae* ( $73,37 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Además se observa que el vino elaborado con la cepa *H. guilliermondii* presentó un valor igual a  $214,36 \text{ mg.L}^{-1}$ . Esta concentración es inaceptable debido al olor avinagrado y las características negativas que le imparte al vino. El vino elaborado con la mezcla de *S. cerevisiae/H. guilliermondii* tampoco superó los  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  de acetato de etilo pero su concentración es superior a la obtenida con la cepa híbrida y la autóctona ( $129,03 \text{ mg.L}^{-1}$ ). De acuerdo con Regodón *et al.*, (2006) concentraciones entre 70 y  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  son consideradas positivas para el aroma de vino. Según este criterio la cepa híbrida y la autóctona presentan niveles adecuados de este éster y sus concentraciones son comparables con los resultados expuestos por Regodón y col., (2006) y Romano *et al.*, (2003), utilizando en todos los casos *S. cerevisiae*. Es importante acotar que estas levaduras produjeron niveles de acetato de etilo más bajos que los perfiles generados por cepas como *H. uvarum*, *C. stellata* y *S. ludwigii*.

Otro éster importante analizado en las muestras de vino fue el acetato de isoamilo. En general los ésteres de acetato son considerados como indicativos de calidad aromática de vinos jóvenes y que le aportan al vino notas frutales agradables, especialmente olor a banana. En la **Figura 2 (b)** se aprecia que las cantidades obtenidas para éstos ésteres en los vinos producidos con las levaduras de estudio presentaron diferencias significativas entre sí. La mayor cantidad de acetato de isoamilo la presentó el vino elaborado con la levadura autóctona *S. cerevisiae* ( $2,45 \text{ mg.L}^{-1}$ ). El vino fermentado con la levadura híbrida presentó una concentración superior ( $1,86 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a la obtenida en el vino elaborado con las levaduras *H. guilliermondii* ( $0,82 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y el cultivo mixto *S. cerevisiae/H. guilliermondii* ( $1,46 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Los resultados encontrados en este estudio en relación a la concentración de acetato de isoamilo por parte de la levadura híbrida, *S. cerevisiae* y el cultivo mixto, superan ligeramente los valores reportados por Lossada *et al.*, (2011) y Gomez-Míguez *et al.*, (2007).

Los contenidos de hexanoato de etilo obtenidos para los vinos de estudio se observan en la **Figura 2 (c)**. En este caso la mayor concentración del éster la obtuvo el vino elaborado con la levadura híbrida ( $0,38 \text{ mg.L}^{-1}$ ), resaltando de éste modo las notas frutales de fresa y piña que de acuerdo con Tufariello *et al.*, (2014) es el aroma característico de este compuesto. El contenido presente en el vino de *S. cerevisiae* ( $0,28 \text{ mg.L}^{-1}$ ) superó los niveles producidos por *H. guilliermondii* ( $0,21 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y por el cultivo mixto ( $0,22 \text{ mg.L}^{-1}$ ). El contenido de hexanoato de etilo generado por la levadura híbrida es comparable con los resultados presentados por Lossada *et al.*, (2011). No obstante, resultó ser menor a los valores expuestos por Andorrà *et al.*, (2012).

Debido a que se utilizó el mismo mosto de uva para todos los bioprocesos se presume que las diferencias en relación a las concentraciones de los ésteres entre las distintas cepas de estudio se

debieron a los mecanismos biosintéticos que ocurren en el interior de cada una de las células de las levaduras. De acuerdo a los hallazgos encontrados en relación a la producción de acetato de isoamilo y hexanoato de etilo por parte de la levadura producto de la fusión de protoplastos, se evidencia el potencial que presenta esta cepa para modificar y mejorar el perfil de compuestos volátiles en los vinos.

La síntesis de ésteres demanda energía por tanto el mecanismo necesita la presencia de un alcohol superior y de una molécula activa en forma de acil-CoA, mayoritariamente acetil-CoA (Uber, 2006). Se forma un éster vía enzimática cuando está presente un alcohol o un ácido graso y una molécula de agua (Lambrechts & Pretorius, 2000). Así el acetil-CoA reaccionaría con los alcoholes superiores rindiendo los ésteres de acetato, mientras que los compuestos acil-CoA reaccionarían con etanol generando los ésteres de etilo. En *S.cerevisiae* hay al menos tres enzimas implicadas en la síntesis de los ésteres. Se denominan genéricamente éster sintasas, etanol acetiltransferasas o alcohol acetiltransferasa. Estas enzimas catalizan mayoritariamente la producción de ésteres formadores de aroma. Aun siendo idéntica la actividad catalítica que ejercen cada una de ellas presentan distintos grados de afinidad y especificidad por el sustrato (Mason & Dufour, 2000).

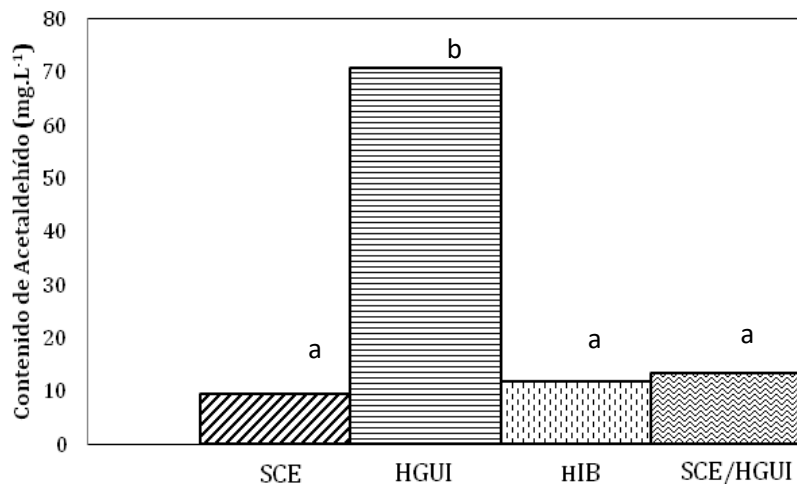
La síntesis de estos compuestos es un mecanismo gobernado fundamentalmente por la regulación transcripcional donde intervienen varios factores. Por consiguiente, el control de la producción de este tipo de ésteres es extremadamente complejo y difícil de predecir (Uber, 2006). Por lo antes explicado, se asume que la función fisiológica que desempeñan las enzimas en la síntesis de ésteres, así como la contribución de cada una de ellas en las levaduras de estudio debe ser distinta.

### Acetaldehído

Uno de los compuestos carbonilos más importantes desde el punto de vista cuantitativo producido durante la fermentación alcohólica es el acetaldehído. Éste es el precursor de los acetatos y etanol. Se forma a partir del piruvato por la vía glucolítica a partir de la piruvato descarboxilasa. Los vinos jóvenes tienen concentraciones por debajo de  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  (Regodón *et al.*, 2006). También puede ser producido luego de la fermentación alcohólica por oxidación química del etanol cuando éste se encuentra expuesto al aire (Oliveira *et al.*, 2011).

En la **Figura 3** se muestran las concentraciones de este aldehído en los vinos de estudio. La mayor concentración ( $70 \text{ mg.L}^{-1}$ ) se obtuvo en el vino fermentado con la levadura comercial *H. guilliermondii*, el resto de los vinos no presentaron diferencias significativas entre sí y estuvieron alrededor de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Este valor es consistente con los resultados encontrados por otros autores, los cuales emplearon *S.cerevisiae* y mosto de uva blanca de la variedad Parelleda (Regodón *et al.*, 2006).

Otros investigadores reportan valores superiores de este compuesto para vinos blancos (Gómez-Míguez *et al.*, 2007; Jackwetz *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Contenido de acetaldehído en los vinos elaborados con las diferentes especies. SCE: *S. cerevisiae*; HGUI: *H. guilliermondii*; HIB: Híbrido; SCE/HGUI: *S. cerevisiae*/*H. guilliermondii*. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

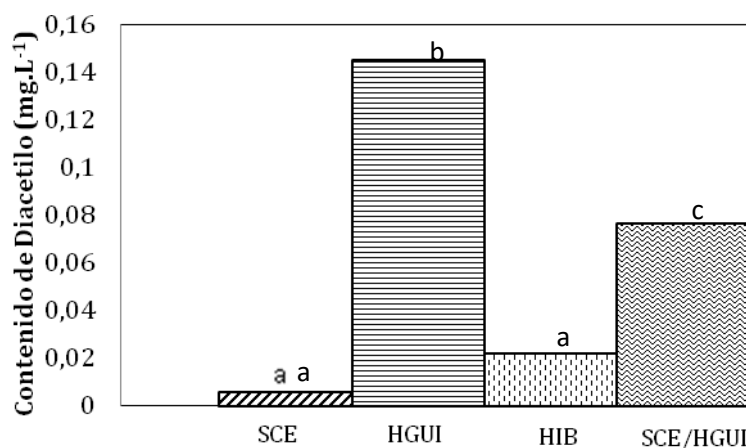
Concentraciones elevadas de acetaldehído imparten atributos aromáticos relacionados con manzanas verdes, hierbas recién cortadas y nueces, sin embargo, estos descriptores son considerados indeseables en mostos y vinos (Cullere *et al.*, 2007). Por esta razón, es importante que las levaduras produzcan bajas concentraciones de acetaldehído. Además de las cualidades sensoriales, el acetaldehído es un aglutinante fuerte al dióxido de azufre, éste combinado reduce los efectos sensoriales del acetaldehído, pero también las propiedades funcionales del mismo. Específicamente, vinos con altas concentraciones de acetaldehído requieren mayor cantidad de dióxido de azufre para lograr niveles adecuados de dióxido libre o activo, debido a que tal como se mencionó anteriormente el dióxido de azufre combinado no tiene las mismas propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antienzimáticas.

Se ha señalado el acetaldehído como causante de efectos adversos a la salud de los consumidores y fue calificado como cancerígeno (Lachenmeier & Sohnius, 2008). Por todo lo antes descrito, la levadura producto de la fusión de protoplastos presenta características favorables en relación a la producción de este compuesto.

## Diacetilo

El diacetilo, también conocido como 2,3-butanodiona es una dicetona vecinal que puede ser encontrada en todos los tipos de vinos. Se produce por la levadura desde el comienzo de la fermentación, pero es rápidamente reducida a acetoína y 2,3-butanodiol, pudiendo incluso continuar esta reducción días después de la fermentación. Por otro lado, la degradación del ácido cítrico por las bacterias lácticas puede producir diacetilo en cantidades importantes. Esta dicetona presenta descriptores aromáticos que recuerdan a la mantequilla y productos lácteos (Moreno & Peinado, 2009).

El análisis de este compuesto es de vital importancia para asegurar la calidad del producto final. Al pH normal del vino (2-4), el diacetilo está unido al ión bisulfuro, es decir; el diacetilo que se mide durante el análisis es el "libre". La formación del complejo diacetilo-sulfito reduce el contenido de diacetilo libre, disminuyendo de esta forma las percepciones sensoriales del vino. Las cantidades de diacetilo obtenidas para los vinos preparados con las levaduras de estudio el análisis estadístico se muestra en la **Figura 4**.



**Figura 4.** Contenido de diacetilo en los vinos elaborados con las diferentes especies. SCE: *S. cerevisiae*; HGUI: *H. guilliermondii*; HIB: Híbrido; SCE/HGUI: *S. cerevisiae*/*H. guilliermondii*. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

Se observa que los contenidos generados con la levadura híbrida (0,02 mg.L<sup>-1</sup>) y con *S. cerevisiae* (0,005 mg.L<sup>-1</sup>) no presentaron diferencias significativas. Al igual que la concentración de diacetilo producido por el cultivo mixto (0,08 mg.L<sup>-1</sup>), los valores estuvieron por debajo de los encontrados con *H. guilliermondii*.

Este resultado era predecible, debido a que las levaduras del género *Saccharomyces* forman pequeñas cantidades de diacetilo, mientras que las levaduras apiculadas, tales como *Hanseniaspora*, *Kloeckera* y *Zygosaccharomyces*, lo hacen en cantidades abundantes (Hidalgo, 2011). Los resultados obtenidos para este compuesto son consistentes con los reportados por Ramos *et al.*, (2012).

Se ha establecido  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  como concentración máxima de diacetilo en vinos blancos, por encima de éste valor este compuesto causaría un defecto importante en el vino. (Hidalgo, 2011). En los vinos blancos es usual obtener valores de diacetilo pequeños, debido a que de lo contrario podría indicar alteraciones debidas a bacterias lácticas. Éste compuesto es un subproducto de la fermentación maloláctica, el cual es un proceso típico para la mayoría de los vinos tintos (Flanzy, 2003).

Las diferencias significativas encontradas en las fracciones aromáticas para los compuestos analizados, corroboran el efecto de las cepas inoculadas debido a que provocan cambios en los vinos obtenidos y dan lugar en el caso del vino elaborado con la levadura resultante de la fusión de protoplastos a un vino con características químicas aceptables.

#### 4. CONCLUSIONES

Los perfiles de compuestos volátiles generados con las levaduras de estudio son diferentes entre sí. Cuantitativamente los alcoholes superiores son el grupo más representativo y se obtuvieron para todos los casos concentraciones aceptables pues estuvieron por debajo de los  $400 \text{ mg.L}^{-1}$ , lo que indica que no hubo alteraciones en este sentido y más bien estos alcoholes contribuyen al equilibrio de los sabores ácidos, amargo y dulce.

La cepa híbrida (SCHLUZ2014) generó bajas cantidades de acetaldehído y diacetilo, los cuales pueden ocasionar defectos a los vinos cuando superan los límites establecidos. Adicionalmente, esta levadura produjo concentraciones aceptables de etanol y cantidades deseables del acetato de isoamilo y de hexanoato de etilo, por lo que se considera factible su uso para el mejoramiento del perfil aromático único y propio que podría impartir a los vinos notas frutales agradables propias de estos ésteres que se expresan con olor a banana, fresa y piña.

#### 5. REFERENCIAS

- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. (2012). Effect of mixed culture fermentation on yeast population and aroma profile. *Food Science and Technology*, 49, 8-13.
- Araujo, K., Berradre, M., Rivera, J., Cáceres, A., Páez, G., Aiello, C. & Perez, D. (2016). Fusión intergénica de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora guilliermondii*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36, 51-57.



- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R. (1<sup>era</sup> edición). (1999). *Principles and practices of winemaking*. Nueva York, USA: Chapman & Hall Eds.
- Callejon, R., Clavijo, A., Ortigueira, P., Troncoso, A., Paneque, P., Morales, M. (2010). Volatile and sensory profile of organic red wines produce by different selet autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Analytica Chimica Acta*, 660, 68-75.
- Carrascosa, A., Muñoz, R. & González, R. (1<sup>era</sup> edición). (2005). *Microbiología del vino*. Madrid, España: AMV Ediciones.
- Cedron, M. (2004). Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. Tesis doctoral. Universidad de la Rioja.
- Clarke, R., Bakker, J. (2004). *Wine Flavor chemistry*. Oxford, USA: Blackwell Publishing.
- Cullere, L., Cacho, J., Ferreira, V. (2007). An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 55, 876–881.
- Flanzy, C. (2003). *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*, Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Jackowetz, J., Dierschke, S., Mira de Orduña, R. (2011). Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 44, 310-316.
- Gómez-Míguez, M., Cacho, J., Ferreira, V., Vicario, I., Heredia, F. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100, 1464-1473.
- Hidalgo, T. (2011). *Tratado de Enología. Tomo I*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Lachenmeier, D. y Sohnius, E. (2008). The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: evidence from a large chemical survey. *Food Chemical Toxicology*, 46, 2903–2911.
- Lambrecht, M., Pretorius, I. (2000). Yeast and its importance to wine aroma - a review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 21, 97–129.
- Lossada, M., Andrés, J., Cacho, J., Revilla, E., López, J. (2011). Influence of some prefermentative treatments on aroma composition and sensory evaluation of white Godello wines. *Food Chemistry*, 125, 884-891.
- Mason, A., Dufour., (2000). Alcohol acetyl transferees and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16, 1287-1289.
- Mateo, J., Jiménez, M., Pastor, A., Huerta, T. (2001). Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles. *Food Research International*, 34, 307-314.
- Mateo, J. & Maicas S. (2016). Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts to Wine-Making Process. *Fermentation*, 21(4), 1-13.
- Montgomery, D. & Runger, P. (2005). *Probabilidad y estadística aplicadas a la Ingeniería*. Arizona, Estados Unidos: Editorial McGraw-Hill.
- Moreira, N., Guedes de Pinho, P., Santos, C., Vasconcelos, I. (2011). Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wines. *Food Chemistry*, 126: 1599-1607.
- Moreno, J. & Peinados, R. (2009). *Química enológica*. Madrid, España: AMV Ediciones y Ediones Mundi Prensa.
- Nikolaou, E., Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., & Tzanetakis, N. (2006). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, 23, 205-211.

- Oliveira, C., Ferreira, A., De Freitas, V. & Silva, A. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126.
- Pretorius, I. (2000). Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approache to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
- Raineri, S. & Pretorius, I. (2000). Selection and improvement of wine. *Annals Microbiology*, 50, 15-31.
- Ramos, R., Pacheco, M., Gonçalves, L., Valente, I., Rodrigues, J., Araujo, A. Determination of free and total diacetyl in wine by HPLC–UV using gas-diffusion microextraction and pre-column derivatization. *Food Control*, 24 (1-2), 220-224.
- Regodón, J., Ramirez, M., Perez-Nevado, F. (2006). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (1), 151-15.
- Rodríguez, R. & Suárez, B. (2007). Determination of Volatile Compounds in Cider Spirits by Gas Chromatography with Direct Injection. *Journal of Chromatography Science*, 45, 428-434.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169-180.
- Tufariello, M., Chiriatti, M., Grieco, F., Perrotta, C., Capone, S., Rampino, P., Tristezza, M., Mita, G. 2014. Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile profile of Negroamaro wines. *Food Science and Technology*, 58, 35-48.
- Uber, G. (2006). Modificación genética de levaduras vínicas industriales para mejorar la producción de aroma secundario. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- 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.
- Van Rensburg, P. (2006). Las levaduras híbridas, una herramienta excepcional para las fermentaciones. *Viticultura/Enología Profesional*, 105, 9-43.
- Vilanova, M., Escudero, A., Graña, M., Cacho, J. (2013). Volatile composition and sensory properties of NorthWest Spain white wines. *Food Research International*, 54, 562–568.
- Wu, Y., Duan, S., Zhao, L., Gao, Z., Luo, M., Song, S., Xu, W., Zhang, C., Ma, C., Wang, S. (2016). Aroma characterization based on aromatic series analysis in table grapes. *Scientific Reports*, 6 (3116), doi: 10.1038/srep31116.
- Zambonelli, C. (2003). *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Bologna, Italia: Edagricole.
- Zhu, F., Du, B., Li, J. (2016). *Aroma Compounds in Wine*. London, United Kingdom: Intechopen.