

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

*Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos*

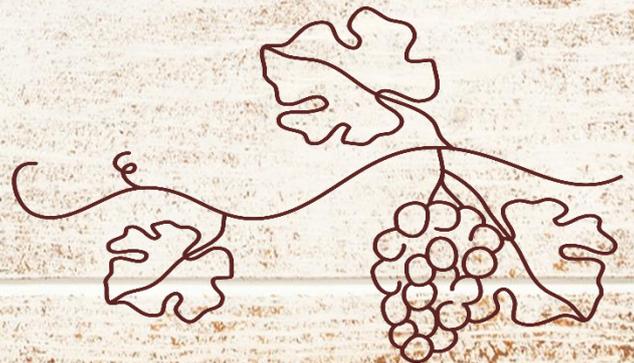


**INFLUENCIA DE CULTIVOS INICIADORES  
AUTÓCTONOS DE LA PATAGONIA SOBRE EL  
ATRIBUTO COLOR DE VINOS TINTOS  
REGIONALES.**

*Licenciada en Tecnología de los Alimentos:  
Viviana Andrea Carreño*

**Trabajo Integrador para optar al Título  
de “Especialista en Calidad e Inocuidad  
de los Alimentos”**

*Tutora: Doctora Adriana Caballero.*



## RESUMEN:

El color del vino es uno de los atributos más apreciados por el consumidor al momento de su elección. Por su importancia, la influencia sobre este atributo es actualmente un criterio de selección de levaduras y bacterias lácticas (BAL) para uso enológico. En este trabajo se caracterizó la influencia de cultivos iniciadores autóctonos de la Patagonia Norte sobre la calidad sensorial de los vinos con foco en el color y su relación con la variedad de uva, con la formulación de los cultivos, y preferencia por los consumidores. Vinificaciones a escala piloto (2015 al 2017) e industrial (2019 y 2021) de mostos patagónicos Pinot Noir (Vendimia 2015) y Malbec (todos los años) sulfitados se condujeron con cultivos iniciadores autóctonos de la Patagonia constituidos por: i) cultivo puro de *Saccharomyces cerevisiae* F8 (ScF8), ii) cultivo mixto constituido por ScF8 y *Pichia kudriavzevii* I15 (ScF8-Pk15) en la forma de coinóculo y una relación de biomasa 1:100; y iii) cultivo mixto constituido por ScF8 y la bacteria láctica (BAL) *Oenococcus oeni* UNQ31 (ScF8-Oe31) inoculadas secuencialmente. También se realizaron vinificaciones controles con el cultivo iniciador comercial *Saccharomyces cerevisiae* F15 (ScF15) y con el cultivo mixto ScF15-Oe31.

En todas las condiciones ensayadas los vinos jóvenes resultaron normales y secos pero la influencia de los cultivos iniciadores autóctonos sobre el color sólo fue significativa en los vinos Malbec. El cultivo autóctono ScF8 incrementó el color de estos vinos respecto de sus controles (ScF15) mejorando su percepción sensorial y la preferencia por los consumidores. La inclusión de la cepa de levadura Pk15 disminuyó los parámetros de color de los vinos, pero mejoró significativamente su calidad sensorial (menor percepción alcohólica y acidez y mayor dulzor que sus vinos controles ScF8) manteniendo la preferencia por los consumidores mientras que la BAL Oe31 sólo ejerció una influencia positiva combinada con la cepa foránea ScF15. Ambos vinos, los elaborados con el cultivo puro ScF8 y mixto ScF8-Pk15, estabilizaron su color mediante la formación de antocianinas poliméricas y copigmentadas y presentaron un mayor contenido de polifenoles totales y flavonoles (compuestos con capacidad antioxidante) que los elaborados con el cultivo comercial ScF15 evidenciando la capacidad de las cepas nativas de producir vinos tintos Malbec de calidad controlada y diferencial.

**Palabras clave:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, color, vino, Patagonia.

## AGRADECIMIENTOS:

A mi tutora, Dra. Adriana Caballero, por incluirme en su grupo de investigación, por guiarme en la parte técnica y teórica, por contagiarme con su energía y por su apoyo continuo.

A mi compañero de trabajo Manuel Morales, por su acompañamiento en este proceso experimental y por el empuje diario brindado en la etapa de escritura.

A mi compañera de grupo de investigación Carmen Maturano por su aporte a este trabajo.

A la Universidad Nacional del Comahue, Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos en particular, por ofrecerme la oportunidad de realizar este posgrado.

A mis padres Gladys y Agustín y mi abuela Prosperina, pilares fundamentales en mi vida.

Finalmente agradezco a mi esposo Gabriel y a mis hijos: Federico, María José y Victoria, por estos años de aguante y apoyo incondicional.

*A la memoria de mi mamá Gladys  
y mi abuela Prosperina.*

## ÍNDICE:

Resumen .....	2
Agradecimientos .....	3
<b>1- Introducción .....</b>	<b>6</b>
1.1 El vino y el proceso de vinificación.....	6
1.1.1 Microbiología del proceso de vinificación. Levaduras y bacterias del ácido láctico.....	10
1.1.2. Cultivos iniciadores para vinificación .....	11
1.2 El vino: Composición química y propiedades sensoriales.....	12
1.2.1 Color del vino.....	13
1.2.2 Influencia de levaduras y bacterias lácticas sobre el color del Vino .....	18
<b>2- Fundamentación .....</b>	<b>20</b>
<b>3- Objetivos del Trabajo.....</b>	<b>21</b>
<b>4- Materiales y métodos .....</b>	<b>22</b>
4.1 Microorganismos.....	22
4.2 Vinificaciones.....	23
4.3 Análisis de los vinos.....	25
4.3.1 Análisis fisicoquímicos.....	25
4.3.1.1 Determinación de azúcares reductores totales (ART).....	25
4.3.1.2 Determinación del pH.....	25
4.3.1.3 Determinación de alcohol, glicerol y ácidos orgánicos .....	25
4.3.1.4 Determinación de anhídrido sulfuroso total y libre (SO <sub>2</sub> ).....	26
4.3.2 Análisis de los componentes del Color.....	26
4.3.2.1 Parámetros Cromáticos.....	26
4.3.2.2 Cuantificación de Polifenoles Totales (PT 280).....	26
4.3.2.3 Cuantificación de los Ácidos Hidroxicinámicos totales.....	27
4.3.2.4 Cuantificación de Flavonoles.....	27
4.3.2.5 Cuantificación de Antocianinas.....	27
4.3.2.6 Cuantificación de fracciones de Antocianinas.....	28
4.3.3 Análisis Sensorial.....	28

4.3.4 Análisis Estadístico.....	29
<b>5- Resultados y Discusión.....</b>	<b>30</b>
5.1 Vinificaciones a Escala Piloto.....	30
5.2 Vinificaciones a Escala Industrial.....	39
<b>6- Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>7- Bibliografía.....</b>	<b>44</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El Vino y el Proceso de Vinificación

El vino es, exclusivamente, la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva, según el Código Internacional de Prácticas Enológicas de la Oficina Internacional de la Uva y el Vino (OIV, 2016). Su graduación alcohólica real no deberá ser inferior a 8,5% vol. Sin embargo, teniendo en cuenta el clima, el suelo, la variedad de vid y tradiciones específicas en determinados viñedos, el contenido mínimo de alcohol total puede ser reducido a 7% vol. por la legislación particular a la región considerada (OIV, 2016).

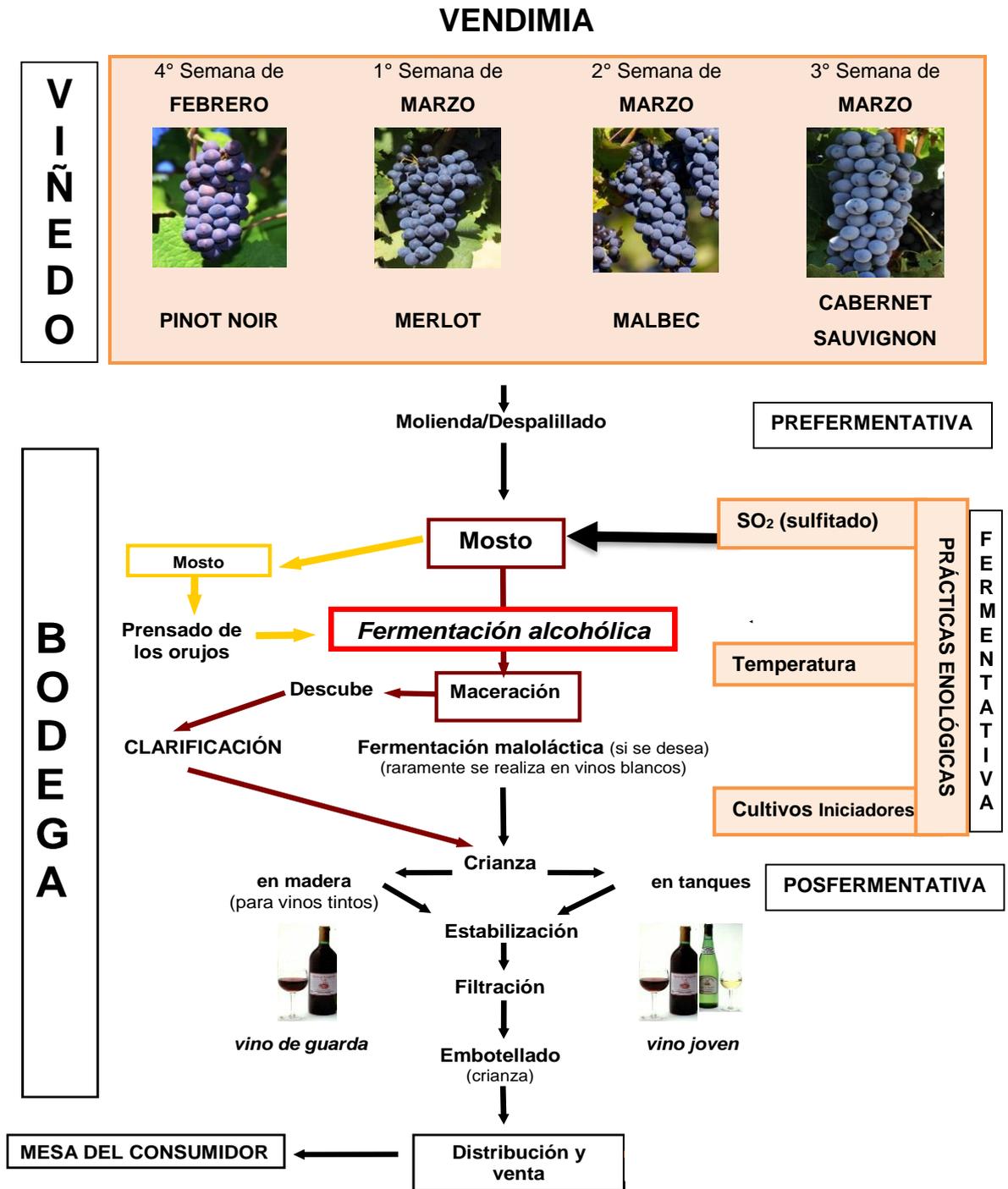
Los vinos genuinos son los obtenidos por la fermentación alcohólica de la uva fresca y madura o del mosto de la uva fresca, elaborados dentro de la misma zona de producción (CAA. Capítulo XIII - art. 1093, 2023). Este proceso posibilita la aparición de una variada gama de propiedades sensoriales.

La producción de vino involucra muchos procedimientos que se han modificado a lo largo del tiempo dependiendo de la zona geográfica, de la bodega y del estilo de vino que se desea producir, pero en todos los casos se comparten ciertas operaciones básicas, de las cuales, por su importancia, las involucradas en la vendimia y en la etapa fermentativa resultan centrales (Pretorius, 2016). El proceso comienza con la recolección de las uvas que puede realizarse en forma manual o mecánica; pero el despalillado, estrujado y prensado de la uva son procesos mecánicos (Figura 1).

Tradicionalmente, la vendimia (recolección o cosecha de las uvas) se realiza en Argentina entre los meses de febrero y abril. Determinar cuándo vendimiar las uvas es un paso decisivo en el proceso de elaboración del vino, está fuertemente influenciado por el clima y requiere de análisis



químicos y de una degustación de uvas a la antigua (Pretorius, 2016). El momento en que las uvas se cosechan, a mano o mecánicamente, determina en gran medida la acidez, el dulzor, el grado alcohólico, y la textura tánica del vino.



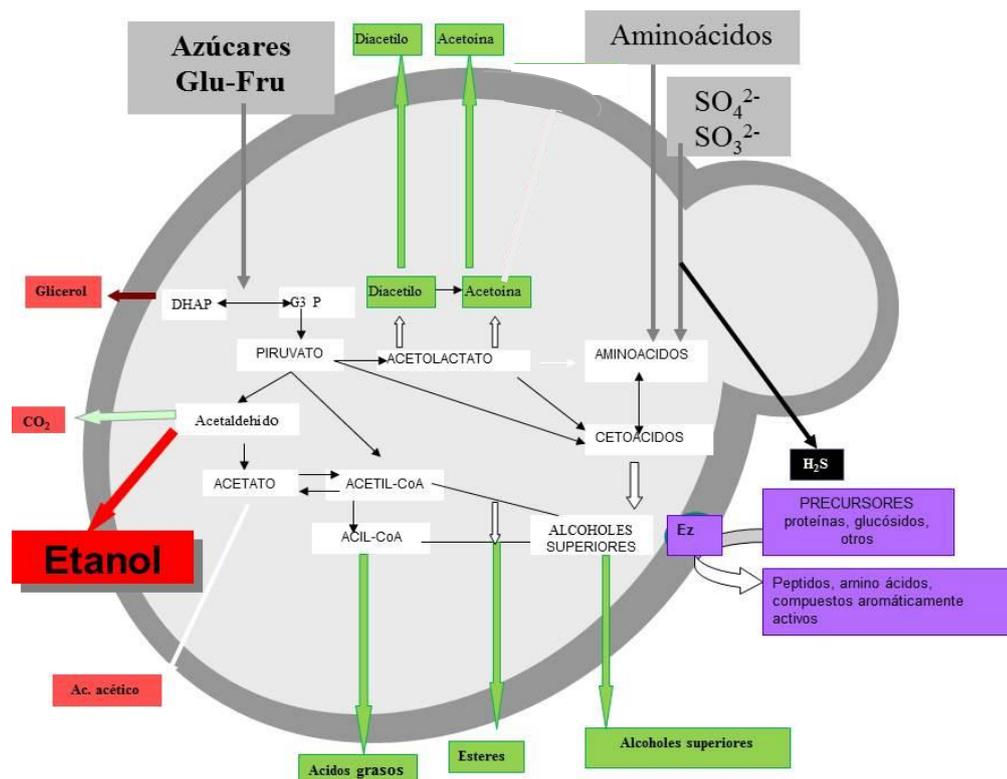
**Figura 1: Elaboración del vino.** Etapas y operaciones unitarias involucradas en vinificaciones en blanco (flechas amarillas), en tinto (flechas marrones) o en ambas (flechas negras), factores determinantes de la calidad de la uva y prácticas enológicas que afectan la microbiología de la vinificación. Arriba: variedades tintas que se vinifican mayoritariamente en la región del Comahue (Patagonia norte, Argentina) y momentos de sus vendimias.

Una vez que la uva llega a la bodega, se clasifican los racimos, se retiran las uvas en mal estado o inmaduras (Boulton, 1996) y se procede a la vinificación. La vinificación, transformación del mosto de uva en vino, involucra dos bioprocesos: la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica.

La fermentación alcohólica (FA) es la etapa central de la vinificación. En esta etapa las levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, obtienen energía para su desarrollo y mantenimiento celular mediante la transformación de los principales azúcares de la uva, glucosa y fructosa, en etanol y dióxido de carbono (1), en ausencia de oxígeno.



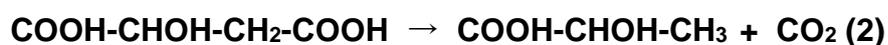
Durante este bioproceso, también se generan otros metabolitos primarios y secundarios que determinan las características del vino e influyen sobre las propiedades sensoriales del mismo, principalmente sobre el aroma (Figura 2) (Mina y Tsalts, 2017; van Wyk y col., 2021).



**Figura 2: Fermentación alcohólica.** En rojo están señalados los metabolitos primarios (concentraciones en el orden de los g L<sup>-1</sup>), en verde los metabolitos secundarios aromáticamente activos (concentraciones en el orden de los mg L<sup>-1</sup> o menores) provenientes estrictamente de la fermentación, en violeta los metabolitos derivados por transformación enzimática de precursores presentes en el mosto y en negro metabolito indeseable. (Apablaza, 2006).

La producción de vino tinto requiere adicionalmente que, durante la fermentación alcohólica el orujo (piel, semillas y raspones de la uva) permanezca en contacto con el jugo, operación denominada maceración. Durante la maceración, el material polifenólico, consistente en antocianinas (pigmentos solubles en agua), taninos y compuestos activos del sabor, migra desde el orujo al mosto, dando al vino tinto su color, estructura y sabor (Pretorius, 2016). El color del vino está determinado en esta etapa por las características de la uva y por la duración del contacto entre el mosto y el orujo. Las levaduras durante el proceso fermentativo pueden también afectar el color del vino tinto modulando su composición antociánica (Topić Božiča y col., 2020).

La fermentación maloláctica (FML) llevada a cabo por las bacterias del ácido láctico (BAL), principalmente *Oenococcus oeni*, no es un proceso fermentativo sino una descarboxilación particular del ácido dicarboxílico L-málico para dar el ácido monocarboxílico L-láctico y dióxido de carbono (2), produciendo una desacidificación del vino paralelamente con un aumento del pH (Lerm y col., 2010; Bartle y col., 2019).



La FML es un bioproceso opcional deseable en la elaboración de los vinos tintos y en ciertos tipos de vinos blancos y espumantes porque incrementa su estabilidad microbiológica, y también disminuye la acidez del producto (Capozzi y col., 2021). La misma puede ocurrir al finalizar la FA o concomitantemente con ella.

Adicionalmente, durante la FML las BAL contribuyen a la calidad sensorial del vino, mayoritariamente sobre su complejidad aromática, mediante la producción de metabolitos secundarios como el diacetilo, responsable del aroma a manteca, el propionato, butirato y lactato de etilo, la liberación de tioles volátiles a partir de precursores, el metabolismo de la metionina y de actividades esterasas y glucosidasas, entre otros (Bartowsky y col., 2015; Capozzi y col., 2021). No obstante, también pueden producir *off flavors* como fenoles volátiles y compuestos peligrosos para la salud del consumidor como aminas biógenas y carbamato de etilo (Capozzi y col., 2021).

### 1.1.1 Microbiología del proceso de vinificación. Levaduras y bacterias del ácido láctico

La vinificación es un proceso ecológicamente complejo que implica la interacción de microorganismos pertenecientes a grupos muy heterogéneos y diferentes entre sí, de los cuales las levaduras y las BAL son, en ese orden, los más importantes por conducir la FA y FML, respectivamente (Liu y col., 2017; Andorrá y col., 2019).

En las vinificaciones espontáneas las levaduras y BAL, responsables de llevar a cabo el proceso, provienen de la superficie de las uvas y del ambiente de la bodega (Pretorius, 2016; Cappozzi y col., 2021).

*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura vínica por excelencia ya que es la responsable de conducir la FA. Aunque su presencia en la superficie de las uvas y al inicio del proceso fermentativo es minoritaria, por sus características fisiológicas particulares, su excepcional poder fermentativo y su tolerancia al estrés osmótico, al dióxido de azufre y al etanol, entre otras, al final de una fermentación exitosa, los individuos de esta especie son la población dominante (van Wyk y col., 2021). No obstante, otras especies de levaduras pertenecientes a otros géneros, mayoritariamente asociadas a las superficies de las uvas y colectivamente denominadas non-*Saccharomyces* como *Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kudriavzevii*, y *Torulaspora delbruekii*, entre otras, están presentes en los estadios tempranos de la fermentación durante tiempos suficientemente prolongados como para aportar a la calidad del vino (Jolly y col., 2014; Capozzi y col., 2015; van Wyk y col., 2021).

En relación a las BAL presentes en el vino, *Oenococcus oeni* es la especie más importante por ser la mejor adaptada a las condiciones estresantes que éste le impone (Lonvaud-Funel, 1999; Lonvaud-Funel y col., 2003), aunque ciertas especies como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lentilactobacillus hilgardii*, *Levilactobacillus brevis*, entre otras, son también de importancia enológica (Barata y col., 2012; Petruzzi y col., 2017; Paramithiotis y col., 2022).

Adicionalmente, el uso de metodologías moleculares en los estudios sobre la ecología microbiana de la vinificación mostró la existencia de una gran diversidad de individuos (cepas) dentro de las poblaciones indígenas de levaduras y BAL; muchas de las propiedades de interés enológico son cepa- dependientes (Lonvaud-Funel, 2006; Pretorius, 2016).

Numerosos factores que influyen sobre la calidad de las uvas al momento de la vendimia y durante la vinificación influyen también sobre la biota microbiana asociada a la misma afectando significativamente la calidad sensorial de los vinos (Grangeteau y col., 2017), con resultados variables entre lotes y entre añadas. Por esto, el control de la biota microbiana asociada al proceso fermentativo mediante la inoculación del mosto de uva con cultivos iniciadores es una práctica enológica de rutina en bodega tendiente a resolver este problema (Petruzzi y col., 2017).

### 1.1.2 Cultivos iniciadores para vinificación

Los cultivos iniciadores son cultivos puros de cepas de levaduras o de BAL especialmente seleccionadas por sus propiedades enológicas y que se comercializan en la forma seca activa (levaduras) o liofilizadas (BAL).

En sus comienzos, el desarrollo de cultivos iniciadores para uso enológico se centró en explotar la biodiversidad intraespecífica de la levadura vínica *Saccharomyces cerevisiae* (Petruzzi y col., 2017), dominante de la FA (Albergaria y Arneborg, 2016). No obstante, el avance en la comprensión de los aportes de otras especies de levaduras diferentes de *Saccharomyces* y de bacterias lácticas (BAL) involucradas en el proceso, sus potenciales metabólicos y las numerosas relaciones que se establecen entre ellas durante la vinificación (Bartle y col., 2019; Pardo y Ferrer, 2019; Englezos y col., 2022) ha suscitado un mayor interés por el desarrollo de cultivos iniciadores de múltiples especies de levaduras y BAL. El uso de cultivos iniciadores múltiples (que contienen diferentes cepas de *Saccharomyces*) o mixtos (constituidos por cepas de diferentes especies de levaduras o de levaduras y BAL) está dirigido a proporcionar soluciones tecnológicas específicas y/o mejorar las propiedades sensoriales del vino como el color, aroma y sabor (Russo y col., 2020).

Recientes avances metodológicos en el campo de la metagenómica permitieron correlacionar características organolépticas diferenciales, entre vinos elaborados en diferentes regiones geográficas, con la composición de las comunidades microbianas asociadas a ellas (Knight y col., 2015; Bokulich y col., 2016), proponiéndose el concepto de “terroir microbiano”, comunidades constituidas por especies y cepas de microorganismos típicas de la zona geográfica de producción del vino (Bokulich y col., 2016; Belda y col., 2017).

En este contexto, la tendencia actual en enología está orientada al desarrollo de cultivos iniciadores de la fermentación múltiples/mixtos constituidos por varias cepas

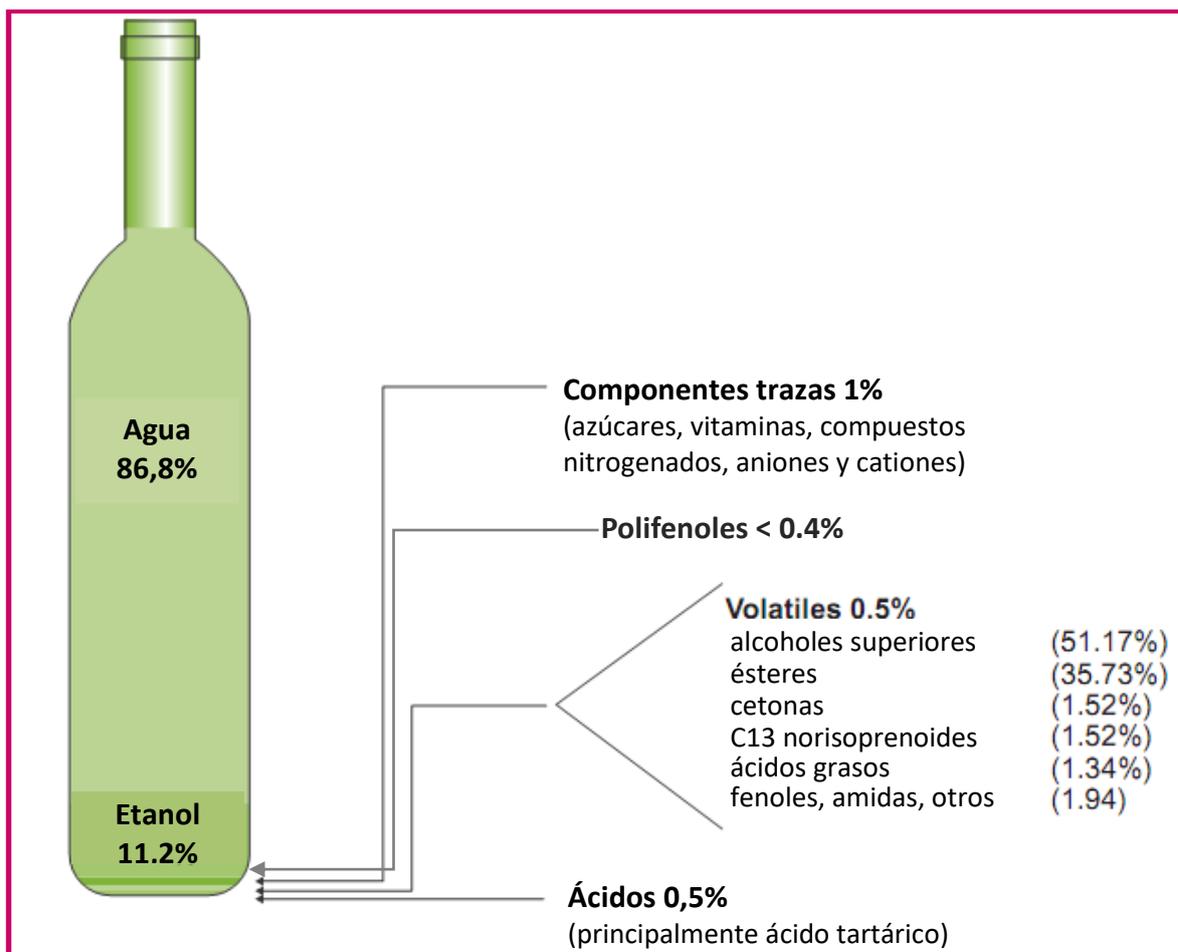
de *Saccharomyces* y por cepas de *Saccharomyces* acompañadas de non-*Saccharomyces* (Lappa y col., 2020; Pretorius, 2020) y/o BAL (Bartle y col., 2019; Devi y Anu-Appaiah, 2021) autóctonas de cada región vitivinícola.

Estos cultivos autóctonos, adaptados a las características agroecológicas de su región, se destacan por su mayor capacidad de competencia que los cultivos foráneos para controlar exitosamente el proceso fermentativo (Lopes y col., 2007) y por respetar la tipicidad del terruño permitiendo expresar en los vinos las notas organolépticas distintivas del mismo (Andorrá y col., 2019).

## 1.2 El Vino. Composición Química y Propiedades Sensoriales

El vino es una compleja solución hidroalcohólica ácida que contiene diversos compuestos, tales como azúcares, ácidos orgánicos, polifenoles, compuestos aromáticos, minerales y polisacáridos, los cuales provienen del fruto, el proceso de vinificación y de la crianza (Moreno y Peinado, 2012a). La calidad de un vino no está relacionada con la cantidad de una única sustancia, sino al contrario con el armonioso conjunto cuantitativo de sus múltiples componentes. En promedio, el vino contiene un 85 a 90% v/v de agua, etanol en un rango de 9 a 14% v/v y un 1 a 3% p/v de otros componentes que, si bien se encuentran en cantidades relativamente pequeñas, aportan complejidad en nariz, estructura en boca y contribuyen al equilibrio de sus sabores y por lo tanto resultan claves en la calidad del mismo (Figura 3).

Los compuestos derivados de la uva dan al vino su estructura básica y le proporcionan su distinción varietal, mientras que los compuestos sintetizados *de novo* por las levaduras, y en menor grado por las BAL, durante la fermentación de los azúcares le otorgan su carácter vinoso y definen su estilo o carácter particular (Polaskova y col., 2008; Styger y col., 2011; Pretorius, 2016). Numerosos factores que afectan la calidad de las bayas (uvas) y de la biota microbiana participante de la vinificación como son las características geopedológicas y topoclimáticas del viñedo, la variedad, edad y clon de la vid, prácticas agrícolas, el momento de la vendimia, las técnicas/prácticas enológicas y la temperatura del proceso, entre otros, afectan también la calidad organoléptica del vino (García y col., 2002; Lucini y col. 2020).

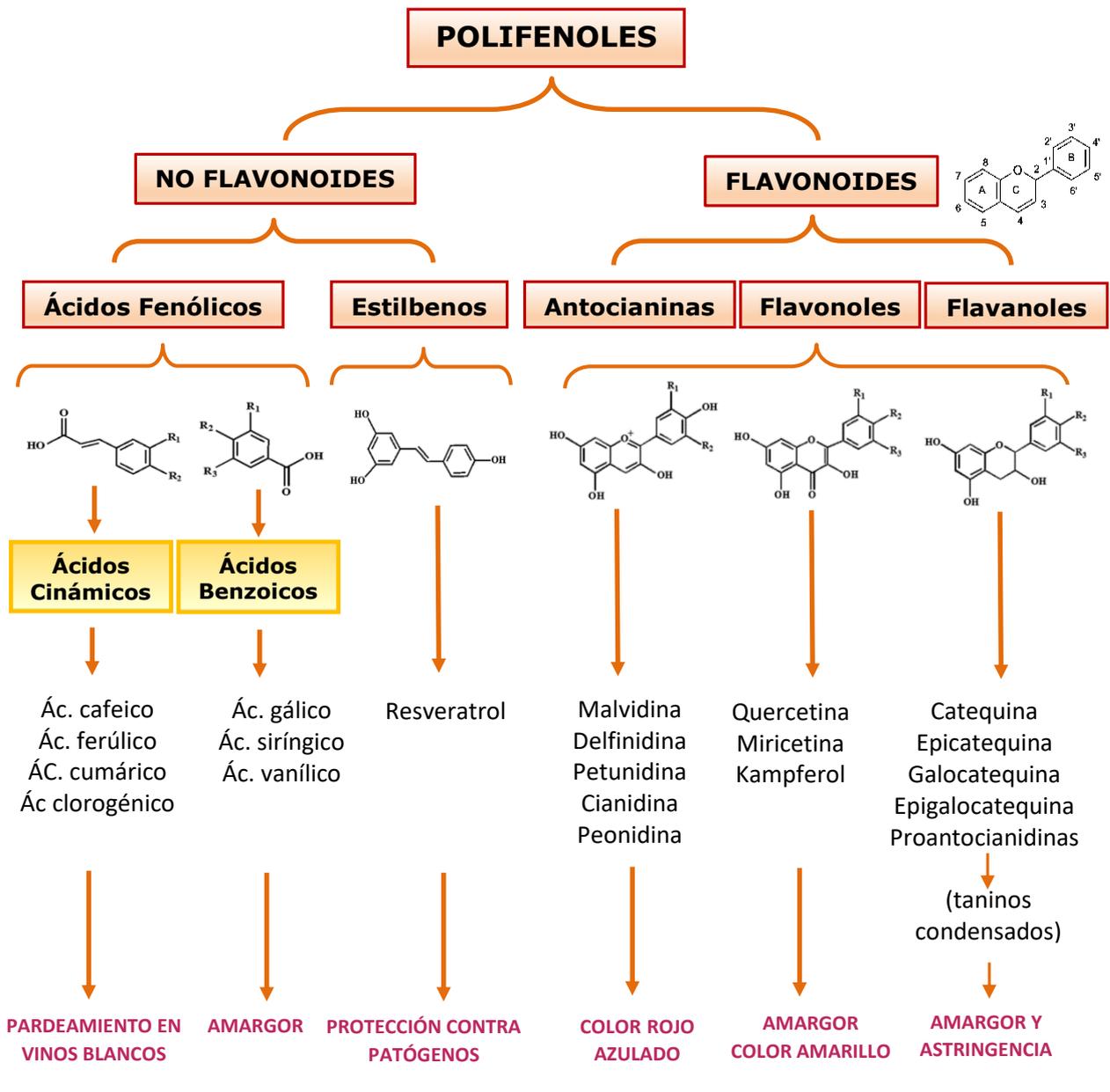


**Figura 3: Composición química del vino.** Cantidades medias de los principales componentes del vino tinto. Los valores varían según el tipo de vino elaborado y la técnica de extracción. El etanol se representa como peso por volumen (p/v), al igual que todos los demás componentes, y es equivalente al 14% (v/v). (Reproducido de Sumbly y col., 2010 con modificaciones).

### 1.2.1 Color del vino

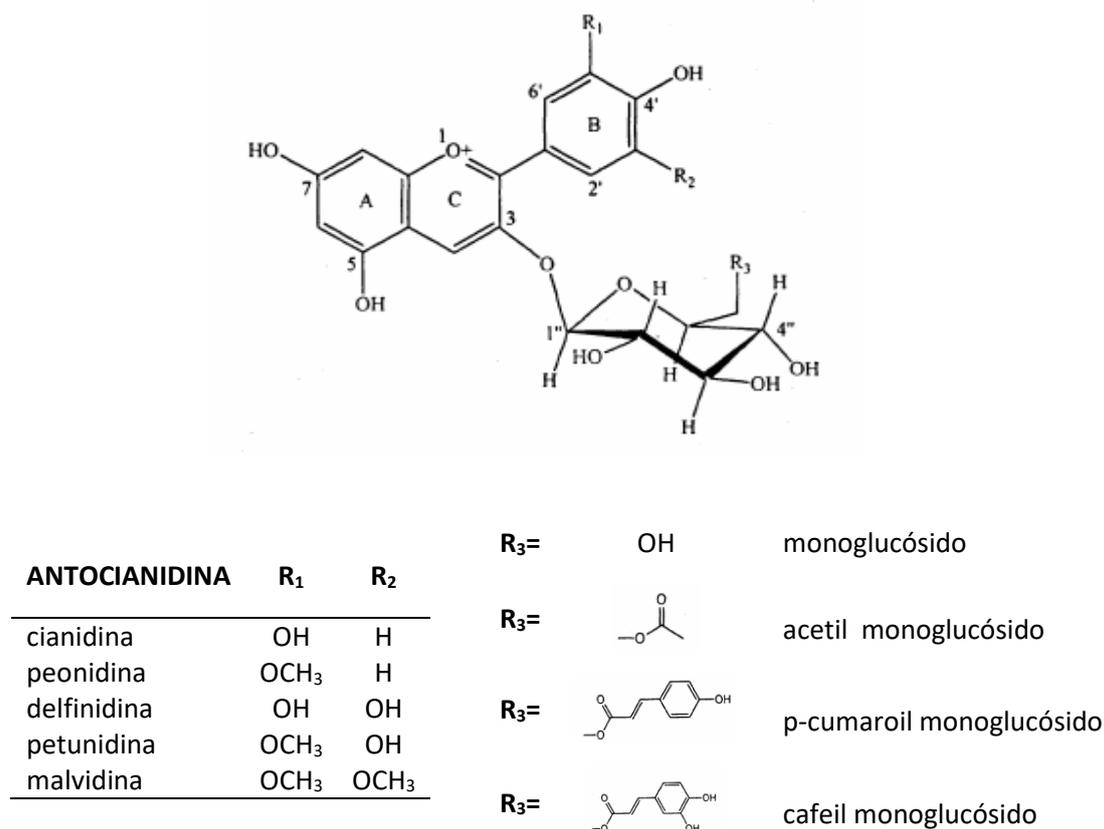
De los atributos organolépticos del vino, el aroma y el color son los más apreciados por el consumidor al momento de la elección (Parpinello y col., 2009). El color es la primera impresión que el consumidor tiene del vino y le genera una idea sobre la calidad, edad y estructura del mismo. El color del vino tinto, así como la astringencia y amargor están en gran medida relacionados con su composición en compuestos fenólicos, principalmente los antocianinas y taninos.

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos, también llamados polifenoles, son un grupo de sustancias químicas formadas por anillos aromáticos que se clasifican en flavonoides y no flavonoides y cuyas estructuras químicas, compuestos más representativos y su función en vinos se muestran en la Figura 4.



**Figura 4: Polifenoles.** Clasificación, estructuras químicas, compuestos más representativos y función en vinos.

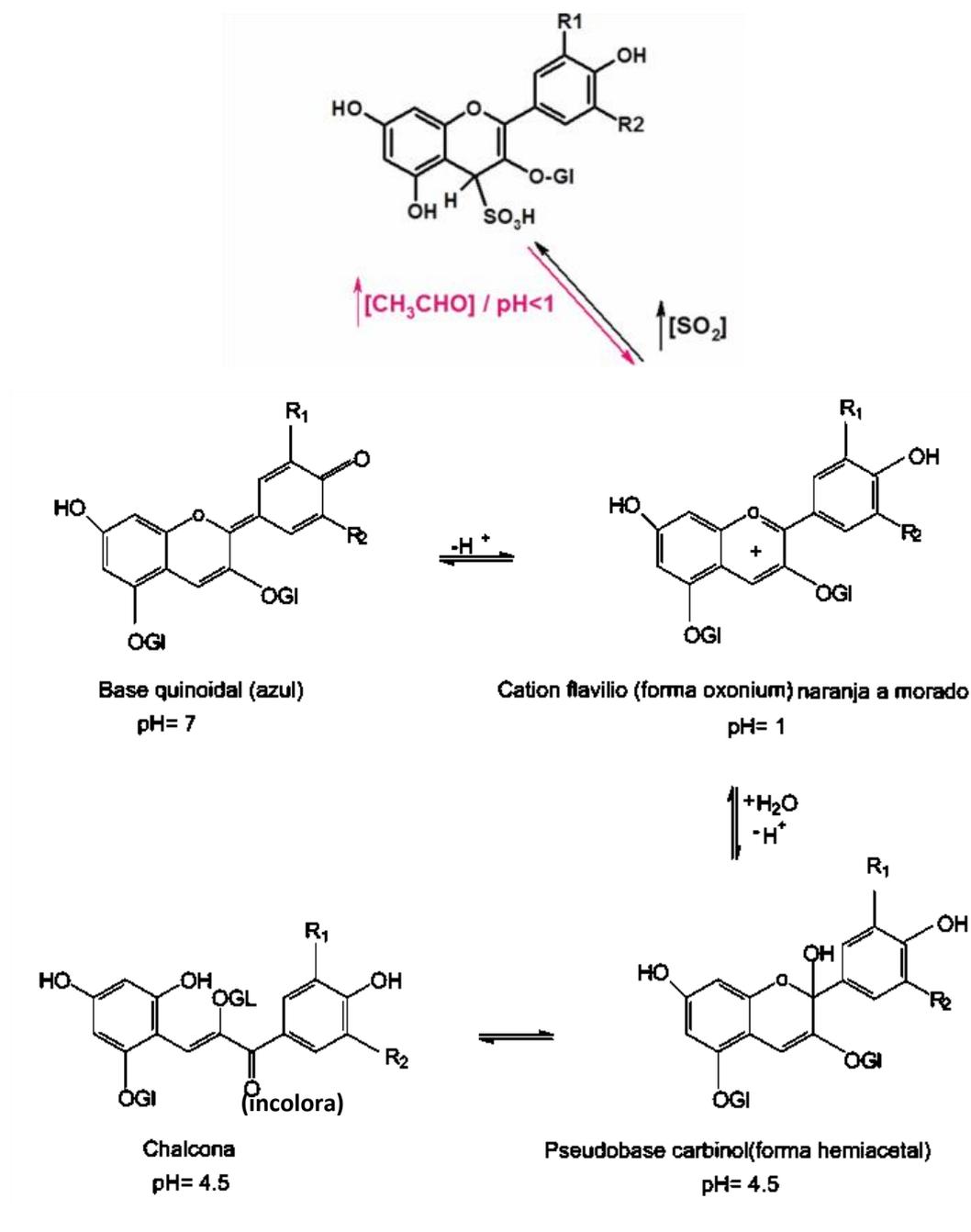
El origen del color rojo de los vinos tintos proviene principalmente de las antocianinas, glucósidos de antocianidinas solubles en agua. En la *Vitis vinífera* L. las antocianinas están en la forma de 3-monoglucósidos o como monoglucósidos acilados en el C6 de la glucosa (Figura 5).



**Figura 5: Antocianinas halladas en *Vitis vinifera*, L.**

En los vinos tintos jóvenes, cada antocianina se encuentra en equilibrio entre cinco formas moleculares, una unida al dióxido de azufre y cuatro libres (Figura 6), cuyas concentraciones dependen del pH, de la concentración de SO<sub>2</sub> y del grado de hidratación. La forma oxonium (catión flavilio) predomina a pH 1 y la hemiacetal (pseudobase carbinol) a pH 4,5. A pH de 3,4 - 3,6 (apropiados para vinos tintos) el 25% de las antocianinas están en la forma de catión flavilio, mientras que sólo un 10% se encuentra en este estado a pH 4,5 (Jackson, 2014).

Las antocianinas son compuestos particularmente inestables en sus formas libres (Morata y col., 2016; Ju y col., 2021) y se estabilizan por asociación de sus moléculas consigo mismas o con otros constituyentes del vino, mayoritariamente compuestos fenólicos flavonoides y no flavonoides, a través de interacciones entre las nubes electrónicas de los anillos aromáticos de ambos, fenómeno conocido como copigmentación (Figura 7), o mediante la formación de enlaces covalentes rindiendo pigmentos poliméricos (Figura 8) (Hermosín Gutiérrez, 2007; Heras-Roger y col., 2016; Morata y col., 2016).

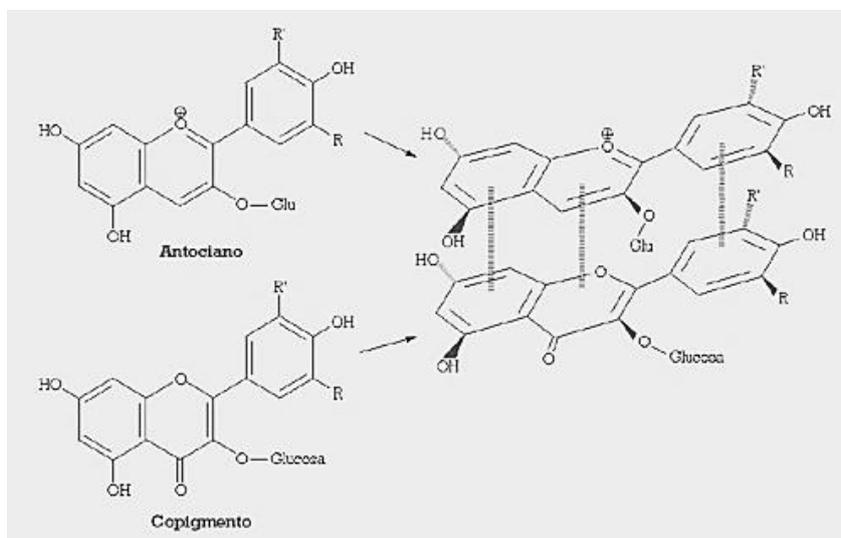


**Figura 6: Equilibrios ácido base de las antocianinas en vinos tintos jóvenes.**

Sólo el catión flavilio, por su estructura planar, tiene la capacidad de formar copigmentos (Figura 7). La copigmentación produce dos efectos sobre el color del vino:

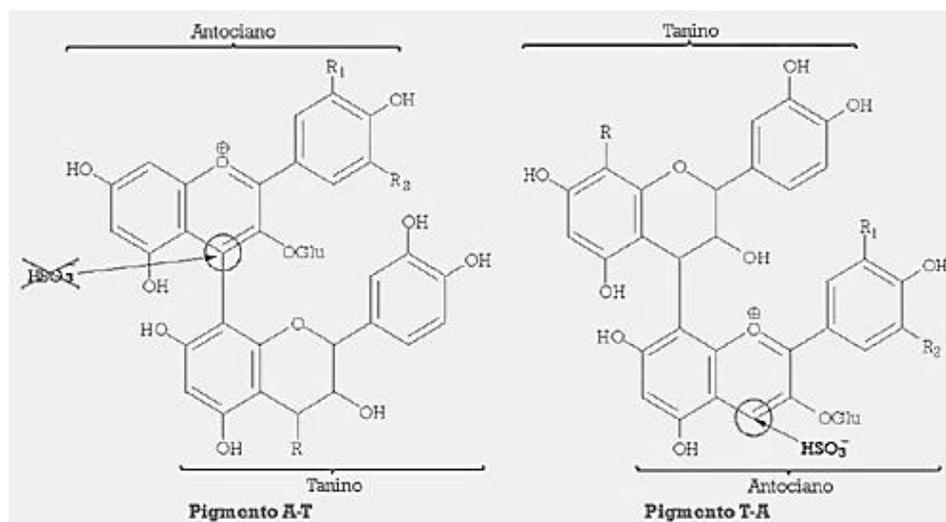
- Un efecto *hipercrómico*, es decir, un incremento de la intensidad del color rojo mostrado por el vino tinto con copigmentación.
- Un efecto *batocrómico*, es decir, un viraje hacia tonalidades más azuladas del color rojo del vino tinto.

Ambos efectos se suelen manifestar simultáneamente en los vinos tintos, sobre todo en los jóvenes, en diverso grado, según la composición fenólica y las relaciones molares de copigmento/pigmento que de forma particular se establecen en un vino (Hermosín Gutiérrez, 2007).



**Figura 7: Copigmentación (antocianinas copigmentadas).** Formación de un complejo de copigmentación a partir de un pigmento (antocianina monomérica en su forma de catión flavilio) y de un copigmento (flavonol) (Extraída de Hermosín Gutiérrez, 2007).

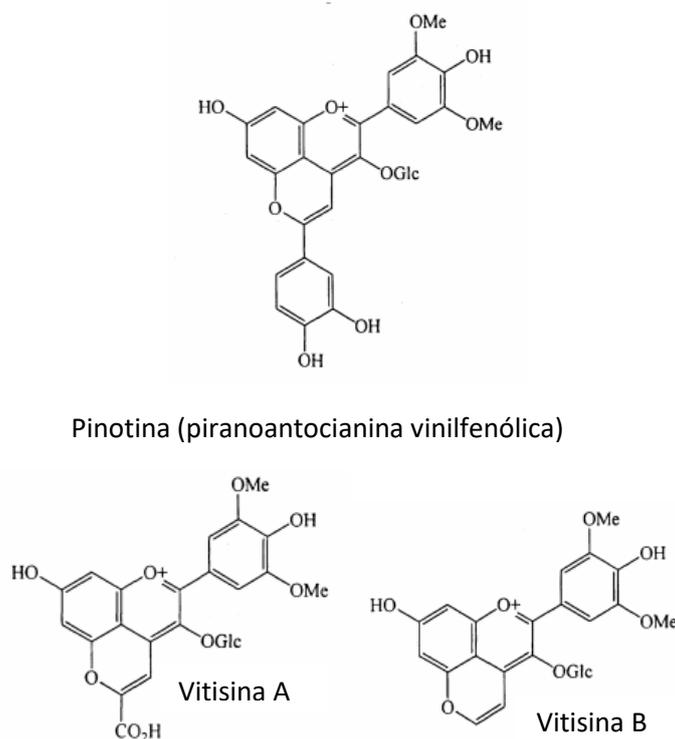
La formación de pigmentos poliméricos se produce por uniones covalentes entre las antocianinas monoméricas y los compuestos fenólicos mayoritarios de los vinos tintos, los flavanoles (taninos). En principio, son posibles dos tipos de pigmentos poliméricos, tipo A-T y tipo T-A (Figura 8). Se sabe que el acetaldehído (un metabolito secundario de las levaduras, y un producto que también se forma lentamente en la crianza en barrica de roble por oxidación química del etanol) acelera la formación de estos pigmentos antociánicos poliméricos, actuando de nexo entre las antocianinas y los taninos (Jackson, 2014). La evolución del rojo púrpura al rojo anaranjado y su estabilización, la escasa respuesta al dióxido de azufre y a cambios del pH del color de los vinos tintos durante su envejecimiento han sido atribuidas clásicamente a la formación de pigmentos poliméricos.



**Figura 8: Pigmentos poliméricos (antocianinas pigmentadas).** Estructuras de los pigmentos poliméricos resultantes de la unión entre monómeros de antocianinas y taninos. El tipo A-T es resistente a la decoloración por dióxido de azufre. (Extraída de Hermosín Gutiérrez, 2007).

### 1.2.2 Influencia de levaduras y bacterias lácticas sobre el color del vino

El color del vino está fuertemente influenciado por la variedad y calidad de las uvas, por la microbiota fermentativa y por las prácticas enológicas asociadas al proceso de vinificación (McRae y col., 2018). Está documentado que las levaduras, durante la FA, pueden afectar el color del vino de una manera cepa dependiente promoviendo la formación de pigmentos estables mediante la producción y liberación de metabolitos capaces de favorecer la formación de pigmentos poliméricos clásicos (acetaldehído) así como de promover la síntesis de un nuevo tipo de pigmentos de antocianinas denominados piranoantocianinas, de los cuales los dos grupos más conocidos son las piranoantocianinas vinilfenólicas y las vitisinas (Figura 9) (Morata y col., 2016; Wang y col., 2018; Topić Božič y col., 2019).



**Figura 9:** Piranoantocianinas derivadas de malvidina-3-glucósido identificadas en vino (Extraídas de Morata y col. 2016).

Adicionalmente, la adsorción de pigmentos por las paredes de las células de levadura (Morata y col., 2016; Topić Božič y col., 2019) y la presencia de cierto tipo de actividades enzimáticas hidrolíticas como las  $\beta$ -glicosidasas tanto en levaduras (Suarez-Lepe y Morata, 2012) como en BAL pueden reducir la concentración de antocianinas impactando negativamente sobre el color del vino, especialmente en las variedades con problemas por su baja intensidad de color como Pinot noir, la variedad emblemática de la norpatagonia (Weizman, 2009). Aunque en menor grado, también se han observado efectos sobre el color debido a la producción o consumo de ácidos orgánicos por parte de levaduras y BAL (Morata y col., 2016).

## 2. FUNDAMENTACIÓN

En los últimos años del siglo pasado, la vitivinicultura nacional recuperó el lugar de relevancia que históricamente tuvo dentro de las agroindustrias. En la región del Comahue, ubicada en la Patagonia Norte a 40° latitud Sur, esto se tradujo en una significativa reactivación de la actividad en las áreas productivas históricas (Alto Valle de Río Negro) y en el desarrollo de nuevas áreas (Departamento de Añelo provincia del Neuquén). La región es una de la más australes de la Argentina y del mundo y se extiende por debajo del río Colorado (entre 37°5' y 40°5' de latitud sur), abarcando las provincias de Neuquén y Río Negro (Figura 10).



**Figura 10: Zonas vitícolas de la Patagonia Norte Argentina (en verde).** Informe INV, Mayo de 2015.

En esta zona, pueden obtenerse buenos viñedos a una baja altitud (300 m sobre el nivel del mar); además se caracteriza por poseer condiciones edafoclimáticas adecuadas para el desarrollo de una viticultura de calidad (suelos aluviales, gran amplitud térmica en la etapa de maduración de las bayas, notable luminosidad, escasas lluvias y baja humedad) con excelentes condiciones fitosanitarias (Llorente y Casazza, 2005) fundamentales para la elaboración de vinos de alta gama.

No obstante, la actividad vitivinícola regional, mayoritariamente orientada a la producción de vinos tintos jóvenes y secos (80%) (Catania y Avagnina, 2010), sigue utilizando vinificaciones conducidas por cultivos iniciadores foráneos para la elaboración de sus vinos.

Los cultivos comerciales de la fermentación alcohólica que actualmente se encuentran en el mercado están compuestos mayoritariamente por cepas de levaduras aisladas de las zonas vitivinícolas más importantes del mundo, sólo uno la Tango (ex INTA 01) procede de un terroir argentino (Valle de Uco, Mendoza) y es comercializada esporádicamente.

Con el objetivo de contar con cultivos iniciadores autóctonos de la región se caracterizó la biota microbiana asociada a viñedos, bodegas y entornos de vinificaciones en tinto de la región del Comahue (Del Mónaco y col., 2016a; Valdés La Hens y col., 2015), constituyéndose una importante colección de cepas locales de *Saccharomyces* y non-*Saccharomyces* y BAL que permitieron seleccionar cepas con propiedades adecuadas para su uso como cultivos iniciadores para enología (Bravo Ferrada y col., 2011; Del Mónaco y col., 2014a y b; Brizuela y col., 2018).

La sustitución de los cultivos iniciadores foráneos por estos cultivos autóctonos permitirá la elaboración de productos de calidad controlada y diferencial, en los que se expresen las características distintivas del terruño patagónico, agregando valor a la vitivinicultura regional y mejorando su capacidad de competencia en los mercados interno e internacional. Como previamente se señaló, el color del vino es uno de los atributos más apreciados por el consumidor y adicionalmente es, junto con el grado alcohólico, uno de los parámetros que establecen el valor comercial en los vinos tintos de traslado o ventas a granel. Por su importancia, la influencia sobre este atributo es, actualmente, un criterio de selección de levaduras para uso enológico (Suárez–Lepe y Morata, 2012).

### 3. OBJETIVO DEL TRABAJO

Caracterizar el color de vinos elaborados con variedades tintas de *Vitis vinífera* L. mediante vinificaciones conducidas por cultivos iniciadores autóctonos de la Patagonia Norte, y su relación con la formulación de los cultivos, con la variedad de uva, con la escala de elaboración y con la preferencia observada en los consumidores

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Microorganismos

#### Cepas de microorganismos ensayadas

*Saccharomyces cerevisiae* F8 (ScF8) y *Pichia kudriavzevii* I15 (Pk15), caracterizadas como autóctonas de la Patagonia Argentina (Del Mónaco y col., 2014a; Del Mónaco y col., 2016b) y seleccionadas por sus características metabólicas de interés enológico (Del Mónaco y col., 2014a y b);

*Saccharomyces cerevisiae* F15 (ScF15), cultivo comercial de Laffort muy utilizado en esta zona austral para llevar a cabo las vinificaciones en tintos;

*Oenococcus oeni* UNQ31 (Oe31), también autóctona de la Patagonia Norte y seleccionada por sus adecuadas propiedades para uso enológico (Bravo Ferrada y col., 2011).

#### Preparación de los inóculos microbianos

Las cepas de levaduras autóctonas de la especie *S. cerevisiae* como *P. kudriavzevii*, fueron almacenadas en caldo GPY (glucosa 20 g L<sup>-1</sup>, peptona 20 g L<sup>-1</sup>, extracto levadura 10 g L<sup>-1</sup> y pH 5,9) con 30% de glicerol a -80 °C, se activaron transfiriéndolas sucesivamente a recipientes conteniendo 10 ml y 100 mL de caldo GPY e incubados a 25±2 °C durante 24 h en aerobiosis. Posteriormente, para continuar con la propagación y aclimatación, las levaduras se transfirieron a un 1L de mosto de uvas Pinot noir o Malbec estéril (esterilizado en autoclave a 100°C durante 30 min) e incubado con agitación en las mismas condiciones. Finalmente, para las vinificaciones a escala piloto (vendimias 2015 al 2017) se realizó el pie de cuba, para cada levadura activada, inoculando las levaduras aclimatadas en el mosto a un recipiente que contenía 10 L de mosto Pinot noir ó Malbec sulfitado, los que se dejaron a temperatura ambiente hasta que la concentración de células de levaduras fuera del orden de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> - 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Para las vinificaciones a escala industrial (15.000 L, vendimias 2019 y 2021) se utilizaron las levaduras autóctonas en la forma de biomasa húmeda propagada en un Biorreactor BIOFLO 415 SIP utilizando extracto de bagazo de manzana (EBM) como sustrato (Bravo, 2020).

Las levaduras comerciales en todos los casos se propagaron siguiendo las instrucciones del proveedor.

La cepa BAL *O. oeni* 31 conservada en caldo MLO ( $\text{g L}^{-1}$ : triptona 10g; extracto de levaduras 5g; glucosa 10g; fructosa 5g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2g;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,05g; citrato amónico dibásico 3,5g; Tween 80 1ml; cisteína HCL 0,5g; jugo de tomate 100ml; pH 4,8) (Caspritz y Radler, 1983) en 30% de glicerol a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , se activó en una placa con agar MLO y se incubó a  $28 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  en una jarra para anaerobiosis durante 7 días. Después de verificar la pureza del cultivo por métodos clásico y moleculares (Rodas y col., 2003) se activó en 10 mL de caldo MLO incubado en anaerobiosis a  $28\text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 días, posteriormente se propagaron en 100 mL del mismo caldo en las mismas condiciones de incubación, y finalmente se aclimató en 1 L de medio de aclimatación (Accl) según Bravo-Ferrada y colaboradores (2013) y en las mismas condiciones de cultivo.

## 4.2 Vinificaciones

Las vinificaciones se realizaron a escala piloto (200 L) durante las vendimias 2015 al 2017 e industrial (15.000 L) durante la vendimia 2019 y 2021 utilizando mostos patagónicos industriales Pinot Noir (2015-2016), Malbec (2015 al 2017, 2019 y 2021) sulfitados como sustratos.

En los ensayos a escala piloto se siguieron cinco protocolos de vinificaciones conducidas por:

- a) el cultivo puro constituido por la cepa autóctona ScF8, sembrado con una densidad del inóculo de manera de obtener  $10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC)  $\text{mL}^{-1}$  de mosto a fermentar;
- b) el cultivo mixto LEV-LEV: *Sacch-non-Sacch*, constituido por las cepas autóctonas ScF8 y Pk15 inoculadas simultáneamente (co-cultivo) y en una relación 1:100 de densidades celulares ( $10^4:10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de mosto a fermentar) (del Mónaco y col., 2012);
- c) por el cultivo mixto LEV-BAL: *Sacch-Oenococcus*, constituido por las cepas autóctonas ScF8 y Oe31 inoculadas secuencialmente y en densidades celulares de  $10^6$  y  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de mosto a fermentar y vino joven, respectivamente;
- d) por el cultivo comercial *Saccharomyces cerevisiae* F15 (Laffort), inoculada en densidades celulares de  $10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de mosto a fermentar.

- e) por el cultivo mixto LEV-BAL: comercial-autóctono, constituido por la cepa comercial ScF15 y la cepa autóctona Oe31 inoculadas secuencialmente y en densidades celulares de  $10^6$  y  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de mosto a fermentar y vino joven, respectivamente;

Las vinificaciones industriales se condujeron con los cultivos puro y mixto de levaduras autóctonas y con el cultivo comercial como se describió previamente (protocolos a, b y d, respectivamente).

Los vinos elaborados con el cultivo comercial *S. cerevisiae* F15 se utilizaron como control de los vinos elaborados con el cultivo puro autóctono (ScF8) y con el mixto ScF15-Oe31 y los vinos elaborados con el cultivo puro ScF8 se utilizaron como control de los elaborados con los cultivos mixtos autóctonos ScF8-Pk15 y ScF8-Oe31.

A escala piloto, las fermentaciones alcohólicas (FAs) se desarrollaron a  $23\pm 2$  °C hasta sequedad de los mostos (azúcares reductores totales  $\approx 2$  g L<sup>-1</sup>). La cinética de las FAs se siguió diariamente por evolución de los °Bmé y °Brix, y hacia el final, mediante la cuantificación de los azúcares reductores totales (ART) aplicando el método de Fehling-Causse-Bonnans. Los vinos se trasegaron y se transfirieron a tanques de 50 L de capacidad se inocularon con Oe31 y se mantuvieron a  $20\pm 2$  °C para permitir el desarrollo de la fermentación maloláctica (FML). En las vinificaciones 2015 y 2016, inoculadas con los cultivos puros (ScF8 y ScF15) y el mixto LEV-LEV, las FMLs se desarrollaron espontáneamente en las mismas condiciones de temperatura que las conducidas. En la vinificación 2017 se desarrollaron dos fermentaciones, una sin FML (FML inhibida) y otra con FML conducida por la BAL nativa. La inhibición de la FML se realizó mediante la adición de elevadas concentraciones de dióxido de azufre garantizando 45 ppm de SO<sub>2</sub> libre. La evolución de las FMLs se controló mediante la determinación del contenido del ácido málico por método enzimático (ácido L(-) málico, Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland) o HPLC.

Finalizadas las vinificaciones los vinos se filtraron, y una vez estabilizados se les ajustó su concentración de SO<sub>2</sub> libre a  $\approx 40$  mg L<sup>-1</sup> y se embotellaron.

En las vinificaciones a escala industrial, las FAs se desarrollaron en las piletas propias de la bodega (15.000 L) a  $23\pm 2$  °C hasta sequedad de los mostos (ART  $\approx 2$  g L<sup>-1</sup>). La cinética de las FAs se siguió por determinación de los °Bmé y °Brix. Seguidamente, los vinos fueron descubados y transferidos a otras piletas de igual

tamaño y mantenidos a  $20\pm 2$  °C para permitir el desarrollo de la FML que se llevó a cabo en forma espontánea. Finalmente, los vinos se filtraron, estabilizaron y embotellaron.

La implantación de las cepas de levaduras se siguió por recuento de colonias en placas de YEPG agar (glucosa 20 g L<sup>-1</sup>, peptona 20 g L<sup>-1</sup>, extracto levadura 10 g L<sup>-1</sup>, agar 20 g L<sup>-1</sup> y pH 5,9) y posterior identificación a nivel de especie mediante el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos a partir de amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región del genoma que comprende el gen del RNA ribosomal 5.8S y sus espaciadores internos transcribibles (ITS1-5.8S DNAr -ITS2) y su posterior digestión con las endonucleasas CfoI, HaeIII y HinfI (Esteve Zarzoso y col., 1999). La implantación de la BAL se controló por recuento en agar RMS y posterior identificación a nivel de especie por RFLP-PCR de un fragmento del gen de la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa (rpoB) utilizando las endonucleasas AclI and HinfI (Claisse y col., 2007).

Finalmente, el análisis de la dinámica de las poblaciones de *S. cerevisiae* y *O. oeni* asociadas a los procesos de vinificación se caracterizó por análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción obtenidos a partir del DNA mitocondrial con la endonucleasa Hinf I (Querol y col., 1992) y por la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) utilizando el iniciador Coc (5'-AGCAGCGTGG-3') (Cocconcelli y col., 1995), respectivamente. La implantación de todas las cepas fue mayor al 80% (Curilén y col. 2017).

### 4.3 Análisis de los Vinos

#### 4.3.1 Análisis fisicoquímicos

La evaluación fisicoquímica de los vinos se realizó utilizando la metodología oficial del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV).

**4.3.1.1 Determinación de azúcares reductores totales (ART).** Se realizó mediante el método de Fehling–Causse- Bonnans (Bordeu y col., 2000).

**4.3.1.2 Determinación del pH.** Se realizó por potenciometría empleando un pH-metro digital Oakton Ion 510 Series ORION RESEARCH 231 (Orión Research Incorporated, Cambridge, MA) con electrodo de pH rango de 0 a 14.

**4.3.1.3 Determinación de alcohol, glicerol y ácidos orgánicos.** El contenido de alcohol etílico, glicerol y ácidos orgánicos (málico, láctico y acético), se determinó por

HPLC en un Agilent 1260 dotado del software OPEN Lab CHEMSTATION y detectores por arreglo de diodos ( $\lambda = 214\text{nm}$ ) y por refractometría ( $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$ ) utilizando una columna HIPLEX H con guarda columna y un flujo isocrático de 100%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,001M como fase móvil con una velocidad de flujo de  $0,4\text{ mL min}^{-1}$  y una temperatura de columna de  $75\text{ }^\circ\text{C}$ .

El glicerol y el ácido L(-) málico también se determinaron enzimáticamente (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland).

**4.3.1.4 Determinación de anhídrido sulfuroso total y libre ( $\text{SO}_2$ ).** El anhídrido sulfuroso total y libre se determinaron mediante el método de Ripper (Delanoë, 2003) y se expresan como  $\text{mg de SO}_2\text{ L}^{-1}$ .

### 4.3.2 Análisis de los componentes del Color

**4.3.2.1 Parámetros Cromáticos.** Las muestras de vino fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de tamaño de poro 0,45 y los parámetros de color en los vinos fueron analizados a partir de los valores de las absorbancias presentadas por las muestras a tres longitudes de onda:  $\lambda = 420\text{ nm}$  (tonos amarillos),  $\lambda = 520\text{ nm}$  (tonos rojos) y  $\lambda = 620\text{ nm}$  (tonos azules), de acuerdo a lo propuesto por Glories (1984) y Pérez - Magariño y González - San José (2002), conforme a las siguientes ecuaciones:

➤ **Intensidad de Color:**  $\text{ICM} = A_{420\text{ nm}} + A_{520\text{ nm}} + A_{620\text{ nm}}$

➤ **Tinte:**  $T = A_{420\text{ nm}} / A_{520\text{ nm}}$

➤ **Índice de color:**  $\text{IC} = (\text{ICM} / T) \cdot 1000$

➤ **Porcentaje de Amarillo:**  $A_m (\%) = (A_{420\text{ nm}} \times 100) / \text{ICM}$

➤ **Porcentaje de Rojo:**  $R (\%) = (A_{520\text{ nm}} \times 100) / \text{ICM}$

➤ **Porcentaje de Azul:**  $A_z (\%) = (A_{620\text{ nm}} \times 100) / \text{ICM}$

➤ **Porcentaje de Brillo:**  $B (\%) = 1 - \left( \frac{A_{420} + A_{620}}{2 \times A_{520}} \right) \times 100$

**4.3.2.2 Cuantificación de Polifenoles Totales (PT).** Las determinaciones se realizaron en vinos previamente filtrados y ajustados a pH 3,6 utilizando un espectrofotómetro SHIMADZU modelo UV-1800. Cada muestra de vino se diluyó 1/50 y las absorbancias se midieron a 280 nm frente a un blanco de agua destilada en una celda de cuarzo de 1 cm de paso. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico L<sup>-1</sup> mediante curva de calibración usando como patrón ácido gálico en un rango de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup>.

**4.3.2.3 Cuantificación de los Ácidos Hidroxicinámicos Totales.** Se determinó mediante una modificación de la metodología descrita por Dao y Friedman (1992). Alícuotas de 50 µL de cada muestra fueron llevadas a volumen (2 mL) con etanol absoluto y se les determinó la absorbancia a 320 nm. Se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico en un rango de 5 - 40 µg en el volumen final de reacción. Los valores se expresaron como mg de ácido clorogénico L<sup>-1</sup>.

**4.3.2.4 Cuantificación de Flavonoles.** Las lecturas de absorbancia se realizaron a 360 nm y además se construyó una curva de calibración con el flavonol rutina como patrón en un rango de concentración de 10 - 50 µg mL<sup>-1</sup>. El contenido de los flavonoles fue expresado como mg rutina L<sup>-1</sup>.

**4.3.2.5 Cuantificación de Antocianinas.** Se cuantificaron las antocianinas monoméricas mediante el método de pH diferencial reportado por Wrolstad y Giusti (2001). La antocianina experimenta una transformación reversible en función del pH manifestado por un cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4,5. Alícuota de 1 ml de cada muestra de vino se llevó a pH 1 y a pH 4,5 mediante el agregado de 4 ml de una solución reguladora de cloruro de potasio 0,025 M y de acetato de sodio 0,4 M, respectivamente. Las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente y al resguardo de la luz durante 15 minutos y se procedió a medir la absorbancia a 520 nm (máxima longitud de onda donde absorben los pigmentos antociánicos) y 700 nm (para eliminar absorbancia dada por la turbidez). Los resultados finales se expresaron como miligramos de cianidina-3-glucósido L<sup>-1</sup> de vino conforme a los cálculos que se describen a continuación:

$$\text{➤ } A \text{ (absorbancia muestra diluida)} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=4,5}$$

$$\text{➤ } \text{Antocianinas (mg/L)} = \frac{(A \times PM \times D \times 1.000)}{\xi \times L}$$

Dónde: PM = peso molecular de cianidina-3-glucósido, 449,2 g mol<sup>-1</sup>

D = factor de dilución.

$\xi$  = coeficiente de absortividad molar, 26.900 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

L = camino óptico, 1 cm.

1000 = factor para pasar de g a mg.

**4.3.2.6 Cuantificación de las fracciones de Antocianinas.** Las fracciones y porcentajes de antocianinas libres o monomérica (AM), copigmentadas (AC) y poliméricas (AP) se determinaron usando el método modificado de Boulton (Mazza y col., 1999). Este método consiste en ajustar el pH del vino a 3,6, filtrarlo a través de un filtro de jeringa de tamaño de poro 0,45 y fraccionarlo en tres alícuotas de 2 mL cada una, una alícuota se diluye 1:20 con vino sintético ( $A_{vino}$ ), otra es adicionada con 20  $\mu$ L de acetaldehído al 10% (v/v) y se la deja reposar a temperatura ambiente 45 min ( $A_{acet}$ ) y a la tercera se le añaden 160  $\mu$ L de metabisulfito de potasio al 5% (p/v) ( $A_{SO_2}$ ). Seguidamente, se realizan las mediciones de absorbancia a 520 nm en cubeta de 1 mm de paso óptico. Corregida la absorbancia para un camino óptico de 10mm, las diferentes formas de antocianinas se expresaron en unidades de absorbancia del siguiente modo:

➤ **Fracción de Antocianinas Monoméricas, AM =  $A_{vino} - A_{SO_2}$**

➤ **Fracción de Antocianinas Copigmentadas, AC =  $A_{acet} - A_{vino}$**

➤ **Fracción de Antocianinas Poliméricas, AP =  $A_{SO_2}$**

➤ **Fracción de Antocianinas Totales =  $A_{acet}$**

Adicionalmente, se calculó la distribución porcentual de las diversas formas como:

➤ **% Antocianinas Copigmentadas, AC =  $\frac{[(A_{acet} - A_{vino})]}{A_{acet}} \times 100$**

➤ **% Antocianinas Monoméricas, AM =  $\frac{[(A_{vino} - A_{SO_2})]}{A_{acet}} \times 100$**

➤ **% Antocianinas Poliméricas, AP =  $\frac{[A_{SO_2}]}{A_{acet}} \times 100$**

### 4.3.3 Análisis Sensorial

La calidad sensorial de los vinos se evaluó mediante análisis descriptivo y cata realizados por un panel de expertos pertenecientes al INTI Villa Regina conforme a las normativas IRAM 20005, 20006 (1996) y 20012 (1997). En el análisis sensorial descriptivo se cuantificó la intensidad de los distintos atributos sensoriales utilizando una escala de 1= no intensidad a 10 = intensidad extrema. En la cata los rangos de puntuación utilizados son defectuoso <4; [4,5) regular; [5,6) correcto; [6,7) bueno; [7,8) muy bueno;  $\geq 8$  excelente.

Las pruebas de preferencia de los consumidores se realizaron durante los eventos de la Semana del Emprendedor Tecnológico (Setiembre 2015), Bariloche a la carta (Octubre 2017), 39° Fiesta Provincial de la Vendimia (Marzo 2018). La prueba consiste en una degustación a ciegas donde los vinos codificados con diferentes letras (A, B, C...), se presentan en diferentes ubicaciones, debiendo el consumidor asignarle a cada vino un valor 1, 2, 3... según su preferencia. Uno, el preferido en primer lugar, dos en segundo lugar, tres en tercer lugar y así sucesivamente. El promedio obtenido para cada vino es más cercano a uno cuanto mayor es su preferencia.

### 4.3.4 Análisis Estadístico

La significancia de los tratamientos realizados sobre las variables consideradas se realizó por análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de Tukey de la diferencia significativa honesta (prueba de Tukey HSD) considerándose significativas diferencias con  $p < 0,05$ . En caso de no cumplirse los supuestos del modelo (homocedasticidad de las varianzas, normalidad, e independencia de los datos) se utilizó un modelo lineal generalizado y/o un modelo mixto y prueba de comparaciones múltiples de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) (Di Rienzo y col., 2002). Todos los análisis estadísticos se realizaron a través del software INFOSTAT (Di Renzo y col., 2020) y están específicamente indicados en cada Tabla y Figura.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 VINIFICACIONES A ESCALA PILOTO

Durante las vendimias 2015 al 2017 se realizaron vinificaciones a escala piloto (200 L) de mostos patagónicos Pinot noir y Malbec conducidas con el cultivo iniciador autóctono de la FA ScF8 y su respectivo control ScF15 (cultivo iniciador comercial provisto por Laffort). Debido a que los mostos tintos Patagónicos contienen cantidades relativamente elevadas de ácido L(-) málico (Caballero y col., 2005), se ensayaron adicionalmente vinificaciones conducidas con cultivos autóctonos mixtos constituidos por la cepa ScF8 acompañada, en la forma de co-cultivo, por la cepa de *P. kudriavzevii* Pk15 capaz de consumir ácido málico (Del Mónaco y col., 2014b) o por la cepa BAL Oe31 con capacidad de conducir la FML (inoculación secuencial). Una vinificación conducida por el cultivo mixto comercial-autóctono ScF15-Oe31 también fue realizada. En estas vinificaciones las levaduras autóctonas se inocularon en la forma de pie de cuba.

Las Tablas 1 y 2 muestran los promedios de los parámetros fisicoquímicos de importancia enológica de los vinos Pinot noir y Malbec elaborados durante las vendimias 2015 y 2016 resultando todos los vinos normales y secos ( $ART \approx 2 \text{ g L}^{-1}$ ). No se observaron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros fisicoquímicos de los vinos analizados, excepto en el contenido de ácido L-málico de los vinos Pinot noir, donde el vino elaborado con el cultivo mixto ScF15-Oe31 presentó el menor contenido de dicho ácido (Tabla 1).

Respecto de los parámetros de color analizados el efecto de los cultivos iniciadores fue diferente según la variedad. Mientras que en los vinos Pinot noir no se observaron diferencias significativas entre los diferentes vinos experimentales y sus controles (Tabla 1), para la variedad Malbec (Tabla 2) los vinos elaborados con el cultivo indígena ScF8 presentan una intensidad de color y un IC significativamente mayor (efecto hiperocrómico) que los elaborados con su control ScF15 y con los cultivos mixtos LEV-LEV y LEV-BAL (Figura 11). Todos los vinos poseen tintes característicos de vinos jóvenes ( $0,60 < T < 0,80$ ).

**Tabla 1:** Caracterización fisicoquímica de vinos Pinot noir elaborados a escala piloto durante las vendimias 2015 y 2016 mediante vinificaciones guiadas con levaduras y bacterias lácticas autóctonas de la Patagonia en la forma de cultivo puro ScF8, mixtos de levaduras ScF8-Pk15 y levaduras-bacterias ScF8-Oe31, su control ScF15 levadura comercial (Laffort) y cultivo mixto comercial-autóctono ScF15-Oe31.

PARÁMETRO	CULTIVO INICIADOR					p
	ScF8 Oe31	ScF8 Pk15	ScF8	ScF15 Oe31	ScF15	
ART (g L <sup>-1</sup> )	2,06 ±0,25	2,25±0,14	1,87±0,18	2,09±0,01	1,95±0,15	ns
Etanol (%v/v)	15,66±0,22	15,66±0,22	15,65±0,49	15,10±0,42	15,65±0,21	ns
pH	3,91±0,13	3,89±0,16	3,92±0,14	3,87±0,19	3,88±0,17	ns
AT*	4,48±0,13	4,52±0,13	4,75±0,28	4,77±0,30	4,70±0,33	ns
AV <sup>#</sup>	0,82±0,14	0,75±0,11	0,69±0,07	0,87±0,24	0,71±0,03	ns
Ac. L-Malic (g L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	0,90±0,15 <sup>ab</sup>	1,02±0,31 <sup>ab</sup>	1,25±0,21 <sup>b</sup>	<b>0,30±0,04<sup>a</sup></b>	1,17±0,24 <sup>b</sup>	<0.05
Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	10,04±0,33	9,94±0,47	10,26±0,44	9,70±0,03	10,09±0,16	ns
SO <sub>2</sub> Total (mg L <sup>-1</sup> )	12±4	11±1	13±0	13,80±6	11±3	ns
SO <sub>2</sub> libre (mg L <sup>-1</sup> )	8±2	7±0	7±1	4,62±2	7±1	ns
IC <sup>♦</sup>	6760±730	7530±560	7440±370	6870±390	6930±400	ns
Intensidad Color	6,14±0,21	6,10±0,23	6,18±0,35	5,86±0,45	5,91±0,35	ns
Tinte	0,913±0,069	0,825±0,076	0,833±0,088	0,854±0,017	0,852±0,003	ns

<sup>1</sup>Contenido de ácido L(-) málico en el mosto inicial: 3,47±0,49 mg L<sup>-1</sup>; ART: azúcares reductores totales; \*AT: Acidez Titulable, expresada como g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico; #AV: Acidez Volátil, expresada como g L<sup>-1</sup> de ácido acético; ♦IC: Índice de color expresado en unidades de absorbancia. ns: no significativo. Superíndices diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas entre los datos (p < 0,05, ANOVA y test de Tukey HSD, n=2). **Nota:** los valores de los parámetros fisicoquímicos, pH y AT en particular, son los observados en los vinos jóvenes antes de la corrección de su acidez; los valores de los parámetros de color los observados después de la corrección de su acidez (pH ≈3,6).



**Figura 11:** Color de los vinos Malbec elaborados en la Vendimia 2015

**Tabla 2.** Caracterización fisicoquímica de vinos Malbec elaborados a escala piloto durante las vendimias 2015 y 2016 mediante vinificaciones guiadas con levaduras y bacterias lácticas autóctonas de la Patagonia en la forma de cultivo puro ScF8, mixtos de levaduras ScF8-Pk15 y levaduras-bacterias ScF8-Oe31, su control ScF15 (levadura comercial Laffort) y cultivo mixto comercial-autóctono ScF15-Oe31.

PARÁMETRO	CULTIVO INICIADOR					p
	ScF8 Oe31	ScF8 Pk15	ScF8	ScF15 Oe31	ScF15	
ART (g L <sup>-1</sup> )	1,59±0,32	1,85±0,78	1,85±0,78	1,73±0,21	1,71±0,04	ns
Etanol (%v/v)	15,00±0,57	14,80±0,14	14,80±0,14	15,17±0,24	15,05±0,07	ns
pH	4,04±0,09	3,87±0,18	3,87±0,18	3,98±0,06	4,07±0,19	ns
AT*	4,61±0,27	4,61±0,21	4,61±0,21	4,61±0,30	4,77±1,07	ns
AV <sup>#</sup>	0,87±0,20	0,62±0,16	0,62±0,16	0,81±0,01	0,73±0,06	ns
Ac. L-Malic (g L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	0,20±0,02	0,19±0,07	0,19±0,07	0,27±0,11	0,26±0,09	ns
Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	10,39±0,24	9,74±0,41	9,74±0,41	10,08±0,18	10,01±0,21	ns
SO <sub>2</sub> Total (mg L <sup>-1</sup> )	17±8	16±4	16±4	16±4	18±6	ns
SO <sub>2</sub> libre (mg L <sup>-1</sup> )	7±1	7±1	7±1	7±1	8±3	ns
IC <sup>♦</sup>	10920±620 <sup>a</sup>	11480±640 <sup>a</sup>	<b>18900±610<sup>c</sup></b>	12500±220 <sup>ab</sup>	16020±510 <sup>b</sup>	<0,01
Intensidad Color	7,78±0,55 <sup>a</sup>	10,54±0,66 <sup>b</sup>	<b>12,95±0,29<sup>c</sup></b>	9,18±0,09 <sup>ab</sup>	10,22±0,74 <sup>b</sup>	<0,05
Tinte	0,698±0,008 <sup>b</sup>	0,665±0,027 <sup>a</sup>	0,648±0,001 <sup>a</sup>	<b>0,738±0,011<sup>b</sup></b>	0,693±0,009 <sup>ab</sup>	<0,05

<sup>1</sup>Contenido de ácido L(-) málico en el mosto inicial: 2,71±0,25 mg L<sup>-1</sup>; ART: azúcares reductores totales; \*AT: Acidez Titulable, expresada como g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico; # AV: Acidez Volátil, expresada como g L<sup>-1</sup> de ácido acético; ♦IC: Índice de color expresado en unidades de absorbancia. ns: no significativo. Superíndices diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas entre los datos (p < 0,05, ANOVA y test de Tukey HSD, n=2). **Nota:** los valores de los parámetros fisicoquímicos, pH y AT en particular, son los observados en los vinos jóvenes antes de la corrección de su acidez; los valores de los parámetros de color los observados después de la corrección de su acidez (pH ≈3,6).

Las Tabla 3 y 4 muestran los resultados de la preferencia de los consumidores por los vinos ensayados. Para los vinos de la variedad Pinot noir, no se observaron diferencias significativas en los vinos elaborados con los cultivos autóctonos. Sin embargo, el vino elaborado con el cultivo mixto ScF15-Oe31 mejoró su preferencia respecto del elaborado con su control ScF15 (Tabla 3), efecto que se repite en los vinos elaborados con la variedad Malbec (Tabla 4). Para ésta variedad los vinos elaborados con el cultivo mixto autóctono ScF8-Pk15 mejoran su preferencia respecto de los elaborados con su control ScF8, resultado consistente con el obtenido de la evaluación mediante cata (Tabla 5).

**Tabla 3:** Ensayos de preferencia por los consumidores de los vinos Pinot noir 2015-2016. (n=85)

TRAT	Medias	E.E.		
ScF15	2,63	0,26	A	
ScF8-Pk15	2,15	0,26		B
ScF15-Oe31	1,85	0,26		B
ScF8	1,73	0,30		B
ScF8-Oe31	1,61	0,29		B

DGC (Alfa=0.10) Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,10$ ).

**Tabla 4:** Ensayos de preferencia por los consumidores del vino Malbec 2015-2016. (n=80)

TRAT	Medias	E.E.		
ScF15	2,20	0,18	A	
ScF8-Oe31	2,15	0,19	A	
ScF8	2,10	0,20	A	
ScF8-Pk15	1,68	0,25		B
ScF15-Oe31	1,56	0,21		B

DGC (Alfa=0.10). Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,10$ ).

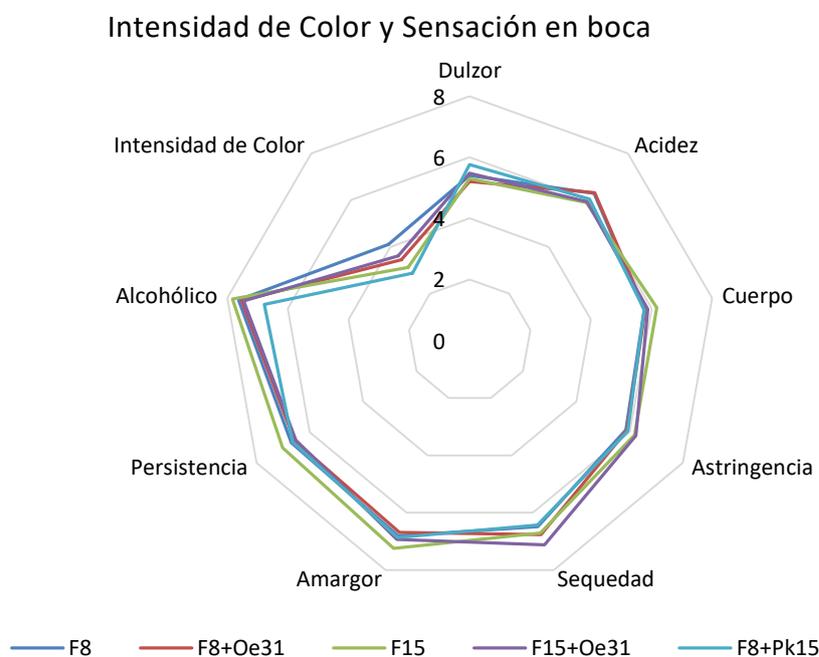
**Tabla 5:** Evaluación mediante CATA, Vinos Malbec 2015-2016 (Informe INTI 2016, n=19).

Cultivo Iniciador	Fase visual	Fase olfativa	Fase gustativa	Astringencia	Equilibrio	Val. global	Clasificación
ScF8	8,88	5,75	6,25	5,88	5,69	5,56	Correcto
ScF8-Pk15	8,81	5,56	6,56	6,38	6,06	6,13	Bueno
ScF8-Oe31	8,30	5,92	6,00	6,52	5,70	5,52	Correcto

La Figura 12 muestra los resultados del análisis sensorial descriptivo cualitativo que se realizó sobre los vinos Malbec. Se puede apreciar que los vinos elaborados con el cultivo mixto autóctono ScF8-Pk15 poseen menor intensidad de color y grado alcohólico y mayor dulzor, características que podrían determinar su mayor

preferencia por parte de los consumidores, mientras que los vinos elaborados con el cultivo puro autóctono ScF8 solo presentaron una mayor intensidad de color.

### Análisis Sensorial Descriptivo



**Figura 12:** Intensidad de color y sensación en boca de los vinos Malbec 2015.

Los resultados hasta aquí presentados fueron determinantes para seguir trabajando con la variedad Malbec ya que, además de ser el vino que más se produce en la región, se vio mejorado en sus características sensoriales por los cultivos iniciadores autóctonos.

Adicionalmente, para determinar cuál es la influencia de la levadura Pk15 sobre el contenido de ácido L(-) málico, en la vendimia 2017 se decidió inhibir la FML mediante sulfitado (100 ppm de dióxido de azufre total). Los parámetros fisicoquímicos y de color de los vinos elaborados con y sin FML, todos normales y secos, se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6:** Caracterización fisicoquímica de vinos Malbec elaborados a escala piloto en la vendimia 2017 mediante vinificaciones guiadas con el cultivo iniciador autóctono puro ScF8 y mixtos ScF8-PK y ScF8-Oe31, con el cultivo puro comercial ScF15 y mixto ScF15-Oe31.

PARÁMETRO	Sin FML			Con FML (Oe31)		p
	ScF15	ScF8	ScF8-Pk15	ScF15	ScF8	
ART (g L <sup>-1</sup> )	2,00±0,8	1,80±0,31	1,61±0,21	1,85±0,07	2,01±0,11	ns
Etanol (% v/v)	11,94±1,56	13,26±0,27	13,42±0,22	13,3±0,21	13,5±0,12	ns
pH	3,67±0,03 <sup>a</sup>	3,72±0,02 <sup>a</sup>	3,83±0,02 <sup>b</sup>	3,80 ±0,03 <sup>b</sup>	3,95±0,06 <sup>c</sup>	<0,05
AT*	6,36±0,20 <sup>c</sup>	5,95±0,14 <sup>b</sup>	5,75 ±0,21 <sup>b</sup>	5,60±0,45 <sup>b</sup>	4,15±0,26 <sup>a</sup>	<0,05
AV <sup>#</sup>	0,38±0,03	0,38±0,05	0,48±0,11	0,41±0,11	0,51±0,14	ns
Ac. L(-)Malic (g L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	3,44±0,25 <sup>b</sup>	2,77±0,31 <sup>b</sup>	<b>0,73±0,31<sup>a</sup></b>	0,89±0,15 <sup>a</sup>	0,91±0,15 <sup>a</sup>	<0,01
Glicerol (g/L)	10,42±0,22 <sup>c</sup>	9,38±0,11 <sup>b</sup>	10,71±0,11 <sup>c</sup>	10,12±0,10 <sup>c</sup>	8,41±0,20 <sup>a</sup>	<0,05
IC <sup>♦</sup>	17260±890 <sup>d</sup>	17370±420 <sup>d</sup>	12450±450 <sup>bc</sup>	11190±530 <sup>b</sup>	8050±410 <sup>a</sup>	<0,05
Intensidad Color	<b>12,17±0,49<sup>b</sup></b>	<b>13,14±0,71<sup>c</sup></b>	10,41±0,42 <sup>a</sup>	10,28±0,5 <sup>a</sup>	9,18±0,39 <sup>a</sup>	<0,05
Tinte	0,715±0,12 <sup>c</sup>	0,814 ±0,15 <sup>b</sup>	0,836 ±0,21 <sup>b</sup>	0,919±0,13 <sup>ab</sup>	<b>1,140±0,17<sup>a</sup></b>	<0,05

<sup>1</sup> Contenido de ácido L(-) málico en el mosto inicial: 2,92±0,45 mg L<sup>-1</sup>; ART: azúcares reductores totales; \*AT: Acidez Titulable, expresada como g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico; #AV: Acidez Volátil, expresada como g L<sup>-1</sup> de ácido acético; ); ♦IC: Índice de color expresado en unidades de absorbancia. FML inhibida por adición de bisulfito de potasio. ns: no significativo. Superíndices diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas entre los datos (p < 0,05, ANOVA y test de Tukey HSD, n=2). **Nota:** los valores de los parámetros fisicoquímicos, pH y AT en particular, son los observados en los vinos jóvenes antes de la corrección de su acidez; los valores de los parámetros de color los observados después de la corrección de su acidez (pH ≈3,6).

Los resultados muestran mayores ATs y contenidos de ácido málico y menores pHs en los vinos elaborados con los cultivos iniciadores puros, tanto autóctono como foráneo (Tabla 6), en cuyas vinificaciones se inhibió la FML, evidenciando la efectividad del uso de altas concentraciones de bisulfito para inhibir la FML Sin embargo, la vinificación conducida por el cultivo mixto ScF8-Pk15, cuya FML también fue inhibida por el agregado de bisulfito, rindió vinos que presentaron el menor contenido de ácido L-málico y valores de AT y pH similares a los vinos obtenidos en vinificaciones donde la FML fue conducida por Oe31 exitosamente, evidenciando la influencia de la levadura non-*Saccharomyces P. kudriavzevii* sobre la estructura ácida del vino. Este resultado es consistente con la capacidad demostrada por esta cepa autóctona de la región (Del Mónaco y col., 2016b) de consumir ácido málico en condiciones de laboratorio (Del Mónaco y col., 2014b).

Respecto del color, la cepa autóctona ScF8 tuvo un efecto significativo sobre el IC y la intensidad de color de los vinos de forma similar al observado en las vendimias 2015 y 2016 (efecto hiperocrómico), pero adicionalmente los vinos elaborados en el

2017 también mostraron un aumento de la absorbancia a 420 nm (efecto hipsocrómico) que determinó un aumento significativo de sus tintes respecto del control (ScF15) (Tabla 6 y Figura 13), pudiendo estar relacionado con características metabólicas particulares de la cepa autóctona frente al sulfitado.

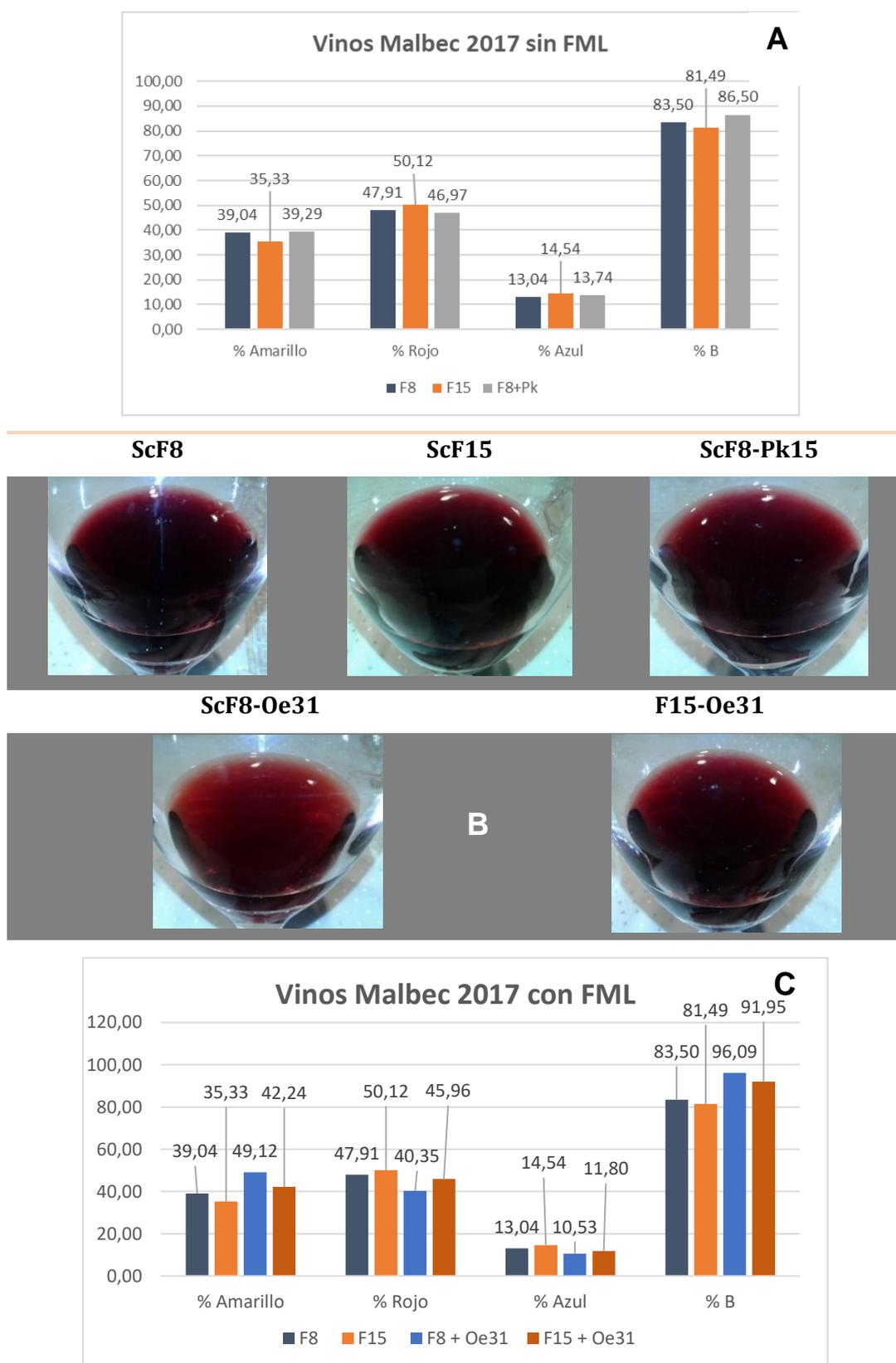
Respecto de los vinos elaborados con los cultivos mixtos, todos presentan menor intensidad de color que sus respectivos controles. Este resultado es consistente con lo observado en los vinos 2015-2016, aunque ahora la diferencia es significativa, y podría atribuirse a la presencia de actividades glicosidasas tanto en el cultivo adjunto Pk15 (Del Mónaco y col., 2016b) como en la BAL autóctona (Bravo Ferrada y col., 2011).

Adicionalmente, los tintes de los vinos elaborados con los cultivos mixtos LEV-BAL fueron significativamente mayores que los de sus controles debido a un aumento de sus absorbancias a 420 nm concomitantemente con una disminución a 520 nm (Figura 13), efecto que fue más pronunciado en los vinos elaborados con la dupla autóctona

La Tabla 7 muestra los resultados del análisis sensorial descriptivo realizado con los vinos Malbec 2017. Los vinos elaborados con el cultivo autóctono puro ScF8 presentaron la mayor intensidad de color mientras que los elaborados con el cultivo mixto LEV-BAL nativo ScF8-Oe31 presentaron una menor intensidad de este atributo, resultados consistentes con los obtenidos por espectrofotometría.

Adicionalmente, los vinos elaborados con el cultivo mixto ScF15-Oe31 resultaron tener la menor acidez y los elaborados con el cultivo mixto ScF8-Pk15 el mayor dulzor.

Finalmente, las Tablas 8 A y B muestran los resultados de los ensayos de preferencia por los consumidores realizados en dos días diferentes donde, en un primer día se evaluaron los vinos sin FML (8A) y en un segundo día los vinos elaborados con y sin FML (8B). Estas tablas evidencian que los vinos más preferidos por los consumidores fueron los elaborados con los cultivos mixtos ScF8-Pk15 y ScF15-Oe31 y el elaborado con el cultivo puro ScF8. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en la valoración mediante cata (Tabla 9) y con resultados obtenidos en el test de preferencia para los vinos Malbec elaborados en las vendimias 2015-2016.



**Figura 13: Vendimia 2017.** Color (B) y absorbancias relativas a 420nm (% amarillo), 520nm (% rojo) y 620nm (% azul) y porcentaje de brillo de vinos Malbec con FML (A) y sin FML (C)

**Tabla 7:** Análisis Sensorial Descriptivo de los vinos Malbec 2017

Cultivo Iniciador	Intensidad de Color <sup>♦</sup>		Dulzor <sup>*</sup>		Acidez <sup>φ</sup>	
	Media ± E.E	n	Media ± E.E	n	Media ± E.E	n
ScF8	3,09±0,06 <sup>d</sup>	23	4,69±0,16 <sup>ab</sup>	21	5,90±0,18 <sup>ab</sup>	21
ScF8-Pk15	2,95±0,06 <sup>c</sup>	21	4,79±0,16 <sup>b</sup>	21	5,83±0,18 <sup>ab</sup>	21
ScF8-Oe31	2,24±0,06 <sup>a</sup>	22	4,42±0,16 <sup>ab</sup>	22	5,85±0,18 <sup>ab</sup>	21
ScF15-Oe31	2,68±0,06 <sup>b</sup>	22	4,70±0,16 <sup>ab</sup>	22	5,52±0,18 <sup>a</sup>	22
ScF15	2,83±0,06 <sup>bc</sup>	21	4,15±0,16 <sup>a</sup>	23	6,22±0,17 <sup>b</sup>	23

♦ Medias con letras diferentes son significativamente diferentes  $p < 0,001$ , test Tukey, Alfa=0,05, DMS=0,23812. \*Medias con letras diferentes son significativamente diferentes, test Tukey  $p=0,01$ , Alfa=0,05, DMS=0,62798. φ Medias con letras diferentes son significativamente diferentes, test Tukey  $p=0,0166$ , Alfa=0,05, DMS=0,69253.

**Tabla 8:** Ensayos de preferencia por los consumidores de los vinos Malbec 2017

A				B			
TRAT	Medias	n	E.E.	TRAT	Medias	n	E.E.
ScF8-Pk15	2,08	24	0,22	ScF15-Oe31	2,22	69	0,13
ScF8	2,17	24	0,22	ScF8	2,26	69	0,13
ScF15	2,96	24	0,22	ScF8-Oe31	2,54	69	0,13
				ScF15	2,90	69	0,13

Análisis de la varianza y prueba de Tukey,  $\alpha=0,05$ . Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ ).

**Tabla 9:** Evaluación mediante CATA de vinos Malbec 2017 (Informe INTI 2018, n=30)

Cultivo Iniciador	Fase visual	Fase olfativa	Fase gustativa	Astringencia	Equilibrio	Val. global	Clasificación
ScF8-Oe31	7,60	6,73	6,69	6,60	6,27	6,27	Bueno
ScF8-Pk15	7,66	7,31	7,34	7,07	6,96	7,10	Muy Bueno
ScF8	7,69	7,37	7,30	7,33	7,26	7,30	Muy Bueno
ScF15	7,38	7,27	7,27	7,27	7,19	6,96	Bueno

Por todo lo descrito anteriormente se decidió continuar trabajando con las cepas autóctonas ScF8 y Pk15, y la foránea ScF15, como control, para la conducción de la FA a escala industrial utilizando el mismo sustrato (*Vitis vinifera* L, variedad Malbec), pero con las levaduras autóctonas inoculadas en la forma de biomasa húmeda.

## 5.2 VINIFICACIONES A ESCALA INDUSTRIAL

Todos los vinos elaborados a esta escala (vendimias 2019 y 2021), resultaron desde el punto de vista fisicoquímico normales y secos ( $ART \approx 2 \text{ g L}^{-1}$ ) (Tabla 10). El tratamiento estadístico de los datos evidenció que los vinos Malbec elaborados con el cultivo iniciador puro autóctono ScF8 presentan una intensidad de color significativamente mayor (efecto hiperocrómico) que los elaborados con el cultivo comercial (control). Esta hiperocromía se explica por un aumento concomitante de las absorbancias a 520 nm y 420 nm que determina un mayor ICM sin diferencias significativas en los tintes (Tabla 10) y como consecuencia, un aumento también el IC en el vino experimental (ScF8) respecto de su control (Tabla 10).

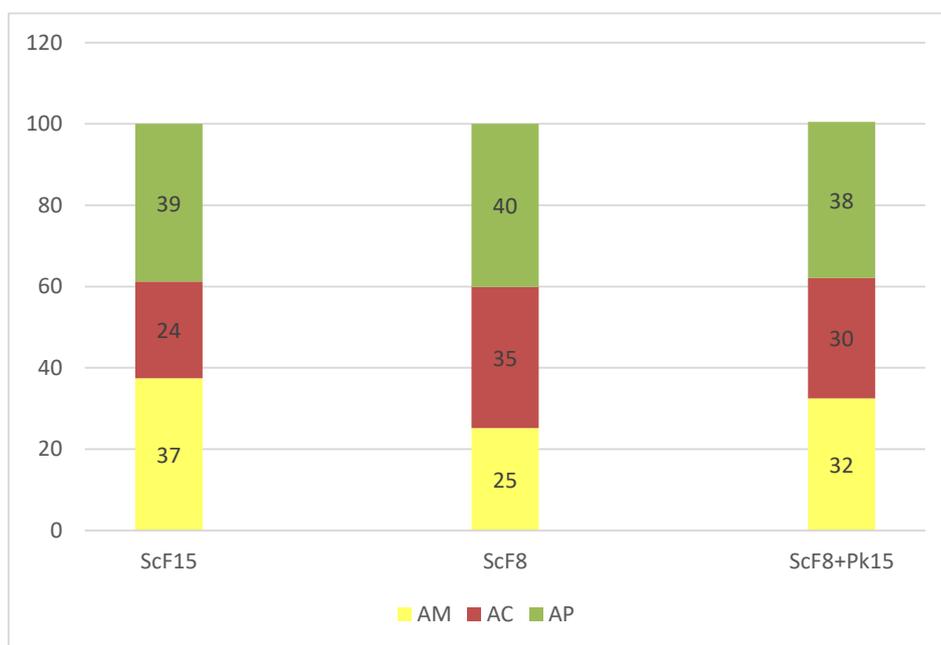
**Tabla 10:** Caracterización fisicoquímica, parámetros de color y composición polifenólica de vinos Malbec elaborados a escala industrial en vendimias 2019 y 2021, mediante vinificaciones conducidas por los cultivos iniciadores nativos ScF8 y Sc F8-Pk15 (co- cultivo) y el comercial ScF15 (Laffort).

PARÁMETRO	Cultivo Iniciador			p
	ScF8	ScF8-Pk15	ScF15	
ART ( $\text{g L}^{-1}$ )	2,07±0,24	1,92±0,15	1,47±1,08	ns
Etanol (% v/v)	13,98±0,34 <sup>a</sup>	<b>12,49±0,87<sup>b</sup></b>	13,78±0,16 <sup>a</sup>	<0,05
pH	3,71±0,15	3,71±0,16	3,68±0,20	ns
AT*	5,17±0,11	5,18±0,21	5,48±0,59	ns
AV <sup>#</sup>	0,40±0,06	0,51±0,43	0,42±0,18	ns
Ác Málico ( $\text{g L}^{-1}$ )	0,455±0,078 <sup>a</sup>	<b>0,078±0,013<sup>b</sup></b>	0,846±0,042 <sup>a</sup>	<0,05
Ác Láctico ( $\text{g L}^{-1}$ )	1,117±0,193 <sup>a</sup>	<b>0,685±0,077<sup>b</sup></b>	1,070±0,212 <sup>a</sup>	<0,05
Glicerol ( $\text{g L}^{-1}$ )	8,410±0,942	8,585±0,615	7,390±0,622	ns
Intensidad color	<b>12,60±0,13<sup>a</sup></b>	10,10±0,14 <sup>b</sup>	10,44±0,33 <sup>b</sup>	<0,05
Tinte	0,695±0,073	0,643±0,067	0,675 ±0,072	ns
IC <sup>♦</sup>	<b>18122±2128<sup>a</sup></b>	15805±1887 <sup>b</sup>	15570±2164 <sup>b</sup>	<0,05
Antocianinas ( $\text{mg L}^{-1}$ )*	675,5±40,70	598,86±49,7	683,50±96,60	ns
Polifenoles Totales ( $\text{mg L}^{-1}$ ) <sup>#</sup>	<b>1064,7±50,2<sup>a</sup></b>	<b>1013,4±19,4<sup>a</sup></b>	886,1±73,5 <sup>b</sup>	<0,05
Ácidos Hidroxicinámicos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) <sup>§</sup>	148,46±20,27	165,01±2,00	139,95±21,43	ns
Flavonoles ( $\text{mg L}^{-1}$ ) <sup>†</sup>	<b>96,76±5,0<sup>a</sup></b>	<b>100,07±3,43<sup>a</sup></b>	82,60±5,89 <sup>b</sup>	<0,05

<sup>1</sup> Contenido de ácido L(-) málico en el mosto inicial: 2,28±0,23  $\text{mg L}^{-1}$ ; ART: azúcares reductores totales; \*AT: Acidez Titulable, expresada como  $\text{g L}^{-1}$  de ácido tartárico; #AV: Acidez Volátil, expresada como  $\text{g L}^{-1}$  de ácido acético; ♦IC: Índice de color expresado en unidades de absorbancia; ns: no significativo. \* expresada como  $\text{mg}$  de cianidina 3-glucósido; # expresados como  $\text{mg}$  de ácido gálico; § expresados como  $\text{mg}$  de ácido clorogénico; † expresados como  $\text{mg}$  de rutina. Superíndices diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas entre los datos ( $p < 0,05$ , DGC,  $n=2$ ).

El agregado del cultivo adjunto Pk15 para constituir el cultivo mixto autóctono iniciador de la FA resultó en vinos con menor intensidad de color sin cambios en el tinte (Tabla 10) y como consecuencia también un menor IC respecto de los elaborados con el cultivo puro ScF8.

Estos resultados son consistentes con los observados a escala piloto (Tablas 2 y 6). A igual contenido de antocianinas (Tabla 10), el incremento significativo de los parámetros de color (ICM e IC) observado en los vinos elaborados con el cultivo autóctono puro (ScF8) podría relacionarse con el mayor porcentaje de antocianinas copigmentadas observadas en estos vinos respecto de los vinos control (ScF15) y de los elaborados con el cultivo mixto ScF8-Pk15 (Figura 14).



**Figura 14:** Porcentaje de Antocianinas Monoméricas (AM), Copigmentadas (AC) y Poliméricas (AP) determinadas espectrofotométricamente en vinos elaborados a escala industrial con levaduras nativas de la Patagonia.

Ambos cultivos iniciadores autóctonos influyeron significativa y positivamente en los contenidos de polifenoles totales y flavonoles de sus vinos (Tabla 10); estos últimos compuestos junto con los ácidos hidroxicinámicos presentan capacidad antioxidante y participan en la formación de copigmentos y pigmentos poliméricos durante la vinificación. Es de interés señalar que, aunque para el número de muestras analizadas no se observan diferencias significativas, en ambas vendimias existió una tendencia a un menor contenido de antocianinas en los vinos elaborados con el cultivo mixto autóctono respecto de los elaborados con ambos cultivos puros

(Tabla 10), que también podría contribuir a la disminución en el ICM observada respecto de sus vinos controles (ScF) y que estaría determinada por la presencia de actividad  $\beta$ -glicosidasa en la levadura non-*Saccharomyces* Pk15, ya señalada previamente. No obstante, el mayor contenido de copigmentos en éstos vinos elaborados con el cultivo mixto respecto de los elaborados con la cepa comercial (Figura 14) podría explicar que ambos presenten la misma intensidad de color.

Finalmente, los vinos a escala industrial también mostraron diferencias significativas en sus contenidos de ácido málico, láctico y etanol, cuyas concentraciones son significativamente menores en los elaborados con el cultivo autóctono mixto respecto de los elaborados con su control ScF8 y con el comercial.

En relación a los ácidos orgánicos, los resultados de la Tabla 10 evidencian un consumo del 73%, 80%, y 96,5% del ácido málico en los vinos elaborados con los cultivos puro ScF15, puro ScF8 y mixto ScF8-PK15, respectivamente, lo que determinó que el contenido de ácido málico resultara menor en este último vino. Asumiendo que la FML la realizan sólo las bacterias lácticas, que la FML natural en estos vinos no fue inhibida y que la transformación del ácido málico a ácido láctico, durante la FML es mol a mol, se puede concluir que en los vinos ScF8 y ScF15 todo el ácido málico se consumió vía FML mientras que en el vino ScF8-Pk15 sólo el 45% fue consumido por esta vía y el 51,5% restante fue consumido por la levadura Pk15 mediante fermentación maloalcohólica, metabolismo propuesto para levaduras. Estos resultados son consistentes con los obtenidos a escala piloto (2017) y confirman la influencia de la levadura non-*Saccharomyces P. kudriavzevii* sobre la estructura ácida del vino, hecho que es consistente con la capacidad demostrada por esta cepa autóctona de la región (Del Mónaco y col., 2016) de consumir ácido málico en condiciones de laboratorio (Del Mónaco y col., 2014b).

El menor contenido de etanol observado en los vinos elaborados con el cultivo mixto ScF8-Pk15 respecto de su control ScF8, así como también del comercial ScF15, microvinificaciones realizadas utilizando mosto sintético como sustrato muestran a *Pichia kudriavzevii* I15 como una cepa pobre productora de etanol y buena productora de glicerol y ácido acético (del Mónaco y col. 2014b y 2016a) proponiendo para la misma un tipo de fermentación de la glucosa del tipo glicero-pirúvica. Los resultados obtenidos en el marco de este trabajo impiden sostener esta

hipótesis dado que los contenidos de glicerol y ácido acético de los vinos elaborados con Pk15 en la forma de cultivo mixto no son mayores que los de aquellos elaborados con su control ScF8 ni con ScF15. Por otro lado, el efecto sobre el contenido de etanol es variable, fue observado como ya se señaló a escala de laboratorio y ahora a escala industrial (Tabla 10) pero no a escala piloto (Tablas 2 y 6) y podría estar influenciado por las condiciones que se establecen durante el proceso fermentativo y que requieren de estudios adicionales.

## 6. CONCLUSIONES

- El uso de cultivos puros de levadura nativas *Saccharomyces cerevisiae* F8 (ScF8) y mixtos autóctonos *S. cerevisiae* F8 - non-*Saccharomyces Pichia kudriavzevii* I15 (ScF8-Pk15) y *S. cerevisiae* F8 - *Oenococcus oeni* UNQ31 (ScF8-Oe31) influyen de manera diferente en los atributos del vino, según la variedad de uva se trate de Pinot noir o Malbec.
- Para la variedad Pinot noir y en las condiciones ensayadas (escala piloto y pie de cubas), el cultivo iniciador autóctono ScF8 mejora la preferencia del consumidor por los vinos elaborados con él respecto de sus controles (ScF15) (Tabla 3) sin afectar las propiedades fisicoquímicas y de color (Tabla 1). La adición de los cultivos adjuntos Pk15 y Oe31 no afecta a los parámetros fisicoquímicos y de color (Tabla 1) ni mejora la preferencia por los consumidores por estos vinos (Tabla 3).
- Para la variedad Malbec, el cultivo iniciador autóctono ScF8 afecta positivamente los parámetros de color ICM e IC y el brillo de sus vinos los que resultaron mayores que los de los vinos control (ScF15) en todas las condiciones ensayadas (escala piloto y pie de cuba y escala industrial y levadura húmeda) (Tablas 2, 6 y 10; Figura 13 A y C) mejorando su evaluación frente a expertos (cata: Tablas 5 y 9 y análisis sensorial descriptivo: Figura 12 y Tabla 7) y su preferencia por los consumidores (Tablas 4 y 8A y 8B).
- La inclusión de la cepa de levadura *P. kudriavzevii* Pk15 o de la BAL *Oenococcus oeni* UNQ31 en los cultivos iniciadores autóctonos disminuye la intensidad y el índice de color de los vinos respecto de los elaborados con su control ScF8, pero sólo el cultivo mixto ScF8-Pk15 mejora significativamente la calidad organoléptica de los vinos respecto de sus controles ScF (cata: Tablas 5 y 9 y análisis sensorial descriptivo: Figura 12 y Tabla 7) manteniendo o mejorando su preferencia por los consumidores (Tablas 4 y 8A). La BAL Oe31 sólo ejerció una influencia positiva cuando se combina con la cepa foránea ScF15 (Tablas 4 y 8B).

- La cepa nativa Pk15 es capaz de estabilizar microbiológicamente los vinos mediante el consumo exitoso del ácido L- málico (Tabla 2, 6 y 10), garantizando su salubridad. Su uso como co-cultivo de ScF8 constituye una estrategia novedosa y económica para la desacidificación de los vinos.
  
- Los cultivos nativos puro ScF8 y mixto ScF8-Pk15 favorecen la estabilización del color mediante la formación de antocianinas poliméricas y copigmentadas (Figura 14) como así también incrementan el contenido de polifenoles totales, y flavonoles respecto de los elaborados con el cultivo comercial ScF15 (Tabla 10) evidenciando la capacidad de las cepas de levaduras autóctonas de producir vinos tintos Malbec de calidad controlada y diferencial respecto de aquellos elaborados con la levadura comercial.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Albergaria, H., and Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 2035–2046. [doi:10.1007/s00253015-7255-0](https://doi.org/10.1007/s00253015-7255-0).
- Andorrá, I., Miró, G., Espligares, N., Mislata, A.M., Puxeu, M. and Ferrer-Gallego, R. (2019). Wild yeast and lactic acid bacteria of wine. In: *Yeast of Biotechnology*. Peixoto Basso T (Ed.). Chapter 4 Intech Open Rijeka, Croacia, 15 pp. eBook (PDF) ISBN: 978-1-83881-228-7. [doi:/10.5772/intechopen.84128](https://doi.org/10.5772/intechopen.84128).
- Apablaza, O.M., Rodríguez, M.E. y Caballero, A.C. (2006). Las levaduras y su importancia en la elaboración del vino. Microbiología aplicada y biotecnología. Monografía científica Nº 4.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153: 243–259.
- Bartle, L., Sumbly, K., Sundstrom, J., & Jiranek, V. (2019). The microbial challenge of wine-making: Yeast-bacteria compatibility. *FEMS Yeast Res.* 19(4), 1–16.
- Bartowsky E. J., Costello P. J., Chambers P. J. (2015). Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21 663–669. [10.1111/ajgw.12185](https://doi.org/10.1111/ajgw.12185). [doi.org/10.1111/ajgw.12185](https://doi.org/10.1111/ajgw.12185).
- Belda, I., Zorraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., and Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Front Microbiol* 8:821. [doi: 10.3389/fmicb.2017.00821](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00821).
- Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allene, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., LMills, D.A. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio* 7: e00631-16. [doi: 10.1128/mBio.00631-16](https://doi.org/10.1128/mBio.00631-16).
- Bordeu E. y Scarpa, J. (2000). Análisis Químico del Vino. Santiago, Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Boulton, RB; Singleton, VL; Bisson, LF; Kunkee, RE (1996). Principios y Prácticas de la vinificación; Springer: Nueva York, NY, EE. UU.
- Bravo, S.M.E. (2020). Producción de biomasa de levaduras patagónicas seleccionadas para su uso en enología. Tesis Doctoral, UNSur.

- Bravo-Ferrada, B.M., Delfederico, L., Hollmann, A., Valdés La Hens, D., Curilén, Y., Caballero, A., Semorile, L. (2011). *Oenococcus oeni* from patagonian red wines: isolation, characterization and technological properties. *Int. J. Microbiol. Res.* 3 (1): 48-52. ISSN: 0975-5276 y E-ISSN: 0975–9174.
- Bravo-Ferrada BM, Tymczyszyn EE, Gomez-Zavaglia A and Semorile L (2013) Effect of acclimation medium on cell viability, membrane integrity and ability to consume malic acid in synthetic wine by oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Applied Microbiology* 116, 360-367.
- Brizuela, N. S., Bravo-Ferrada, B.M., Curilén, Y., Delfederico, L., Caballero, A., Semorile, L., Pozo-Bayón, M. Á. and Tymczyszyn E. E. (2018). Advantages of Using Blend Cultures of Native *L. plantarum* and *O. oeni* Strains to Induce Malolactic Fermentation of Patagonian Malbec Wine. *Front. Microbiol.*, section Food Microbiol. 9, Article 21092018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02109>.
- Caballero A., Crisóstomo B. y Barbagelata R. (2005) “Caracterización fisicoquímica de mostos tintos de calidad enológica de la Norpatagonia Argentina”. X Congreso Latinoamericano de Vitivinicultura y Enología. Crivellaro Guerra C. y de Souza Sebben S (Ed.). Bento Concalves, Brasil. ISSN 1516-8107.
- Caspritz G, Radler F (1983) Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. *J Biol Chem* 258(8):4907-10.
- Catania C., Avagnina S. (2010). El terruño argentino. En: *La Interpretación Sensorial del Vino*, Capítulo III, pág. 113-121. INTA y Editorial Andina Sur ISBN 978-987-23725-38.
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., and Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol.Res.* 181,75–83, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>.
- Capozzi, V., Tufariello, M., De Simone, N., Fragasso, M., Grieco, F. (2021). Biodiversity of Oenological Lactic Acid Bacteria: Species- and Strain-Dependent Plus/Minus Effects on Wine Quality and Safety. *Fermentation* 7, 24. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010024>.
- Claisse Oliver, R. V.-F. (2007). Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *Journal of Microbiological Methods*, 387 – 390.

- Cocconcelli P.S., Porro D., Galandini S. and L. Senini (1995) Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci Letters in Applied Microbiology 21, 376-379.
- Código Alimentario Argentino (CAA) Capítulo XIII - art. 1093, 2023.
- Curilén YL, Maturano RC, Bravo SME, Carreño VA, Camacho E, Pereira D, Rivas GA, Delfederico L, Bravo Ferrada B, Semorile LC, Caballero AC. (2017). Validación de un cultivo iniciador para vinificaciones en tinto constituido por levaduras y bacterias lácticas patagónicas. Trabajos Completos, VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016 (CICYTAC). Eds. Robledo CW y Rosati V. Ministerio de Ciencia y Tecnología Pcia, Córdoba. 240 pág. Agosto 2017. 240 pág. ISBN 978-987-45380-3-1.
- Dao, L. and Friedman, M. (1992). Chlorogenic Acid Content of Fresh and Processed Potatoes Determined by Ultraviolet Spectrophotometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 2152-2156. <https://doi.org/10.1021/jf00023a022>.
- Delanoë, D., Maillard, C., Maisondieu, D. (2003). El vino: Del análisis a la elaboración. Editorial Acribia, Madrid. N° edición 1. ISBN:8420010111; ISBN13:9788420010113.
- Del Mónaco S.M., Carreño V.A, Caballero A.C. (2012) Cultivos iniciadores mixtos de la fermentación alcohólica para la elaboración de vinos Pinot noir patagónicos. Actas del IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Sección Biotecnología, Presentación Oral, pp 474. ISBN-13:978-987-28845-0-5.
- Del Mónaco S.M., Bravo S., Curilén Y., Carreño V., Caballero, A. (2014a). A regional starter for high quality wines: An Argentinean Patagonia experience. *Bulletin de l'OIV* 87 (998-999-1000): 217-224. ISSN 0029-7127.
- Del Mónaco, S.M., Barda, N.B., Rubio, N.C., Caballero, A.C. (2014b). Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification *J. Appl. Microbiol.* 117 (2): 451-464.
- Del Mónaco S.M., Curilén, Y. L., Bravo, S.M.E., Simes, A.B., Carreño, V. A., Maturano, R.C., Caballero, A. C. (2016a). "Wild yeasts selection for high quality Patagonian wines" Del Mónaco Silvana M, In: Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms. Series Microbiology. Olivera N., Libkind D. and Donatti E. (Eds.), Ed Springer, Nueva York Part III Yeast Biotechnology, Chapter 16, 277-300. ISBN: Print book: 978-3-319-42799-7, E-book 978-3-319-42801-7.

- Del Mónaco S, Rodríguez ME, Lopes C (2016b). *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian wine making terroir. *Int J Food Microbiol* 230:31–39.
- Devi, A., Anu-Appaiah, K.A. (2021). Mixed malolactic co-culture (*Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni*) with compatible *Saccharomyces* influences the polyphenolic, volatile and sensory profile of Shiraz wine. *LWT* 135, 110246 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110246>.
- Di Rienzo, J.A., Guzmán, A.W. and Casanoves, F. (2002). A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *Journal of Agricultural Biological Environmental Statistics*. 7(2): 129-142.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. and Robledo, C.W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Englezos Vasileios; Neil P. Jolly; Paola Di Gianvito; Kalliopi Rantsiou and Luca Cocolin (2022). Microbial interactions in winemaking: Ecological aspects and effect on wine quality. *Trends in Food Science & Technology*. Volume 127, Pages 99-113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.015>.
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol*. 1999 Jan;49 Pt 1:329-37. doi: 10.1099/00207713-49-1-329. PMID: 10028278.
- Garcia, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Aguera, E. and Agosin, E. (2002). Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a muscat wine. *J. Food Sci.* 67:1138–1143. [doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb09466.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09466.x).
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2e` me partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 253–271.
- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C. and Rousseaux, S. (2017). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microbiol- Biotechnol*. 10: 354–70.
- Heras-Roger J., Alonso-Alonso O., Gallo-Montes de oca 1A., Díaz-Romero C., Darias-Martín J. (2016). Influence of copigmentation and phenolic composition on wine color. *Food Sci Technol* 53(6): 2540–2547.

- Hermosín Gutiérrez I. (2007). Copigmentación y piranoantocianinas: el papel de los flavonoles y los ácidos hidroxicinámicos en el color del vino tinto. *ACE Enología, Revista de Enología Científica y Profesional de la Asociación Catalana de Enólogos* N° 81.
- INV. Instituto Nacional de Vitivinicultura. Argentina. Zonas vitícolas de la Patagonia Norte Argentina. Informe Mayo de 2015.
- Jackson R. (2014). Color-Red Wines. En: "Wine Science Fourth Edition", Chapter 6 Chemical Constituents of Grapes and Wine, pp 351-430. Academic Press. NY USA. ISBN 978-0-12-381468-5.
- Jolly, N. P., Varela, C. and Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeast in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215-237.
- Ju, Y., Yang, L., Yue, X., Li, Y., He, R., Deng, S., Yang, X., Fang, Y. (2021). Anthocyanin profiles and color properties of red wines made from *Vitis davidii* and *Vitis vinifera* grapes. *Food Sci. Hum. Well.* 10, 335-344.
- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., and Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Sci. Rep.* 5:14233. doi:[10.1038/srep14233](https://doi.org/10.1038/srep14233).
- Lappa, I.K., Kachrimanidou, V., Pateraki, C., Koulougliotis, D., Eriotou, E. and Kopsahelis, N. (2020). Indigenous yeasts: emerging trends and challenges in winemaking. *Curr. Opinion Food Sci*, 32:133–143.
- Lerm, E., Engelbrecht, L. & du Toit, M. (2010). Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 31, 186-212.
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., SchmittKopplin, P. (2017). Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57,856–873. doi:[10.1080/10408398.2014.983591](https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591).
- Lonvaud-Funel Aline (1999). Lactic Acid Bacteria in the Quality Improvement and Depreciation of Wine, Antonie van Leeuwenhoek. Vol. 76, N°. 1 - 4, pp. 317 - 331. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1002088931106>.
- Lonvaud-Funel, Aline (2003). The ftsH Gene of the Wine Bacterium *Oenococcus oeni* Is Involved in Protection against Environmental Stress. *ASM Journals Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69, No. 5 doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2512-2520.2003>.

- Lonvaud-Funel, Vincent Renouf, Olivier Claisse, Cécile Miot-Sertier (2006). Lactic acid bacteria evolution during winemaking: use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. [doi:10.1016/j.fm.2005.01.019](https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.019).
- Llorente, A. and Casazza, M. (2005). Southern Wine growing Region from Argentina. *El vino y su industria* 40:7-13.
- Lopes, Ch. A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M.P., Querol, A. and Caballero, A.C. (2007). Patagonian wines: implantation of and indigenous yeast starter in traditional and modern cellars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:139-149.
- Lucini L., Rocchetti G. and Trevisan M. (2020) Extending the concept of terroir from grapes to other agricultural commodities: an overview. *Current Opinion in Food Science* 31:88–95.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B. and Ewert B. (1999). Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4009-4017.
- Mina, M., Tsaltas, D. (2017). Contribution of yeast in wine aroma and flavour. In: *Yeast-Industrial Applications*. Morata, A., Loira, I. (Eds.). Chapter 5. Editorial Intech Open, London, UK pp. 117 – 134. ISBN 978-953-51-3600-2.
- McRae, J.M., Teng, B. and Bindon, K. (2018). *Factors Influencing Red Wine Color from the Grape to the Glass*. The Australian Wine Research Institute. Elsevier Inc. 10 pp. <https://www.edx.org/course/world-wine-grape-glass-adelaidex-wine101x>.
- Moreno, J. and R. Peinado. (2012a). Composition of wine, In: *Enological Chemistry*. Chapter. 4, pp. 45-52. Elsevier. España: 442 p.
- Morata Antonio, Loira Iris and Suárez Lepe José Antonio (2016). Influencia de las levaduras en el color del vino. Capítulo 13, páginas: 285 – 305. <http://dx.doi.org/10.5772/65055>.
- OIV (2016). Código Internacional de Prácticas enológicas. International Organization of Vine and Wine. <https://www.oiv.int/public/medias/4902/code-2016-es.pdf>
- Paramithiotis, S.; Stasinou, V.; Tzamourani, A.; Kotseridis, Y.; Dimopoulou, M. (2022). Malolactic Fermentation—Theoretical Advances and Practical Considerations. *Fermentation* 2022, 8, 521. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100521>.
- Pardo, I., Ferrer, S. (2019). Yeast-Bacteria Coinoculation. In: *Red Wine Technology*. Morata A. (Ed.) Academic Press Chapter 7, pp.99 - 114. ISBN 978-0-12-814399-5. [doi:https://doi.org/10.1016/C2017-0-01326-5](https://doi.org/10.1016/C2017-0-01326-5).

- Parpinello, G.P., Versari, A., Chinnici, F., Galassi, S. (2009). A Relationship among sensory descriptors, consumer preference and color parameters of Italian Novello red wines. *Food Res. Int.* 42, 1389–1395.
- Pérez-Magariño S., M.L. González-San José (2002). Prediction of red and rose wines' Cielab parameters from simple absorbance measurements. *J. Sci Food Agric.* 82(11):1319-1324. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1191>.
- Pretorius, I.S. (2016). Conducting Wine Symphonics with the Aid of Yeast Genomics *Beverages* 2016, 2, 36; [doi:10.3390/beverages2040036](https://doi.org/10.3390/beverages2040036).
- Pretorius, I.S. (2020). Tasting the terroir of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Research* 20.
- Petruzzi, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Spano G., and Sinigaglia, M. (2017). Microbial Resources and Enological Significance: Opportunities and Benefits. *Frontiers in Microbiology* 8, 995. [doi.org/10.3389/fmicb.2017.00995](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00995).
- Polaskova, P., Herszage, J. and Ebeler, S.E. (2008). Wine flavor: chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews*. 37:2478-2489.
- Querol A., Barrio E. and Ramón D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439 – 446.
- Rodas A.M., Ferrer S. and Pardo I. (2003) 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 412-422.
- Russo, P., Englezos, V., Capozzi, V., Pollon, M., Segade, S. R., Rantsiou, K., et al. (2020). Effect of mixed fermentations with *Starmarella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* on management of malo-lactic fermentation. *Food Res. Int.* 134, 109246.
- Suárez-Lepe, J.A., Morata, A. (2012). *Trends Food Sci. Technol.* 23: 39-50.
- Sumby, K.; P. Grbin and V. Jiranek. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1): 1 - 16.
- Styger, G., Prior, B. and Bauer, F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38:1145-1159.
- Topić Božič Jelena, Korte Dorota, Butinar Lorena, Mozetič Vodopivec Branka (2019). Yeasts and wine colour. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 11(2):291-302. [doi:10.17508/CJFST.2019.11.2.17](https://doi.org/10.17508/CJFST.2019.11.2.17).

- Topić Božič J, Butinar L, Albreht A, Vovk I, Korte D, Mozetič Vodopivec B. (2020). The impact of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts on wine colour: A laboratory study of vinylphenolic pyranoanthocyanin formation and anthocyanin cell wall adsorption. *LWT - Food Science and Technology* 123,109072. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109072>.
- Valdés La Hens, D., Bravo-Ferrada, B.M., Delfederico, L., Caballero, A., Semorile, L. (2015). "Patagonian red wines: PCR-DGGE analysis with two targeted genes revealed the prevalence of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* during spontaneous malolactic fermentations". *Australian J. Grape Wines Res.* 21(1): 49-56.
- van Wyk N, von Wallbrunn Ch, Swiegers JH, Pretorius IS (2021). Biotechnology of Wine Yeasts. *Encyclopedia of Mycology* 2, 428 – 446. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00007-X>.
- Wang, S., Li, S., Zhao, H., Gu, P., Chen, Y., Zhang, B., Zhu, B. (2018). Acetaldehyde released by *Lactobacillus plantarum* enhances accumulation of pyranoanthocyanins in wine during malolactic fermentation. *Food Res. Int* .108;254-263.
- Weizman, D. (2009). El mapa argentino de los sentidos. *Rumbos* 326: 18–24.
- Wrolstad Ronald E., Giusti M.Mónica (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>.



**Viviana Andrea Carreño, DNI 23580760**