

# Influencia de cultivos autóctonos iniciadores de la fermentación alcohólica sobre atributos sensoriales de vinos Patagónicos

Yolanda L. Curilén<sup>1,2</sup>, R. del Carmen Maturano<sup>1</sup>, Sebastián M.E. Bravo<sup>1,2</sup>, Adriana B. Simes<sup>2</sup>, Manuel A. Morales<sup>2</sup>, Viviana A. Carreño<sup>2</sup>, Valentín Tassile<sup>2</sup>, Adriana C. Caballero<sup>1,2</sup> y Silvana M. del Mónaco<sup>1</sup>

1. Grupo de Enología, Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue (UNCo), Neuquén, Argentina.

2. Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nacional del Comahue (UNCo), Villa Regina, Argentina.  
silmdm@yahoo.com

**Resumen.** En este trabajo se evaluó a escala piloto la aptitud enológica de levaduras autóctonas de la región patagónica y su influencia sobre el color y *flavour* del vino. Mostos patagónicos Malbec se inocularon con cultivos puros de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas Sc F8 y Sc M16 y comercial Sc F15 (control), y con el cultivo mixto autóctono Sc F8 y *Pichia kudriavzevii* P15 (Sc F8+P15, cocultivo) durante las vendimias 2015 y 2017. Las cinéticas fermentativas se siguieron por evolución de los °Bmé, la evaluación fisicoquímica de los vinos y los parámetros relacionados con el color (intensidad y tinte) se realizaron siguiendo los métodos del INV y espectrofotometría UV-V y el sensorial mediante análisis descriptivo y prueba de preferencias de consumidores. Todos los vinos resultaron normales y secos, pero los elaborados con los cultivos puros autóctonos mostraron diferencias con los del comercial en sus parámetros de color que pueden relacionarse con un mayor contenido de copigmentos (hipercromía, vendimia 2015) y de pigmentos resistentes al SO<sub>2</sub> (hipsocromía, vendimia 2017). Adicionalmente, los cultivos autóctonos puros potenciaron los aromas a frutos rojos y especiados, propiedad que conservó el cocultivo. La inclusión de P15 en el cultivo iniciador adicionalmente mejoró la sensación en boca (acidez y dulzor) resultando sus vinos (vendimias 2015 y 2017) y los elaborados con el cultivo mixto Sc F8 (vendimia 2017) preferidos por los consumidores. Los cultivos iniciadores autóctonos F8 y F8+P15 constituyen una valiosa herramienta para la diferenciación y el agregado de valor de los vinos regionales.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, color, aroma, gusto.

## 1. Introducción

El vino es, exclusivamente, la bebida resultante de la fermentación alcohólica (FA), completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva [1] y su composición química es la base de sus atributos sensoriales y en consecuencia de su calidad.

De los numerosos factores que afectan la calidad del vino, el sustrato y la biota microbiana imperante durante el proceso de vinificación, son en ese orden, los de mayor significación [2].

La vinificación es un proceso ecológicamente complejo que involucra una fermentación primaria, la alcohólica (FA), conducida por las levaduras y una fermentación secundaria y opcional, la maloláctica (FML), llevada a cabo por las bacterias del ácido láctico (BAL) [3]. Las numerosas interacciones celulares/bioquímicas que se establecen entre individuos de las diferentes especies de levaduras y BAL participantes de la vinificación [4] pueden producir vinos redondos y de gran complejidad aromática, pero también ocasionar metabolitos o efectos indeseables, como *off flavors*, compuestos perjudiciales para la salud y paradas o retrasos de la fermentación [5]. Esta impredecibilidad es la mayor desventaja de la elaboración de vinos por fermentaciones naturales a nivel industrial [6]. 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 [7].

Por la importancia de la FA, la tecnología de los cultivos iniciadores centró inicialmente su atención en las levaduras, especialmente en la biodiversidad intraespecífica de *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura vínica por excelencia [7]. Más recientemente la búsqueda se orientó a otras especies de levaduras pertenecientes a géneros diferentes de *Saccharomyces*, asociadas a la fase inicial de la fermentación espontánea de los mostos y denominadas colectivamente levaduras non-*Saccharomyces* [8]. Por sus características metabólicas particulares, individuos de estas especies utilizados en la forma de cultivos adjuntos de *S. cerevisiae* pueden proporcionar soluciones tecnológicas a problemas específicos (reducción de la acidez, del contenido alcohólico, desarrollo de color, entre otros) así como mejorar la calidad sensorial y /o sanitaria del producto [8-10].

En la enología actual, la tendencia mundial es el uso de cultivos iniciadores de la fermentación alcohólica (FA) constituidos por cepas de levaduras autóctonas de la propia región productora. Estos cultivos autóctonos, adaptados a las características agroecológicas de su región y respetuosos de su *terroir* microbiano, presentan mayor capacidad de competencia que los cultivos foráneos para controlar exitosamente el proceso [11]. Adicionalmente, utilizados en la forma de cultivos múltiples (más de una

cepa de *Saccharomyces*) o mixtos (cepas *Saccharomyces* y non-*Saccharomyces*) son capaces de otorgar a los vinos características sensoriales de aquellos elaborados por fermentaciones espontáneas/naturales exitosas, aunque bajo condiciones controladas del proceso [6], permitiendo expresar en los vinos las notas organolépticas distintivas de su terroir [12].

La región del Comahue (Patagonia norte) conforma la región vitivinícola más austral de la Argentina y una de las más australes del mundo; la formulación y aplicación de cultivos iniciadores regionales, hoy inexistentes en el mercado, permitirá resolver problemáticas del sector vitivinícola regional, favoreciendo la elaboración de productos de calidad controlada y diferencial, en los que se expresen las características de su terruño, muy ventajosas para el desarrollo de una viticultura de calidad enológica *premium* [13]. En este trabajo se presentan y discuten resultados relacionados con las calidades de vinos tintos de la variedad Malbec elaborados a escala piloto (200 L) mediante vinificaciones conducidas por cultivos puros y mixtos constituidos por levaduras autóctonas de esta región de las especies *S. cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii* [14] poniendo el foco en los atributos color y *flavour* (aroma y gusto), los más apreciados por el consumidor al momento de la elección de un vino [15]. La capacidad de la cepa de *P. kudriavzevii* de consumir ácido L(-) málico [16] podría, adicionalmente, ayudar a resolver la elevada acidez relativa de los vinos de la región del Comahue respecto de aquellos elaborados en las otras regiones vitivinícolas del país debido al alto contenido de éste ácido en los mostos de uva patagónicos [17].

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Microorganismos**

Se utilizaron cepas autóctonas de la Patagonia de las especies *S. cerevisiae* F8 (Sc F8) y M16 (Sc M16) y *P. kudriavzevii* (ex *Issatchenkia orientalis*) I15 (P15) seleccionada por sus características metabólicas de interés enológico [14] (del Mónaco *et al.* 2016) y la cepa comercial *S. cerevisiae* F15 (Sc F15) de Laffort, mayoritariamente usada en bodegas patagónicas para vinificaciones en tinto.

### **2.2 Vinificaciones**

Se realizaron a escala piloto (200L) durante las vendimias 2015 y 2017. Mostos industriales Malbec se inocularon con cultivos puros de la cepa autóctona Sc F8, y de la

comercial Sc F15 y con el cultivo mixto F8 + P15 en la forma de cocultivo (CoC, inoculación simultánea en una relación 1/100 cél/mL) durante la vendimia 2015; en la vendimia 2017 adicionalmente se ensayó la cepa autóctona Sc M16 en la forma de cultivo puro. Las densidades celulares iniciales de los inóculos en los mostos estuvieron en el orden de  $\sim 10^7$  cél/mL. Las FAs se desarrollaron a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta sequedad de los mostos (azúcares reductores totales  $\approx 2 \text{ g L}^{-1}$ ). En las vinificaciones 2015 la FML se desarrolló espontáneamente controlándose la evolución mediante la determinación enzimática del contenido del ácido L (-) málico. En las vinificaciones 2017 se inhibió el desarrollo de la FML por adición de elevadas concentraciones de  $\text{SO}_2$  (100 ppm). Los vinos jóvenes se estabilizaron, se ajustaron en su concentración de  $\text{SO}_2$  y se embotellaron. Con el fin de realizar análisis microbiológicos y fisicoquímicos se tomaron muestras de mostos en los estadios iniciales, medios y finales de las FA y de la FML, cuando correspondió (Vendimia 2015).

### 2.3 Análisis de los vinos

**Fisicoquímico.** La evaluación fisicoquímica de los vinos se realizó utilizando la metodología oficial del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA y ensayo de Tukey HSD considerándose significativas diferencias con  $p < 0,05$ . El análisis de parámetros de color en los vinos obtenidos al finalizar la FA se llevó a cabo en base a las medidas de absorbancia realizadas a tres longitudes de onda  $\lambda_{420\text{nm}}$ ,  $\lambda_{520\text{nm}}$  y  $\lambda_{620\text{nm}}$ . A partir de dichos valores pueden determinarse diferentes parámetros relacionados al atributo del color: Intensidad de Color ( $A_{420\text{nm}} + A_{520\text{nm}} + A_{620\text{nm}}$ ), Tinte ( $A_{420\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$ ) e Índice de color IC = (intensidad de color/tinte \* 1000). En los vinos 2017 los parámetros de color se evaluaron antes y 48h después del sulfitado.

**Sensorial.** Con el objetivo de describir las muestras en forma cualitativa y cuantificar la intensidad de los distintos atributos sensoriales se realizó un análisis sensorial descriptivo de los vinos utilizando para ello una escala de 1=no intensidad a 10=intensidad extrema. Participaron nueve (9) evaluadores altamente entrenados. Cada evaluador recibió una muestra etiquetada con un código de tres (3) dígitos elegidos al azar. La presentación de las muestras se realizó en forma monádica para evitar comparaciones entre muestras. Se utilizó un diseño estadístico de bloques completos al azar en donde cada

evaluador ofició de bloque. Cada panelista recibió las muestras en un orden preestablecido y diferente al de los demás. Se realizaron tres (3) repeticiones en dos días diferentes en donde se varió tanto el orden de presentación para cada evaluador como los códigos de tres dígitos para reducir la posibilidad de resultados tendenciosos y el efecto posicional. Las muestras fueron servidas en copas normalizadas de color negro [18] a temperatura ambiente de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . En cada copa se sirvieron 30 ml de vino. Se instruyó a los evaluadores que indicaran la intensidad de cada atributo sensorial tanto de la fase visual, olfativa y gustativa. A fin de ayudar a los evaluadores a recordar los atributos pautados, se utilizaron estándares preparados en un vino base Malbec 2017 elaborado en el laboratorio de microvinificación de la EEA INTA Alto Valle [19]. Para reducir la variabilidad en la medición de las intensidades de los atributos, se utilizaron patrones de los atributos de acidez, dulzor, amargor, astringencia cuyas intensidades fueron consensuadas por el panel en trabajos previos realizados en 2018. Para interpretar los resultados se determinaron las medias de los valores asignados a la intensidad de los atributos sensoriales y se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y un análisis de componentes principales utilizando el software Infostat [20].

#### **2.4 Prueba de Preferencia de Consumidores**

Se realizaron en Bariloche a la Carta 2016 (vinos 2015) y durante la 39 Edición de Fiesta de la Vendimia 2018 (vinos 2017). En estas pruebas los diferentes vinos elaborados se identificaron con diferentes letras A, B, C, D debiendo el consumidor asignarle a cada vino un valor 1, 2, 3 o 4 según su preferencia. Uno, el preferido en primer lugar, dos en segundo lugar, etc. En esta degustación a ciegas, el promedio obtenido para cada vino es más cercano a uno cuanto mayor es su preferencia por el consumidor. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando un modelo lineal generalizado y prueba de comparaciones múltiples de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) [21]. El análisis se realizó a través del software INFOSTAT [20] como interfaz gráfica para el paquete NLMER de R [22].

### **3. Resultados y discusión**

La Tabla 1 muestra los parámetros fisicoquímicos de importancia enológica de vinos Malbec elaborados con cultivos iniciadores puros Sc F8 y Sc M16 y mixto F8+P15 autóctonos, así como con el cultivo comercial Sc F15 durante la Vendimia 2015.

Todos los vinos resultaron normales y sus contenidos en azúcares reductores totales (ART) se encuentran dentro de los límites aceptados para ser clasificados como vinos secos ( $ART \leq 2 \text{ g/L}$ ). Las concentraciones de metanol en los vinos fueron siempre  $< 0,25 \text{ mg/L}$  y las de carbamato de etilo en todos los casos estuvieron por debajo del límite de detección de métodos utilizado por el INV ( $15 \mu\text{g/L}$ ) (datos no mostrados), no observándose diferencias significativas de los parámetros evaluados entre vinos excepto en los relacionados con el color, evidenciando una influencia significativa de las cepas conductoras de la FA sobre este atributo.

Consistente con lo reportado en investigaciones previas con las variedades Pinot noir y Merlot [23], los vinos elaborados en el 2015 con la variedad Malbec (Tabla 1) y el cultivo indígena Sc F8 presentan un índice de color (IC) significativamente mayor (efecto hipercrómico) que los elaborados con su control Sc F15. Esta hipercromía se explica por un aumento de la absorbancia de estos vinos a 520 nm y 620 nm (efecto batocrómico) sin cambios en la absorbancia a 420 nm (datos no mostrados), que determinan un aumento significativo en la intensidad de color y concomitantemente una disminución del tinte (Tabla 1).

**Tabla 1.** Caracterización fisicoquímica y evaluación sensorial de vinos obtenidos a partir de mostos tintos regionales variedad Malbec- vendimia 2015, conducidas por cultivos puros de *S. cerevisiae* F8 (Sc F8) y F15 comercial (Sc F15) y cultivo mixto Sc F8 + *P. kudriavzevii* P15 (CoC)

Evaluación Fisico-química	Sc F15	Sc F8	CoC	P
ART (g/L)	2,00±0,38	1,80±0,51	1,85±0,78	ns
Etanol (% v/v)	15,10±0,10	15,00±0,80	14,80±0,10	ns
pH	3,93±0,04	3,90±0,02	3,87±0,18	ns
AT <sup>†</sup>	4,77±1,07	4,61±0,14	4,86±0,21	ns
AV <sup>++</sup>	0,75±0,03	0,77±0,05	0,73±0,00	ns
Ac. L-málico (g/L)	0,42±0,23	0,53±0,11	0,41±0,06	ns
Glicerol (g/L)	10,46±0,26	9,45±0,35	10,56±0,31	ns
SO <sub>2</sub> Total (ppm)	20±9	15±7	16±4	ns
SO <sub>2</sub> Libre (ppm)	6±1	6±2	6±2	ns

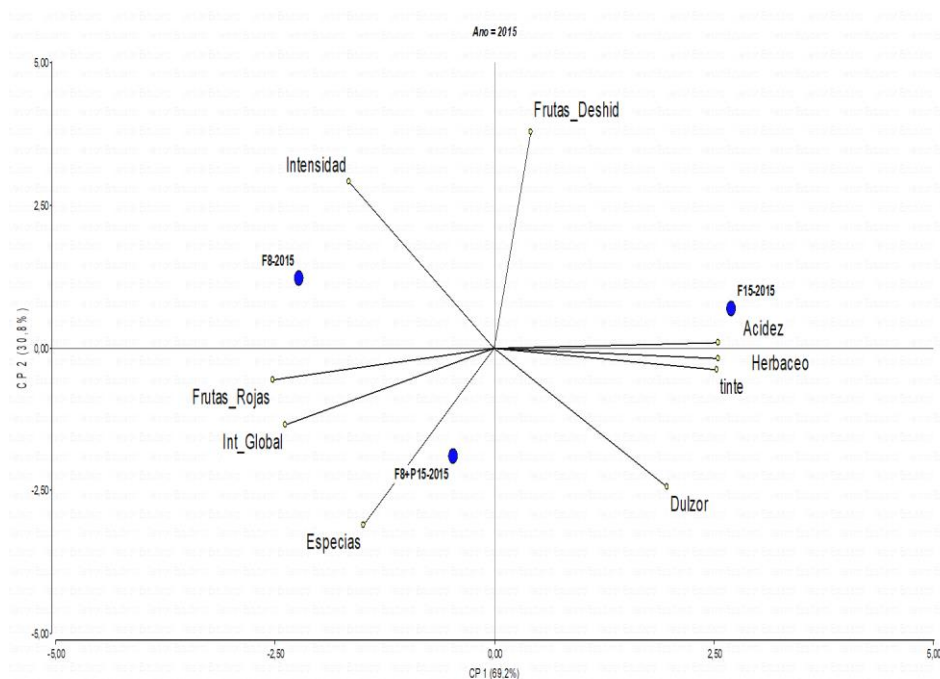
<b>Índice de Color</b>	1243±33 <sup>b</sup>	2056±114 <sup>a</sup>	1092±62 <sup>b</sup>	<0,01
<b>Intensidad Color</b>	0,92±0,10 <sup>b</sup>	1,38±0,20 <sup>a</sup>	0,80±0,09 <sup>b</sup>	<0,05
<b>Tinte</b>	0,74±0,04 <sup>a</sup>	0,65±0,00 <sup>b</sup>	0,69±0,03 <sup>ab</sup>	<0,05

ART: Azúcares Reductores Totales (g/L); <sup>†</sup> Acidez Titulable expresada en Ácido Tartárico (g/L); <sup>††</sup> Acidez Volátil, expresada en Ácido Acético (g/L); Subíndices diferentes indican diferencias significativas dentro del lote de datos de cada fila analizados por Anova y Test Tukey HSD n=2

El origen del color rojo de los vinos tintos proviene de las antocianinas (antocianidinas glicosiladas en el C3), compuestos particularmente inestables en sus formas libres [24, 25]. La estabilización del color se logra por asociación de moléculas de antocianinas consigo mismas o con otros constituyentes del vino, mayoritariamente compuestos fenólicos flavonoides y no flavonoides, a través de interacciones no covalentes (copigmentación), por formación de enlaces covalentes (pigmentos poliméricos) y por formación de nuevos pigmentos colorantes (piranoantocianinas) [25]. En general, la copigmentación es el mecanismo más importante de estabilización del color en los vinos jóvenes y está asociada con un incremento de la intensidad (efecto hipercrómico) y a un viraje hacia tonalidades más azuladas (efecto batocrómico) del color rojo del vino tinto (disminución del tinte). La concentración de copigmentos depende de la composición fenólica y de las relaciones molares de copigmento/pigmento que de forma particular se establecen en un vino. Si bien los complejos de copigmentación se forman con mucha facilidad [26], también se disocian fácilmente ante ciertas condiciones del medio (aumento de la proporción de ciertos co-solventes como el etanol y otros alcoholes del vino o el ácido acético) derivados de las actividades metabólicas de las levaduras [25]. En este contexto, la hipercromía de los vinos elaborados con la levadura autóctona Sc F8 podría estar relacionado con un mayor contenido de pigmentos promovido por las condiciones del medio vino generado por un metabolismo particular de esta cepa que favorece la extracción de antocianinas y copigmentos o la estabilización de éstos.

Por su parte, los vinos elaborados con el CoC (F8+P15) mostraron IC e intensidad de color significativamente menores que sus vinos controles (ScF8), perdiéndose el efecto hipercrómico como el batocrómico producido por el cultivo puro. Esta pérdida de color es consistente con pérdidas en el material colorante atribuible a la actividad  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -GL) del cultivo adjunto *P. kudriavzevii* P15 [16].

Estas diferencias químicas en el color fueron consistentes con la apreciación de este atributo en el análisis sensorial cualitativo (Figura 1) que reportó una mayor intensidad en los vinos elaborados con la cepa de *S. cerevisiae* autóctona que en los elaborados con la cepa comercial y una disminución de la misma por el agregado del cultivo adjunto P15. Las tablas 2 y 3 muestran los autovectores y las correlaciones de los componentes principales con las variables originales de la Figura 1.



**Figura 1:** Componentes principales del análisis sensorial descriptivo de los vinos 2015. Intensidad: intensidad de color. Int\_Global: intensidad global aroma; Frutas Rojas, Frutas Deshid (Deshidratadas) Especies, Herbáceo: notas aromáticas. Acidez y Dulzor, gusto. Las variables graficadas presentaron diferencias significativas (ANOVA  $p < 0,05$ ).



**Tabla 2:** Autovectores Figura 1

Variables	e1	e2.....
Intensidad	-0,26	0,46
Tinte	0,40	-0,06
Int_Global	-0,38	-0,21
Frutas_Rojas	-0,40	-0,09
Frutas_Deshid	0,07	0,59
Herbaceo	0,40	-0,03
Especias	-0,23	-0,49
Dulzor	0,31	-0,38
Acidez	0,40	0,02

**Tabla 3:** Correlaciones con las variables originales Figura 1

Variables	CP 1	CP 2
Intensidad	-0,65	0,76
Tinte	0,99	-0,10
Int_Global	-0,94	-0,35
Frutas_Rojas	-0,99	-0,15
Frutas_Deshid	0,16	0,99
Herbaceo	1,00	-0,05
Especias	-0,58	-0,81
Dulzor	0,77	-0,64
Acidez	1,00	0,03

En relación al aroma, los vinos elaborados con los cultivos autóctonos puro y mixto presentaron notas a frutas rojas frescas ( $4,00 \pm 0,44$  y  $3,81 \pm 0,34$ ) y especiadas ( $2,4 \pm 0,17$  y  $2,9 \pm 0,34$ ) significativamente mayores y notas herbáceas ( $2,90 \pm 0,14$  y  $3,00 \pm 0,21$ ) significativamente menores que los elaborados con el cultivo comercial ( $3,11 \pm 0,20$ ,  $2,00 \pm 0,33$  y  $3,5 \pm 0,14$ ). Adicionalmente, los elaborados con el CoC presentaron menor acidez y mayor dulzor en boca que su control (Figura 1) y fueron preferidos por los consumidores (Tabla 4).

**Tabla 4:** Prueba de Preferencia de Consumidores por los Vinos 2015 elaborados con la variedad Malbec y FAs conducidas por los cultivos iniciadores autóctonos puro (F8) y mixto (F8+P15) y por el comercial (F15)

Cultivo iniciador FA	Media	E.E.	
F15	2,20	0,18	A
F8	2,10	0,20	A
F8+P15	1,68	0,25	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,10$ ),  $n=71$*

La calidad sensorial de los vinos jóvenes de variedades aromáticamente neutras como los aquí presentados está significativamente influenciada por la calidad de la biota de levaduras, pero también y aunque en menor grado, por las BAL. Los contenidos de ácido málico, sin diferencias y relativamente bajos en los tres vinos, y el pH elevado de todos éstos (Tabla 1) indican un desarrollo espontáneo de la FML en todas las vinificaciones, no pudiéndose descartar una potencial influencia de la biota BAL sobre las propiedades sensoriales de los vinos 2015. Con el objeto de inhibir el desarrollo espontáneo de la FML y obtener resultados conclusivos respecto de influencia de los cultivos

de levaduras autóctonas y comerciales sobre la calidad sensorial de los vinos, durante la Vendimia 2017, una vez finalizada la FA los vinos fueron sulfitados.

Todos los perfiles fisicoquímicos de los vinos obtenidos en la vendimia 2017 corresponden a vinos normales y secos (Tabla 5), pero la sulfitación deliberada realizada para impedir el desarrollo de la FML determinó que los vinos elaborados con los tres cultivos puros presentaran una mayor acidez titulable y un menor pH que sus homólogos 2015, diferencias que pueden relacionarse con su mayor contenido de ácido málico. Por el contrario, los vinos elaborados con el cultivo mixto presentaron un contenido de ácido málico significativamente menor y un pH significativamente mayor que su control (Sc F8) y similares a los obtenidos en los vinos 2015 elaborados con el mismo CoC. Este resultado es consistente con la capacidad de la cepa P15 de asimilar ácido málico, propiedad señalada en la Introducción y por la que fuera seleccionada [16]. El cultivo mixto representa una herramienta valiosa y alternativa a la FML para la deacidificación biológica de los vinos.

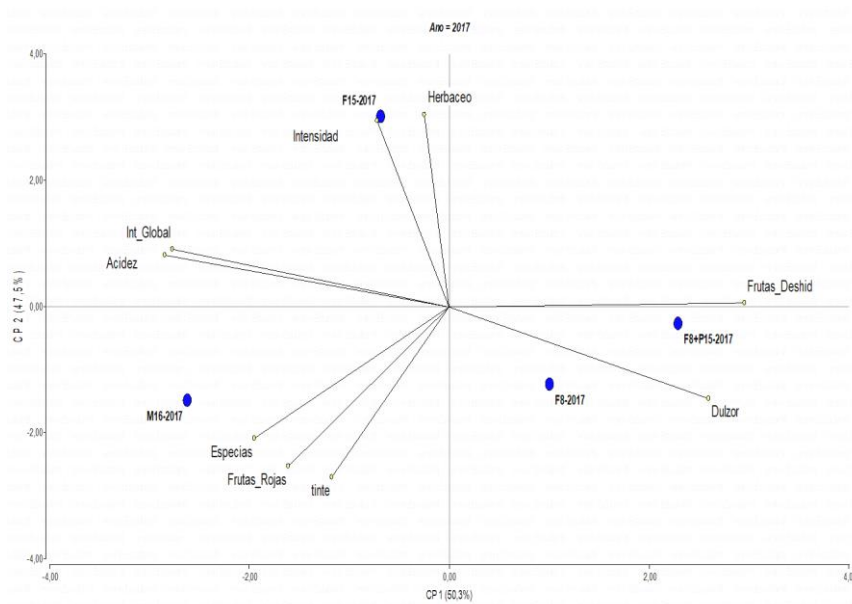
En relación al contenido de glicerol (Tablas 1 y 5) y a la calidad aromática de los vinos, los resultados obtenidos en el 2017 son consistentes con los del 2015 (Figuras 1 y 2) por lo que estas características pueden relacionarse con la calidad de las cepas de levaduras responsables de conducir la FA. Los vinos elaborados con los cultivos iniciadores puros autóctonos (Sc F8 y Sc M16) y mixto presentaron notas aromáticas a frutos rojos y especias significativamente mayores y herbáceas significativamente menores que los elaborados con el cultivo comercial, y de intensidad similar a las observadas en el 2015. Adicionalmente, el vino elaborado con el CoC presentó la menor acidez y el mayor dulzor entre los vinos evaluados, propiedades que pueden relacionarse con un menor contenido de ácido L(-) málico y mayor contenido de glicerol en este vino que en el control (Sc F8) y en el elaborado con Sc M16, respectivamente (Tabla 5).

**Tabla 5:** Caracterización fisicoquímica de los vinos elaborados con cultivos iniciadores indígenas puros Sc F8, Sc M16 y mixto F8 +P15 en la forma de CoC y con el cultivo foráneo comercial Sc F15 en la Vendimia 2017 con la variedad Malbec

Malbec 2017					
Evaluación Fisico-química	Sc F15	Sc M16	Sc F8	Sc F8+P15	p
ART (g/L)	2,00±0,38	1,85±0,18	1,80±0,31	1,61±0,21	ns
Etanol (% v/v)	11,94±1,56	13,26±0,27	13,81±0,42	13,42±0,22	ns

pH	3,67±0,03 <sup>a</sup>	3,66±0,02 <sup>a</sup>	3,68±0,02 <sup>a</sup>	3,83±0,02 <sup>b</sup>	<0.05
Acidez titulable <sup>†</sup>	6,36±0,20 <sup>b</sup>	6,17±0,11 <sup>b</sup>	5,95±0,14 <sup>ab</sup>	5,75±0,21 <sup>a</sup>	<0.05
Acidez volátil <sup>††</sup>	0,55±0,13	0,55±0,08	0,45±0,09	0,48±0,11	ns
Ácido málico (g/L)	3,14±0,15 <sup>b</sup>	2,56±0,25 <sup>b</sup>	3,77±0,61 <sup>b</sup>	0,73±0,31 <sup>a</sup>	<0.01
Glicerol (g/L)	10,42±0,22 <sup>b</sup>	9,41±0,19 <sup>a</sup>	9,38±0,11 <sup>a</sup>	10,71±0,11 <sup>b</sup>	<0.05
Índice de color	2234±65 <sup>a</sup>	2694±54 <sup>b</sup>	2779±31 <sup>b</sup>	2473±45 <sup>a</sup>	<0.01
Intensidad color	1,270±0,046 <sup>a</sup>	1,969±0,037 <sup>c</sup>	1,979±0,087 <sup>c</sup>	1,569±0,057 <sup>b</sup>	<0.01
Tinte	0,598±0,030 <sup>a</sup>	0,733±0,017 <sup>b</sup>	0,708±0,14 <sup>b</sup>	0,634±0,022 <sup>a</sup>	<0.05
SO <sub>2</sub> Total (ppm)	105±10	95±8	101±11	89±9	ns
SO <sub>2</sub> Libre (ppm)	45±4	40±3	42±3	42±4	ns
Índice de color	1990±58 <sup>b</sup>	2192±63 <sup>b</sup>	1936±45 <sup>b</sup>	1582±60 <sup>a</sup>	<0.01
Intensidad color	1,194±0,100 <sup>a</sup>	1,756±0,124 <sup>b</sup>	1,677±0,114 <sup>b</sup>	1,215±0,109 <sup>a</sup>	<0.01
Tinte	0,600±0,056 <sup>a</sup>	0,801±0,043 <sup>c</sup>	0,861±0,042 <sup>c</sup>	0,768±0,061 <sup>b</sup>	<0.05

<sup>†</sup> Expresada como ácido tartárico (g/L); <sup>††</sup> expresada como ácido acético (g/L). En los vinos 2017 se inhibió la FML por adición de SO<sub>2</sub>. Letras superíndices diferentes señalan diferencias significativas entre los datos de la misma fila (ANOVA y prueba HSD de Tukey con n=2). Los datos sombreados corresponden a los datos de color obtenidos después de 48h del sulfitado de los vinos. Al momento del envasado, el contenido de SO<sub>2</sub> Total y Libre de los vinos estuvo por debajo de los límites establecidos por el INV



**Figura 2:** Análisis de componentes principales de los atributos sensoriales resultantes del análisis sensorial descriptivo de los vinos 2017. Intensidad: intensidad de color. Int\_Global: intensidad global aroma; Frutas Rojas, Frutas Deshid (Deshidratadas) Especies, Herbáceo: notas aromáticas. Acidez y Dulzor, gusto. Las variables graficadas presentaron diferencias significativas (ANOVA  $p < 0,05$ ).

Las tablas 6 y 7 muestran los autovectores y las correlaciones de los componentes principales con las variables originales de la Figura 2.

**Tabla 6:** Autovectores Figura 2

Variables	e1	e2
Intensidad	-0,12	0,47
tinte	-0,19	-0,43
Int_Global	-0,44	0,15
Frutas_Rojas	-0,26	-0,40
Frutas_Deshid	0,47	0,01
Herbaceo	-0,04	0,48
Especies	-0,31	-0,33
Dulzor	0,41	-0,23
Acidez	-0,45	0,13

**Tabla 7:** Correlaciones con las variables originales Figura 2

Variables	CP 1	CP 2
Intensidad	-0,24	0,97
tinte	-0,40	-0,89
Int_Global	-0,94	0,30
Frutas_Rojas	-0,55	-0,83
Frutas_Deshid	1,00	0,02
Herbaceo	-0,08	1,00
Especies	-0,66	-0,69
Dulzor	0,88	-0,48
Acidez	-0,96	0,26

En relación al atributo color, en los vinos 2017 sin sulfitar los efectos de las cepas autóctonas Sc F8, y Sc M16, sobre el IC (índice de color) y la intensidad de color fueron similares a los descritos en la vendimia 2015 (efecto hipercrómico), aunque los vinos 2017 también mostraron un aumento de la absorbancia a 420nm (efecto hipsocrómico) que determinó un aumento significativo de sus tintes respecto del control (Sc F15) (Tabla 5). Por otra parte, el sulfitado de estos vinos derivó en una pérdida significativa de la intensidad de color la que fue más significativa en los vinos elaborados con las levaduras autóctonas (10-20%) que en la comercial (5%). En todos los vinos, la pérdida de intensidad de color estuvo asociada a una significativa disminución de la absorbancia (aproximadamente 30%) a 520nm (dato no mostrado). Mientras 520nm es la  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción de la antocianina mayoritaria de los vinos tintos, malvidina 3-glucósido sensible al  $\text{SO}_2$ , el resultado evidencia que la estabilización del color en los vinos jóvenes ocurre mediante la formación de copigmentos sensibles al  $\text{SO}_2$  y que la hipercromía observada en los vinos elaborados con los cultivos puros de Sc autóctonos está relacionada con mayor contenido de estos pigmentos en sus vinos. Al igual que lo observado

en la vendimia 2015, la inclusión de P15 en el cultivo iniciador disminuyó significativamente la intensidad de color de los vinos. Adicionalmente, todos los vinos elaborados con los cultivos iniciadores autóctonos mostraron una menor pérdida del material colorante capaz de absorber luz a los 420nm (13%) que los elaborados con el cultivo comercial (20%) (datos no mostrados) y como consecuencia un aumento significativo en sus tintes (Tabla 5, datos sombreados). Aunque debe corroborarse experimentalmente, este resultado es consistente con el supuesto de un mayor contenido de pigmentos poliméricos de tipo A-T y/o piranoantocianinas [25]

Los pigmentos poliméricos y las piranoantocianinas, son pigmentos rojo anaranjados (absorben luz a  $\lambda < 500\text{nm}$ , efecto hipsocrómico) resistentes a la decoloración por  $\text{SO}_2$  que otorgan al color del vino el matiz rojo teja típico de los vinos añejados [29]. Existe evidencia que el acetaldehído, un metabolito secundario de las levaduras, acelera la formación de estos pigmentos antociánicos poliméricos, actuando de nexo de unión entre los antocianos y los taninos [25, 26], y que tanto el acetaldehído como el ácido pirúvico (otro metabolito fermentativo de las levaduras) intervienen en la formación de piranoantocianinas [25].

Al igual que en el 2015, el vino elaborado en la vendimia 2017 con el cultivo mixto autóctono Sc F8+P15 fue el preferido de los consumidores, aunque en esta oportunidad la preferencia estuvo compartida con el vino elaborado por el cultivo puro autóctono Sc F8 (Tabla 8).

**Tabla 8:** Prueba de Preferencia de Consumidores para los Vinos 2017 elaborados con la variedad Malbec y FAs conducidas por los cultivos iniciadores autóctonos puros (F8 y M16) y mixto (F8+P15) y por el comercial (F15)

Cultivo iniciador FA	Media	E.E	
F15	2,96	0,24	A
M16	2,69	0,23	A
F8	2,17	0,21	B
F8+P15	2,08	0,20	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ),  $n=96$*

#### 4. Conclusiones

La regularidad en la calidad fisicoquímica de los vinos elaborados durante las vendimias 2015 y 2017 pone en evidencia la estabilidad genética de las cepas de levaduras autóctonas de la Patagonia *S. cerevisiae* F8 y *P. kudriavzevii* P15, validando su aptitud

para ser usada en enología, en particular para vinificaciones tintas de la variedad Malbec.

Los cultivos iniciadores autóctonos Sc F8 y M16 impactan positivamente sobre la calidad sensorial de los vinos, intensificando significativamente su color, un atributo de preferencia al momento de la elección de un vino y que establece, junto con el contenido alcohólico, el valor comercial de éste.

Los cultivos iniciadores autóctonos puros y mixto potencian el aroma frutal y especiado de los vinos regionales, diferenciado positivamente su calidad y su preferencia por parte de los consumidores.

El cultivo autóctono mixto representa una herramienta alternativa a la FML para la deacidificación biológica de los vinos

## 5. Bibliografía

1. OIV (2016). Código Internacional de Prácticas enológicas. International Organization of Vine and Wine.
2. Bokulich N.A., Collins T.S., Masarweh C., Allene G., Heymann H., Ebeler S. E. and LMills D.A. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio*. 7(3):e00631-16. doi: 10.1128/mBio.00631-16.
3. Chambers P.J. and Pretorius I.S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO reports*. 11:914–920. doi:10.1038/embor.2010.179.
4. du Plessis H.W., du Toit M., Hoff J.W., Hart R.S., Ndimba B.K. and Jolly N.P. (2017). Characterisation of non-*Saccharomyces* Yeasts Using Different Methodologies and Evaluation of their Compatibility with Malolactic Fermentation. *South African Journal for Enology and Viticulture*. 38(1):46-63.
5. Liu Y., Rousseaux S., Tourdot-Maréchal R., Sadoudi M., Gougeon R. and SchmittKopplin P. (2017). Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57:856–873. doi: 10.1080/10408398.2014. 983591.
6. 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. IntechOpen Rijeka, Croacia, 15 pp. eBook (PDF) ISBN: 978-1-83881-228-7. doi: dx.doi.org/10.5772/intechopen.84128.
7. 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: doi.org/10.3389/fmicb.2017.00995.
8. Jolly N.P., Varela C. and Pretorius I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeast in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*. 14, 215-237.
9. Ciani M. and Comitini F. (2019). Use of non-*Saccharomyces* Yeasts in Red Winemaking. In: *Red Wine Technology*. Morata A (Ed). Chapter 4. Academic Press. 51-68. ISBN 978-0-12-814399-5.
10. Vilela A. (2019). Use of non-conventional Yeasts for Modulating Wine Acidity. *Fermentation*. 5(1):27. doi:10.3390/fermentation5010027.
11. Lopes C.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.

- Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34:139-149. Springer Berlin/Heidelberg. ISSN: 1367-5435.
12. Tofalo R., Perpetuini G., Schirone M., Fasoli G., Aguzzi I., Corsetti A. and Suzzi Giovanna. (2013). Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *Frontiers in Microbiology*. 4:1-13.
  13. Llorente A. y Casazza M. (2005). Vitivinicultura de la Región Sur Argentina. *El vino y su industria*. 40:7-13.
  14. del Mónaco S.M., Curilen Y., Maturano R.C., Bravo S.M.E., Simes A.B. and Caballero A.C. (2016). The use of indigenous yeasts to develop high-quality Patagonian Wines. In: *Grape and Wine Biotechnology*. Morata A and Loira I (Eds.). Chapter 15. IntechOpen. Rijeka, Croacia. 327-344. ISBN: 978-953-51-4773-2.
  15. Parpinello G.P., Versari A., Chinnici F. and Galassi S. (2009). A Relationship among sensory descriptors, consumer preference and color parameters of Italian Novello red wines. *Food Research International*. 42:1389-1395.
  16. del Mónaco S., Barda N., Rubio N. and Caballero A. (2014). Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *Journal Applied Microbiology*. 117(2): 451-464. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12547>.
  17. Caballero A., Crisóstomo B. and Barbagelata R.J. (2005). Caracterización fisicoquímica de mostos tintos de calidad enológica de la norpatagonia argentina. In: *Actas del X Congreso Latinoamericano de Vitivinicultura y Enología*. Ed. Crivellaro Guerra C. y de Souza Sebben S. ISSN: 1516-8107. Bento Concalves, Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA).
  18. IRAM 20023 1999. Análisis sensorial. Instrumental. Copa para el análisis sensorial del vino.
  19. Gallina M., Barda N., Muzas G., Miranda M. y Suarez P. (2018). Evaluación agronómica y enológica de variedades no tradicionales de *Vitis vinífera* en la norpatagonia. Ediciones INTA. Libro digital. ISBN: 978-987-521-919-9 ( en revisión).
  20. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M. and Robledo C.W. (20016). InfoStat. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
  21. Di Rienzo J., Guzman, A.W. and Casanoves F. (2002). A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 7:129-142. Doi: 10.1198/10857110260141193.
  22. Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D. and R Core Team. (2020). Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-147. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
  23. del Mónaco S.M., Bravo S.M., Curilén Y.L., Carreño V.A. and Caballero A.C. (2014a). A Regional starter for high quality wines: An Argentinean Patagonia experience. *Bull OIV*. 87:217-222.
  24. Jackson R. (2014). Color-Red Wines. In: *Wine Science Fourth Edition*, Chapter 6. Chemical Constituents of Grapes and Wine. 351-430. Academic Press. NY USA. ISBN: 978-0-12-381468-5
  25. Morata A., Loira I. and Suarez Lepe J.A. (2016). Influence of yeasts in wine color. In: *Grape and Wine Biotechnology*. Antonio Morata e Iris Loira (Eds). Editorial InTech, Rijeka, Croacia. Chapter 13. 285-305. ISBN: 978-953-51-4773-2.
  26. Hermosín Gutiérrez I. (2007). Copigmentación y piranoantocianos: 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.
  27. del Mónaco S.M., Rodríguez M.E. and Lopez, C.A. (2016). *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International Journal of Food Microbiology*. 230:31-39. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.017