



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

ESCUELA DE INGENIERÍA

**COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
COMPUESTOS AROMÁTICOS POR CEPAS DE
LEVADURAS VÍNICAS COMERCIALES**

VÍCTOR GABRIELGUADALUPE MEDINA

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:

Eduardo Agosin Trumper

Santiago de Chile, agosto de 2008

A mis Padres, Gloria y Aladino, y a mis hermanos, Claudio, Pablo y Enrique que siempre me han apoyado.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios por las oportunidades y bendiciones que me ha dado. Le agradezco por mis padres y hermanos, quienes me han hecho la persona que soy hoy.

Agradezco a mis padres por toda mi educación, por estar siempre presentes y apoyarme en mis proyectos más difíciles. Agradezco a mis hermanos Claudio y Pablo por su cariño, afecto y preocupación. Agradezco a mi hermano Enrique, con quien he vivido estos años universitarios y por haber sido un modelo que desde pequeño he seguido.

Agradezco al Profesor Eduardo Agosín por el apoyo entregado y por toda la paciencia que ha tenido en el desarrollo de esta tesis. Agradezco a los profesores Ricardo Pérez, Edmundo Bordeu y Nicolás Majluf por sus valiosos comentarios y correcciones.

Agradezco a Fernando Córdova de Laffort y a Pedro Carriles de Lallemand por la entrega de las cepas utilizadas y sus comentarios en el desarrollo del trabajo.

Agradezco a todos mis compañeros de trabajo. A Francisco por su constante guía y amistad. A Felipe e Isabel, por su alegría y amistad. A Cristián por su amistad y ayuda en los experimentos y mediciones. A Anita por sus valiosos comentarios y participación en el desarrollo de los experimentos de GC-O. Especialmente quiero agradecer a Alejandro, por su buen humor y por su ayuda para montar el sistema de agua fría, que me permitió avanzar mucho más rápido en mis fermentaciones.

Agradezco a todo el personal del Centro de Aromas UC, por su paciencia y asistencia. Agradezco especialmente a Rosa por su colaboración y paciencia con los análisis de evaluación sensorial y GC-O. Agradezco también a mis amigos: Álvaro, Nicolás, Luciano, Martín, Juan Antonio, y Daniel, quienes me han acompañado en esta vida y en esta carrera.

Agradezco a CONICYT que financió parte de este trabajo a través del proyecto FONDECYT 1050688 "Fisiología Cuantitativa de Fermentaciones a Baja Temperatura: la Vinificación en Blanco como Modelo de Estudio", y a VINNOVA S.A. Consorcio Tecnológico Empresarial para la Vid y el Vino, que también financió parte de este trabajo a través del Proyecto 6: "Características y requerimientos de levaduras comerciales y su impacto sobre los atributos sensoriales de los vinos".

Finalmente, quiero agradecer a Caroline, por todo su amor, su enorme apoyo, y por ser uno de los motores de mi vida. Vielen Dank meine liebe Perle.

RESUMEN

La satisfacción de las preferencias del consumidor es el principal objetivo al elaborar un vino hoy en día. El aroma es el elemento principal en la diferenciación de los vinos y una forma de influir en él es la elección de la levadura para llevar a cabo la fermentación alcohólica. Existe una amplia oferta de éstas en el mercado, cada una presentada como única en sus características fermentativas y organolépticas. El presente trabajo se centra en la comparación de la contribución al aroma del vino realizada por distintas cepas comerciales de levaduras vínicas a través de tres aproximaciones experimentales: análisis químico, sensorial, y olfatométrico. Esto fue estudiado en fermentaciones de escala laboratorio en mosto sintético con el fin de aislar la contribución aromática de los compuestos sintetizados por la levadura. Seis cepas comerciales fueron escogidas por sus características aromáticas. Diferencias sensoriales significativas fueron determinadas entre la mayoría de los vinos (7 de 9 comparaciones pareadas). Perfiles aromáticos más semejantes fueron observados en vinos fermentados a 15° C que en vinos fermentados a 28° C. El análisis químico reveló que 13 compuestos volátiles poseían valores de OAV mayor que 1. Diez y once de estos compuestos presentaron diferencias significativas en concentración entre vinos fermentados a 15° C y a 28° C, respectivamente. Los resultados olfatométricos señalan la importancia de las relaciones entre aromas en el perfil aromático del vino y las diferencias observadas. Finalmente, este trabajo presenta evidencia sobre la contribución diferencial de las levaduras comerciales vínicas al aroma del vino. Ésta se relaciona con diferencias en concentración en compuestos específicos y grupos de compuestos. Se propone que relaciones entre aromas frutosos y microbiológicos, y la concentración de compuestos relacionados a ellos, son importantes para la diferenciación entre vinos elaborados por distintas cepas.

Palabras Claves: fermentaciones vínicas, levaduras comerciales vínicas, aroma del vino, cromatografía gaseosa acoplada a olfatometría (GC-O), cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría (GC-MS), evaluación sensorial.

ABSTRACT

Customer satisfaction is the key driver for product design in wine making industry. Aroma plays a key role in wine differentiation. One way to tailor aroma profiles in wine is by choosing the right yeast to carry out the alcoholic fermentation. There is a wide range of commercial wine yeasts available in the market. Each one is presented as possessing unique fermentative and organoleptic characteristics. This work aims to compare commercial wine yeast contribution to wine aroma through three experimental approaches: chemical analysis, sensorial analysis, and olfatometric analysis. This was studied in laboratory fermentations using synthetic must to isolate the contribution of aromatic compounds synthesized by yeast. Six commercial wine yeasts were chosen based on aromatic characteristics. Statistically significant sensorial differences were determined between most wines (7 of 9 paired comparisons). More homogeneous aromatic profiles were observed in wines fermented at 15° C compared to wines fermented 28° C. Chemical analysis revealed 13 volatile compounds with OAVs greater than 1. Ten and eleven of these compounds showed significant concentration differences between the wines fermented at 28° C and 15° C, respectively. Relationships between aroma families and their effect on the sensory profile were found by olfatometric analysis. This work presents evidence about the differential contribution of commercial wine yeast strains to wine aroma, which can be attributed to concentration differences in both, specific compounds and groups of compounds. It is proposed that relationships between fruity and microbiological aromas, and their concentrations, are important for wine differentiation produced by different yeast strains.

Keywords: Wine fermentation; Wine aroma; Wine yeast; GC-O; GC-MS; Sensorial Analysis

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se enmarca en el estudio de los aromas del Vino, producidos durante el proceso de fermentación alcohólica por la acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y se centra en el impacto de distintas cepas comerciales existentes en el mercado.

El vino es definido como una bebida alcohólica producto de la fermentación de jugo de uva, cuyos componentes principales son etanol, agua y compuestos minoritarios (Waterhouse & Kennedy, 2004). Su origen se remonta a tiempos ancestrales, con evidencias arqueológicas encontradas en Mesopotamia ya desde aproximadamente el año 5400 A.C. (McGovern et al., 1996). Dentro de estos compuestos minoritarios hay una infinidad de compuestos volátiles aromáticos, presentes en muy baja concentración pero que dan características únicas en sabor y aroma a cada vino. Estos aromas tienen cuatro orígenes posibles: la baya de uva, procesos pre-fermentativos, procesos fermentativos, y procesos post-fermentativos (Rapp & Mandery, 1986).

La industria del vino ha evolucionado durante los últimos años, tanto en nuestro país, como a nivel mundial, pasando de una industria antigua y tradicional a una moderna, preocupada por encontrar soluciones a los más variados problemas a través de la aplicación de nuevas tecnologías. Las propiedades aromáticas del vino son un elemento primordial en la diferenciación de éstos. Por su parte, el mercado del vino ha cambiado debido a que los consumidores se han vuelto cada vez más exigentes, transformando la orientación de la elaboración del vino hacia las preferencias del consumidor (Bisson et al., 2002; Pretorius & Bauer, 2002). En este contexto, una forma de intervenir las propiedades aromáticas del vino es a través de la elección de la levadura utilizada para realizar la fermentación. En efecto, su impacto en la complejidad química es significativo y único (Antonelli et al., 1999; Fraile et al., 2000; Romano et al., 2003; Erasmus et al., 2004; Swiegers et al., 2005; Regodón Mateos et al., 2006; Orlic et al, 2007). La caracterización química, sensorial y olfatométrica de las principales levaduras comerciales presentes en el mercado y su impacto sobre el perfil aromático del vino es el objetivo de esta tesis. Esto es realizado a través del análisis de vinos obtenidos por fermentaciones en escala de laboratorio de mosto sintético. El uso de mosto sintético permite aislar la contribución aromática de los aromas fermentativos sintetizados por la levadura, separándola de la contribución de los aromas varietales revelados. Esta aproximación al estudio de los aromas fermentativos no ha sido utilizada en anteriormente.

Esta tesis posee la siguiente estructura: un primer capítulo introductorio con los elementos necesarios para la realización de este trabajo, un segundo capítulo con los objetivos generales y específicos del proyecto, un tercer capítulo con las técnicas utilizadas para la ejecución de los experimentos, un cuarto capítulo con los resultados y su discusión correspondientes, y un quinto capítulo final con las

conclusiones finales del trabajo. Además se adjunta una sección de anexos donde se presentan con mayor detalle varios trabajos realizados durante esta tesis, vinculados con diversos elementos de ésta.

La introducción considera las siguientes partes:

Una breve revisión de trabajos previos sobre la influencia de la cepa de levadura en los aromas presentes en el vino y una motivación del trabajo presentado en esta tesis a partir de la revisión realizada.

Definición del vino, su industria y su mercado.

Caracterización del aroma del vino y las variables que influyen en él y cómo analizarlo.

Una reseña sobre las levaduras vínicas, su uso y mercado actual.

Una revisión de las técnicas de extracción de compuestos aromáticos en el vino, necesarias para aislar la componente aromática de una muestra.

Los principios de la cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masa como técnica de análisis químico junto con sus principales aplicaciones en el estudio de los compuestos volátiles presentes en el vino.

Los principios de la cromatografía gaseosa acoplada a la olfatometría como técnica de análisis de los compuestos aromáticos.

Los principios del análisis sensorial, utilizado para el estudio del aroma.

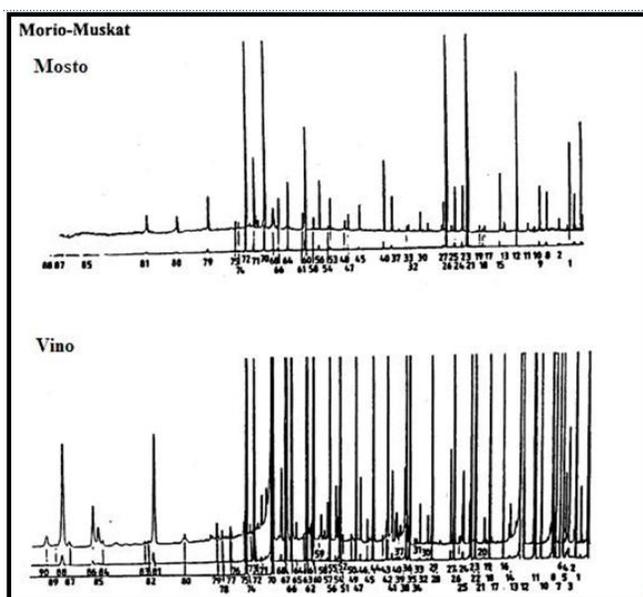
La hipótesis formulada al inicio de este trabajo.

1.1 Motivación: Breve revisión de trabajos anteriores

El aroma del vino ha sido estudiado extensamente por distintos autores debido a que es un elemento diferenciador. El aroma del vino resulta de la mezcla de una gran cantidad de compuestos, los cuales son producto de la contribución de las diversas etapas de producción, desde la baya hasta la de maduración en barrica. El aroma del vino en general, así como elementos particulares de éste, e.g. ciertas notas aromáticas específicas, han sido estudiados en profundidad. Estos estudios han tenido tanto un enfoque orientado a la caracterización aromática como un enfoque orientado a la determinación de las variables que más influyen en él (Kinzer y Schreier, 1980; Rapp, 1998; de Revel et al., 1999). Otros estudios se han centrado en ciertos tipos de vino, diferenciados por su origen geográfico (Bonino et al., 2003; Alves et al., 2005; Bailly et al., 2006), o por una modificación en el proceso de elaboración (Aznar et al., 2001; Campo et al., 2006), o la variedad de baya utilizada en su producción (Buettner, 2004; Belancic & Agosin, 2007). Este trabajo apunta a cuantificar la contribución realizada por la acción de la levadura *S. cerevisiae* en los aromas del vino durante el proceso de fermentación alcohólica. Cabe señalar que esto ya ha sido abordado previamente (Rapp, 1998; Swiegers et

al., 2005), demostrándose que por acción de la levadura la complejidad química de un mosto después de fermentar aumenta significativamente (Figura 1-1).

Figura 1-1: Cromatograma de mosto sin fermentar (Arriba) y de su vino correspondiente (Abajo), Variedad Morio-Muskat (Rapp, 1998)



Como se puede observar, el número de picos en cada cromatograma, donde idealmente cada uno representa a un compuesto químico vínico, aumenta considerablemente al comparar el cromatograma proveniente del mosto, previo a fermentar, y el otro obtenido del mosto después de fermentado. Sin embargo, a pesar que el efecto de la levadura en la complejidad química del vino ha sido demostrado, no existe total claridad respecto del papel de la levadura en la producción del vino. Al respecto, Thorngate (1998) discute los dos postulados principales existentes en la industria respecto de las levaduras vínicas: 1) las levaduras nativas presentes en las bodegas influyen en la calidad aromática de un vino y éstas han sido seleccionadas naturalmente, y 2) hay diferencias en la contribución aromática que hace cada cepa de levadura y ese efecto es significativo a nivel sensorial. Thorngate concluye, primero que las cepas de *S. cerevisiae* no han evolucionado bajo presiones selectivas y que éstas no exhiben un desempeño consistente en el tiempo, por lo que la segunda afirmación del primer postulado es falsa; y segundo que a pesar de que existen diferencias en los compuestos aromáticos producidos, dado el alto número de otros factores que pueden afectar la componente aromática del vino no se puede llegar a una conclusión definitiva al respecto. Por lo tanto el segundo postulado aparece incierto, y el autor propone más estudios al respecto.

Así, diversos estudios se han enfocado en la diferenciación de vinos fermentados por distintas levaduras (Antonelli et al., 1999; Fraile et al., 2000; Delfini et al., 2001; Erasmus et al., 2004; Regodón Mateos et al., 2006; Orlic et al., 2007). Ninguno de

estos estudios se ha centrado en aislar la contribución aromática de una cepa de levadura específica, separándolo de los efectos propios del uso de una variedad de uva determinada, del procesamiento de las uvas y de los parámetros de fermentación. Tampoco éstos se han centrado exclusivamente en la síntesis de compuestos aromáticos por la levadura, aislando el efecto revelador de aromas varietales realizado también por las mismas. Este es el aporte del trabajo presentado en esta tesis, la cuál pone énfasis en la síntesis de compuestos aromáticos producidos por la levadura durante de una fermentación vínica, separándola del efecto de variedad de mosto utilizado y del efecto revelador de compuestos aromáticos varietales que suele ejercer también la levadura. De esta forma, utilizando condiciones controladas de laboratorio pero al mismo tiempo tratando de emular las condiciones industriales de operación, se compara la componente aromática entregada al final de la fermentación por distintas cepas de levaduras vínicas comerciales, desde un punto de vista químico, olfatométrico y sensorial.

1.2 El Vino

El vino, como fue mencionado anteriormente, es una bebida alcohólica producto de la fermentación de jugo de uva, cuyos componentes principales son etanol, agua y compuestos minoritarios. (Tabla 1-1).

Tabla 1-1: Concentración (porcentaje volumen-volumen) de componentes principales y compuestos minoritarios (mg/L) del vino.

| Componentes Mayoritarios | Concentración [% volumen-volumen] | Compuestos Minoritarios | Concentración [mg/L] |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------|
| Agua | 85 | | |
| Etanol | 12 | | |
| Compuestos Minoritarios | 3 | Glicerol | 7000 |
| | | Acidos | 6000 |
| | | Fenoles | 1800 |
| | | Minerales | 1200 |
| | | Azúcares | 750 |
| | | Aminoácidos | 550 |
| | | Alcoholes Superiores | 500 |
| | | Acidez Volátil | 400 |
| | | Sorbitol y Manitol | 300 |
| | | Sulfitos | 80 |
| | | Acetaldehído | 70 |
| | | Ésteres | 60 |
| Subtotal | | 18710 | |
| Total | 100 | | |

(Waterhouse & Kennedy, 2004)

Como se observa en la tabla anterior, los componentes minoritarios representan una muy pequeña parte de la composición principal, pero dentro de estos componentes minoritarios, la composición es muy variada, entre ellos se encuentran compuestos aromáticos.

1.2.1 Historia del Vino en el Mundo

El consumo del vino se remonta a los comienzos del hombre. El vino ha tenido un papel cultural, económico y religioso para el mundo occidental desde el comienzo de las grandes civilizaciones. Su producción y consumo se inicia con el cultivo de la vid, el que se supone comienza entre los ríos Tigris y Éufrates, que corresponde hoy a Irak, hace más de 5.000 años. Existen registros históricos del cultivo de la vid y la elaboración de vino en el Imperio Asirio Babilónico, Egipto, la Antigua Grecia y el Imperio Romano. Es este último el que difunde la vitivinicultura al mundo occidental. Después de la caída del Imperio Romano, el cultivo de la vid disminuye y se mantiene en castillos feudales y conventos. Durante ese tiempo, el vino era destinado para la élite y su consumo era localizado. Entre los siglos XII y XVII, la vitivinicultura aumenta, dado el crecimiento de las ciudades y el traspaso de parte del cultivo de los viñedos a la burguesía. En el siglo XVIII, aparecen los grandes vinos de Champagne, Burdeos y Jerez. La vid es transportada hacia América por la conquista española y la expansión del cristianismo en el siglo XVI, expandiéndose su cultivo a México y Sudamérica. Del mismo modo, su cultivo también se expande a Sudáfrica con la colonización europea de África. El comercio del vino crece durante todo este tiempo, muchas veces ligado a la política, transformándose finalmente en una industria moderna (Hernández, 2000).

Durante esta larga historia, la forma de producir el vino se mantuvo en el tiempo de manera casi intacta, con cambios muy pequeños durante la mayor parte de su historia, hasta comienzos del siglo XX, donde se realizan los cambios que la transforman en la industria que es hoy. Así, su producción y almacenaje, comienza con las "dolias", grandes contenedores hechos de arcilla utilizados en la antigüedad para la fermentación y su almacenaje, para ser reemplazado por el uso de las aún actuales pero muy antiguas barricas, toneles y cubas de madera en el siglo I A.C., las cuáles son reemplazadas recién durante el siglo pasado por estanques de hormigón, luego por estanques de fierro epoxicado, y finalmente por los actuales estanques de acero inoxidable (Hernández, 2000). El entendimiento del proceso fermentativo fue descubierto en 1789 por Antoine Lavoisier, quién realizó los primeros estudios en fermentaciones alcohólicas. Por su parte, en 1857, Louis Pasteur demostró que el vino era producido por organismos microscópicos denominados levaduras. Esto llevó a una serie de descubrimientos sobre las levaduras, debido principalmente a que los microscopios de la época hicieron posible su estudio con el financiamiento de las industrias relacionadas a las fermentaciones alcohólicas (Barnett, 2003).

1.2.2 Historia del Vino en Chile

La historia del vino en Chile comienza en la época de la Colonia, con viñas plantadas por colonizadores españoles, orientadas principalmente a la celebración eucarística y al consumo local. A pesar de la protección realizada por el reino de España del comercio de sus vinos en Chile, dada sus condiciones de lejanía y problemas con alzamientos indígenas, se tenía la venia real para la plantación de viñas, por lo que

el cultivo de las vides creció y se extendió ampliamente. Después de la Independencia, Chile ya es un país con amplias plantaciones, pero con una producción destinada al consumo local y a exportaciones a los países vecinos solamente, mientras se continuaba elaborando el vino de la misma forma que durante la Colonia. Pero en 1851, Silvestre Ochagavía Echazarreta trae desde Burdeos, Francia, las más destacadas variedades francesas: Cabernet Sauvignon, Cot (Malbec), Merlot, Pinot Noir, Sauvignon, Chardonnay, Semillon y Riesling. Este ejemplo es seguido por varios agricultores de la época, quienes continúan importando diversas cepas francesas, con una exitosa adaptación en las tierras chilenas. Durante este tiempo la vitivinicultura chilena se convierte en una actividad relacionada con la distinción social de una familia, sólo realizada por los agricultores suficientemente acaudalados. Al mismo tiempo, y debido a la acción de la plaga filoxera, insecto norteamericano que devasta los cultivos europeos, una gran cantidad de enólogos franceses llegan a Chile y se encargan del cuidado de estos cultivos. Este fenómeno no es exclusivo de Chile, sino que también se observa en los países vecinos y en California con enólogos y expertos europeos. Es en este período que la vitivinicultura chilena presenta su mayor crecimiento y prosperidad, y en el cual en 1877 por iniciativa de Macario Ossa comienza la exportación de los vinos chilenos a Europa. De esta forma a comienzos del siglo XX, la industria vitivinícola era similar a la de los países europeos, pero por problemas de sobrepoblación de viñedos y legislaciones negativas para la industria, ésta cae en decadencia. Es nuevamente a partir del año 1986 que comienza a resurgir la vitivinicultura chilena, gracias al éxito de exportaciones de vinos finos, con el desarrollo de áreas tradicionales de cultivo del Valle Central y algunas zonas nuevas (Hernández, 2000). **1.2.3 Mercado del Vino**

La industria moderna del vino posee un mercado de orden mundial, con alrededor de 68 países productores, destacándose los países europeos como Francia, España, Italia, y Alemania, y los países del Nuevo Mundo como Chile, Australia, Sudáfrica, y Argentina. Si bien Chile es un país productor, no es uno de los grandes productores de vino y vid, grupo compuesto por países europeos de tradición como España, Francia e Italia y por países del Nuevo Mundo con mayores superficies con plantaciones de vid como Estados Unidos, Argentina y Australia. Esto cambia al considerar la exportación de vinos, donde Chile ocupa el 5º lugar mundial, el 2º país dentro de los países del nuevo mundo, después de Australia. Sin embargo, se observa un dominio europeo en las exportaciones totales, con Francia, España e Italia en los primeros tres lugares (OIV, International Organization of Wine and Vine).

En la actualidad, la industria mundial del vino se ve enfrentada a nuevos desafíos como la consolidación de la oferta y la distribución, una mejor y mayor información de los consumidores, y las nuevas exigencias en el mercado. La consolidación de la oferta y la distribución se refiere a la transferencia del poder de decisión en la producción que antes tenía el productor, dueño de la oferta, hacia el consumidor, propietario de la demanda, transformándolo en la fuerza motriz del mercado. Esto trae nuevos desafíos que radican en el uso de nuevos sistemas de distribución que sean adecuados a los requerimientos de los clientes más exigentes, y en el ajuste de tamaño y orientación a categorías específicas del mercado. La transferencia de poder, que es provocada por cambios sociales en la forma de pensar ocurridos

durante el siglo pasado, cuestionando lo antes considerado válido e inamovible, más la mayor facilidad de acceso a información, ha llevado hoy a que los consumidores aumenten las exigencias respecto a los vinos que desean consumir, definiéndose segmentos más precisamente orientados a la satisfacción de necesidades individuales. Además, la tendencia de los consumidores de consumir menos bebidas alcohólicas y el ingreso de los países del Nuevo Mundo, han producido una creciente diferencia entre la cantidad de vino elaborado y la cantidad consumida, transformando el mercado en uno global, sin fronteras y altamente competitivo (Pretorius & Bauer, 2002). Luego, para poder satisfacer las necesidades individuales de los consumidores, el uso de herramientas de marketing y análisis sensorial para orientar los productos de manera específica, y el entendimiento de cómo un vino puede ser elaborado de manera específica, son de vital importancia (Mundos, 2006).

Así, a partir de los nuevos desafíos de la industria y del estado actual de nuestro país en el mercado del vino, es posible concluir que si se desea mantener el nivel alcanzado y crecer en participación de mercado, el estudio de procesos productivos para dilucidar las distintas variables que influyen en la calidad de un vino en sus propiedades organolépticas, es donde la ciencia puede contribuir para lograr una mayor capacidad para competir en el mercado mundial del vino (Bisson et al., 2002; Swiegers et al., 2005).

1.2.4 Aromas en el Vino

Los aromas del vino son un carácter diferenciador, incluso aunque estos compuestos químicos sean tan sólo una muy pequeña parte de los compuestos minoritarios presentes en el vino. Los compuestos minoritarios en el vino representan solamente el 3% en volumen del vino, y de éstos aproximadamente 0,8-1,2 g/L, cerca del 1% de la concentración de etanol, corresponden a compuestos aromáticos. De éstos últimos, la mayoría son producidos durante la fermentación alcohólica donde ácido acético, acetaldehído, acetato de etilo, propanol, isobutanol, 2- y 3-metilbutanol representan la mitad de los compuestos volátiles presentes en el vino, mientras que la otra mitad se distribuye entre 600 a 800 compuestos volátiles menores presentes en muy bajas concentraciones, las cuales varían entre 10^{-4} a 10^{-10} g/L (Rapp y Mandery, 1986; Rapp, 1998; Regodón Mateos et al., 2006). A pesar de estas muy bajas concentraciones, diferencias sutiles pueden ser percibidas debido a que la nariz humana presenta una extraordinaria sensibilidad, poseyendo umbrales de percepción para estos compuestos aromáticos que pueden variar entre 10^{-4} y 10^{-13} g/L (Guadagni et al., 1963; Rapp, 1998).

Diversos trabajos han clasificados los aromas presentes en el vino (Schreler, 1979; Nykanen, 1986; Rapp y Mandery, 1986; Rapp, 1998; Ebeler, 2001; Pisarnitskii, 2001):

Aromas Primarios o provenientes de la baya: se refiere a los compuestos aromáticos presentes en las células intactas de la baya de la vid.

Aromas Secundarios de la baya: se refiere a los compuestos aromáticos formados durante el procesamiento de la baya en mosto. Estos compuestos pueden aparecer

a partir de procesos físicos, como la extracción del jugo de la baya, o de procesos químicos, como reacciones químico-enzimáticas o térmicas.

Bouquet Fermentativo o Aromas Fermentativos: son los aromas producidos en los procesos fermentativos como la fermentación alcohólica, fermentación maloláctica u otra fermentación secundaria.

Bouquet de Maduración o Aromas de Maduración: corresponden a los aromas formados por reacciones químicas que ocurren en el proceso de maduración, el que ocurre en barriles de madera o en la botella.

Para cada una de estas categorías existen variables capaces de influir en los aromas presentes en el vino, algunas que pueden ser controladas y otras que no lo son. Las variables posibles de controlar son las que presentan mayor interés, dado que con un estudio acabado de ellas y el entendimiento de los efectos producidos en el aroma de un vino por cada una de ellas, es posible obtener caldos con características específicas, orientados a segmentos particulares del mercado.

Aromas primarios: Numerosas variables influyen en los compuestos aromáticos provenientes de ésta categoría (Jackson y Lombard, 1993), entre las cuáles el tipo de variedad de uva utilizada es considerado como el principal por muchos autores (De Calle García et al., 1998; Hernández-Orte et al., 2002; Campo et al., 2005; Piñeiro et al., 2006). También el efecto del "terroir", término francés usado para definir el conjunto clima, suelo y vid, ha sido desde siempre utilizado para diferenciar los vinos de acuerdo a su origen (Vaudour, 2002; Van Leeuwen y Seguin, 2006), y ha sido estudiado como una variable estadísticamente significativa, capaz de diferenciar entre vinos a través de datos químicos y sensoriales por medio de su análisis multivariado (Latorre et al., 1994; Sivertsen et al., 1999; Korenovská y Suhaj, 2005). Además, las distintas prácticas en el manejo del cultivo pueden tener efecto también en los aromas producidos en la baya: por ejemplo, la cantidad de uvas cosechadas por hectárea influye en el tipo y cantidad de aromas expresados en Cabernet Sauvignon (Bravdo et al., 1985; Chapman et al., 2004).

Aromas secundarios: En este caso, las distintas opciones existentes para llevar a cabo los procesos físicos necesarios para obtener el mosto a fermentar y su impacto en la cantidad y calidad de aromas liberados no ha sido muy estudiado (Kinzer y Schreier, 1980). Por el contrario, las reacciones químico-enzimáticas o térmicas que ocurren durante el proceso de extracción del mosto han sido objeto de numerosos trabajos que discuten su influencia en el aroma (Cabaroğlu et al., 1997; Genoves et al., 2005; Moreno-Arribas y Polo, 2005; Palomo et al., 2005; Rocha, S. M. et al., 2005; Piñeiro et al., 2006).

Aromas fermentativos: Estos serán tratados en forma separada más abajo, dado el interés especial en ellos en este trabajo.

Aromas de maduración: Producto principalmente de procesos fisicoquímicos ocurridos durante el contacto con la madera y la microoxigenación ocurrida durante el tiempo en la maduración en barrica (Kelly y Wollan, 2005; Marín et al., 2005; Guchu et al., 2006), o exclusivamente por microoxigenación en el caso de envejecimiento en botella (Lopes et al., 2005; Lopes et al., 2006, 2007). Otro

proceso alternativo para la maduración de los vinos es el contacto con levaduras muertas o lías, donde por medio de reacciones enzimáticas se busca mejorar las propiedades organolépticas del vino (Salmon y Vuchot, 2003; Hernández et al., 2006).

La principal problemática en el estudio de la componente aromática del vino radica en cómo medirla, la cuál ha sido abordada por medio de tres aproximaciones: el análisis químico del aroma del vino, el análisis sensorial del vino, y diversas combinaciones de las dos anteriores. Cada unas de estas aproximaciones son tratadas a continuación.

1.3 Aromas Fermentativos

La contribución aromática de la etapa fermentativa ha sido estudiada desde diversas perspectivas, identificando aquellas variables que más influyen en la producción de aromas, comparando rendimientos entre distintas cepas en mostos específicos (Antonelli et al., 1999; Regodón Mateos et al., 2006) e interacciones de éstas durante la fermentación alcohólica (Fleet, 2003). Una variable que ha sido estudiada recientemente es la cantidad de nitrógeno disponible, específicamente el perfil de aminoácidos que posee el mosto, demostrándose que éste tiene una relación cercana con la cantidad y calidad final de los compuestos aromáticos fermentativos (Hernández-Orte et al., 2002). Con el mismo objetivo, se ha estudiado los efectos en los compuestos aromáticos y en la cinética de fermentación producidos por la adición de fuentes de nitrógeno como amonio y aminoácidos, demostrándose cambios en las concentraciones de compuestos volátiles y no volátiles en todos los casos (Hernández-Orte et al., 2006; Jiménez-Martí et al., 2007; Vilanova et al., 2007; Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2008).

Dentro de los aromas fermentativos, se distingue entre aromas sintetizados por la levadura, de aromas revelados a partir de precursores no aromáticos por la levadura. Los primeros son sintetizados a través del metabolismo de la levadura a partir de nutrientes presentes en el mosto y luego liberados en el medio. Los segundos son liberados por procesos de hidrólisis enzimática por acción de la levadura a partir de precursores presentes en el mosto en forma no-volátil, al estar unidos a moléculas de gran tamaño. Estos últimos dependen principalmente de la variedad de uva utilizada para la confección del vino, por lo que también forman parte del aroma varietal. En este trabajo, nos focalizaremos en aromas fermentativos sintetizados por la levadura, excluyéndose los aromas varietales liberados a partir de sus precursores. Los principales tipos de aromas fermentativos sintetizados son ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres, y en menor extensión aldehídos. Los aromas fermentativos pueden otorgar tanto características positivas, como aromas frutosos o florales (e.g. ésteres y alcoholes superiores), pero también características negativas, como químicas (e.g. nariz acética). Ambos tipos de contribuciones han sido estudiadas, con el objetivo de entender cuáles son las variables que influyen en su producción. Cabe mencionar a este nivel que si bien la contribución aromática realizada por la levadura ha sido el principal objeto de estudio, también se ha evaluado la contribución aromática de la bacteria *Oenococcus oeni* durante la fermentación maloláctica. El principal aroma producido

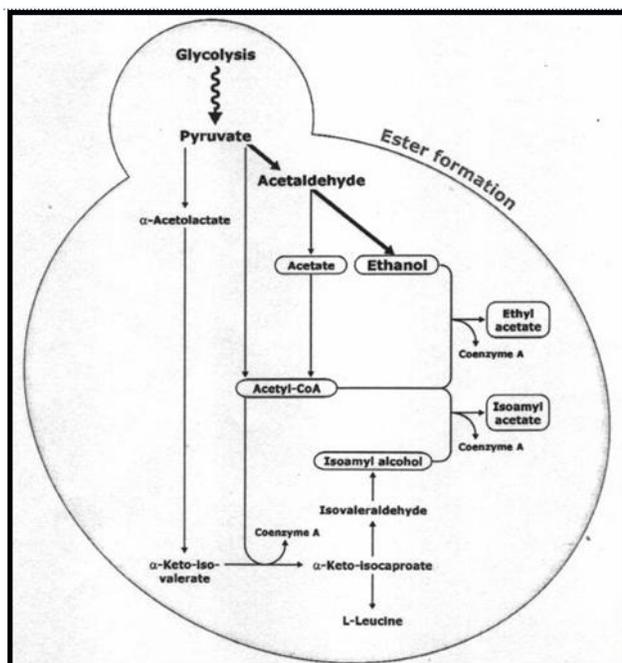
durante la fermentación maloláctica es diacetilo, responsable de aromas a mantequilla y nueces (Nielsen y Richelieu, 1999).

Debido a que *S. cerevisiae* ha sido empleada profusamente como microorganismo modelo en el desarrollo de la microbiología, las vías metabólicas para la síntesis de estos compuestos en la levadura han sido descifradas en su mayoría. A continuación se revisará brevemente las vías metabólicas involucradas, los genes involucrados y los sustratos utilizados para la síntesis de las tres principales familias de aromas fermentativos.

1.3.1 Ésteres

Los ésteres producidos durante la fermentación poseen un efecto significativo en los aromas frutuosos en el vino, destacándose el acetato de etilo, acetato de isoamilo, isobutil acetato, hexanoato de etilo, y acetato de feniletilo. Los ésteres son productos secundarios del metabolismo de azúcares, lípidos y acetyl-CoA (figura 1-2), y son producidos usualmente en concentraciones sobre su umbral de detección. Son clasificados ya sea como ester etílico o ester acetato. Los primeros resultan de la reacción entre etanol y un ácido graso, mientras que los segundos provienen de la reacción entre acetato y un alcohol superior. Si bien los ésteres son productos metabólicos secundarios de la levadura, existe una relación de sinergia entre la variedad de uva y esta variable, produciendo concentraciones distintas de ésteres entre tipos de vinos. Aún más, existen ésteres específicos presentes en Pinot Noir, sintetizados a partir de precursores encontrados en la baya y que poseen aromas distintos a ésteres producidos a partir del metabolismo de azúcares (Moio y Etievant, 1995). La síntesis de ésteres acetato es catalizada por las isoenzimas alcohol acetiltransferasa (ATT), las que son codificadas por los genes ATF1 y ATF2. El estudio de estos genes, en especial por medio de su sobreexpresión, ha resultado en un significativo incremento en la producción (10 veces mayor) de etil acetato, acetato de isoamilo, y aceto de fenil etilo, teniendo un efecto pronunciado en los aromas químicos, frutuosos y florales del vino (Lilly et al., 2000; Verstrepen et al., 2003; Swiegers et al., 2005). La síntesis de ésteres etílicos es realizada por la acción de dos enzimas acetyl-CoA-transferasas, codificadas por los genes EEB1 y EHT1 (Saerens et al., 2006). Un estudio reciente sobre los factores que afectan la síntesis de ésteres etílicos en una levadura cervecera industrial, señaló que la sobreexpresión de ambos genes no es el factor limitante mientras que la disponibilidad de ácidos grasos de cadena media sí lo es (Saerens et al., 2008). Contradictoriamente, un estudio anterior de la sobreexpresión del gen EHT1 en una levadura comercial vínica, resultó en un incremento marcado de las concentraciones de etil hexanoato, etil octanoato y etil decanoato, lo que se tradujo en un intenso aroma a manzana (Lilly et al., 2004; Swiegers et al., 2005).

Figura 1-2: Representación de las vías metabólicas para la síntesis de ésteres. (Swiegers et al., 2005)



1.3.2 Ácidos Orgánicos

Los ácidos orgánicos están formados por ácidos de cadena corta y ácidos grasos, los cuáles provienen principalmente del metabolismo de los lípidos en la levadura. Estos son responsables de la acidez volátil de un vino y se caracterizan por aportar aromas descritos como químicos como vinagre o alcohol irritante, o microbiológicos como queso o leche cortada. De los ácidos presentes, el más importante es el ácido acético, que representa cerca del 90% de la acidez volátil de un vino y cuya producción (entre 100 mg/L y 2 g/L) depende de la cepa utilizada. El acetato, la base conjugada de ácido acético, es producido por la levadura como un intermediario del bypass de la piruvato deshidrogenasa, vía metabólica responsable de la conversión de piruvato en acetil-CoA. El bypass de piruvato deshidrogenasa provee a la célula de acetil-CoA citosólico, el cuál es necesario para la biosíntesis de lípidos. La enzima acetaldehído deshidrogenasa es la responsable de la formación de acetato por medio de la oxidación del acetaldehído producido a partir del piruvato. Los genes ALD6, ALD2 y ALD3 codifican enzimas citosólicas de la acetaldehído deshidrogenasa, mientras que los genes ALD4 y ALD5 codifican enzimas mitocondriales, demostrándose que las proteínas correspondientes Ald6p, Ald5p y Ald4p son las principales enzimas responsables de la producción de acetato en fermentaciones anaeróbicas vínicas (Pronk et al., 1996; Navarro-Avino et al., 1999; Saint-Prix et al., 2004; Swiegers et al., 2005).

Los ácidos grasos de cadena corta (C2-C6) son usualmente subproductos de la fermentación, mientras que los ácidos grasos de cadena media (C8-C12) y larga (C14-C18) son intermediarios o precursores en la síntesis de diversos lípidos presentes en la levadura. La influencia aromática de estos compuestos no ha sido estudiada en extenso, en comparación a los ésteres etílicos, aunque algunos de éstos (ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, y ácido isovalérico) han

sido señalados recientemente como compuestos químicos con alto impacto aromático en vino (Aznar et al., 2001; Komes et al., 2006; Li et al., 2008). La vía de biosíntesis de ácidos grasos ha sido ampliamente estudiada, ésta comienza con la formación de acetil-CoA por medio de decarboxilación oxidativa de piruvato. A partir del acetil-CoA, la síntesis de ácidos grasos saturados de cadenas largas ocurre gracias a la acción de dos sistemas enzimáticos: acetil-CoA carboxilasa y sintetasa de ácidos grasos. Primero la acetil-CoA carboxilasa convierte acetil-CoA a malonil-CoA, el cuál es utilizado por el complejo sintetasa de ácidos grasos para llevar a cabo sucesivas condensaciones entre una enzima unida a acetil-CoA y malonil-CoA. Para ácidos grasos con números de carbono impares, propionil-CoA reemplaza a acetil-CoA. La síntesis de ácidos grasos insaturados requiere de la presencia de oxígeno para que la enzima de-saturasa de ácidos grasos actúe; en consecuencia *S. cerevisiae* no puede crecer en condiciones estrictamente anaeróbicas sin que se adicionen estos compuestos (Ratledge y Evans, 1989; Paltauf et al., 1992; Lambrechts y Pretorius, 2000).

1.3.3 Alcoholes Superiores

Los alcoholes superiores son metabolitos secundarios, caracterizados por tener aromas positivos en bajas concentraciones (bajo 300 mg/L) y negativos en altas concentraciones (sobre 400 mg/L). Se dividen en dos categorías: alifáticos (propanol, alcohol isoamílico, isobutanol, y amil alcohol activo) y alcoholes aromáticos (2-fenil etanol y tirosol). Son producto del metabolismo de aminoácidos ramificados y aromáticos, por lo que la cantidad de cada uno de ellos presente en el mosto influye en su producción, aunque otras variables también influyen en su concentración final en vino (e.g. concentración de etanol, temperatura de fermentación, pH y composición del mosto, aeración, nivel de sólidos, variedad y madurez de la uva, y tiempo de contacto con la piel de la baya). Pueden ser producidos por medio de degradación de aminoácidos (por medio de la vía de Ehrlich) o biosíntesis de aminoácidos a partir de glucosa. El primer paso en su producción involucra la síntesis de los α -ceto ácidos. Por la vía de Ehrlich, esto se traduce en la transaminación de un aminoácido para dar su α -ceto ácido correspondiente, reacción catalizada por las enzimas aminotransferasas mitocondrial y citosólica, codificadas por los genes BAT1 y BAT2 respectivamente para las aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada (Eden et al., 2001). La siguiente etapa es la decarboxilación del α -ceto ácido por medio de la enzima piruvato decarboxilasa en su correspondiente aldehído, el cual es reducido a alcohol superior por medio de la enzima alcohol dehidrogenasa junto con la reoxidación de NADH, siendo parte del balance redox de la levadura. Aún con esto, la función específica de los alcoholes superiores es desconocida ya que su aporte a la reoxidación de NADH no es significativo en la mantención del balance redox (Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005). Más recientemente, un estudio de sobreexpresión de los genes BAT1 y BAT2 en una levadura vínica comercial (VIN-13) demostró un aumento significativo en la concentración de alcohol isoamílico, isobutanol y ácido isobutírico en la cepa modificada respecto al control (Lilly et al., 2006).

1.4 Levaduras Vínicas

El uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones vnicas ha sido comprobado desde tiempos muy antiguos, cercanos al año 3000 A.C., a través de la extracción, amplificación y secuenciación de DNA ribosomal encontrado en antiguas jarras de vino de Egipto (Cavaliere et al., 2003). A pesar del amplio uso de este microorganismo en procesos fermentativos para la producción de vinos, cervezas y pan, el proceso se mantuvo durante mucho tiempo como una incógnita hasta que en 1789 Antoine Lavoisier realizó los primeros trabajos científicos sobre la fermentación alcohólica en vinos, determinando la composición química de las sustancias fermentables y los productos de fermentación, junto con los cambios ocurridos durante el proceso. A pesar de esta primera aproximación, aún era desconocido el agente generador del cambio en el proceso fermentativo. En aquel entonces Francia era el mayor productor de vino del mundo, y grandes cantidades de este vino se perdían al descomponerse por razones desconocidas, volviéndose vinagre o adquiriendo mal sabor. Es así como en 1803 el Instituto de Francia ofrece una medalla de 1 kg de oro a quién fuera capaz de resolver la siguiente pregunta: *¿Qué características son las que permiten distinguir substancias animales y vegetales que actúan como fermentadores de aquellos que son fermentados?* Esta pregunta queda sin una respuesta satisfactoria hasta que en 1836-1837, y gracias a los avances en la microscopía en 1820 por Giovanni Amici, tres científicos: Charles Cagniard-Latour, Friedrich Kützing y Theodor Schwann, en forma independiente, señalaron a las levaduras como organismos vivos responsables de la fermentación, no un compuesto químico. A pesar de esto, varios científicos importantes de esos tiempos, en especial del área química, rechazaron las investigaciones, tachándolas de mal realizadas y ridiculizándolas. Al mismo tiempo, señalaban a la acción del aire en el mosto o a reacciones catalíticas como fenómenos responsables de la fermentación alcohólica. Esta polémica finaliza en 1857 cuando Louis Pasteur demostró que las levaduras eran responsables de la fermentación alcohólica, un organismo vivo, y que el proceso de fermentación alcohólica es un proceso fisiológico. Así, la identificación del responsable de la fermentación alcohólica es parte del comienzo tanto de la microbiología como de la bioquímica, y se convierte luego en uno de los microorganismos más ampliamente estudiados hoy en día (Barnett, 2003).

Las levaduras relacionadas con el vino son todas aquellas que han sido encontradas en bayas de uva, en los viñedos, en el vino, o en el equipamiento de la viña. Se hace aquí una diferencia entre levaduras silvestres y levaduras vnicas. Las primeras son aquellas levaduras de género no-*Saccharomyces* que se encuentran mayoritariamente en la piel de la baya de uva y participan en el comienzo de la fermentación. Las levaduras vnicas son principalmente del género *Saccharomyces*, donde la especie *S. cerevisiae* es la principal representante. *S. cerevisiae* no se encuentra presente en grandes números en la piel de la baya, pero se encuentra tan bien adaptada al jugo de uva como medio de crecimiento, que rápidamente domina la fermentación, transformándose prácticamente en un cultivo puro al fin de la fermentación (Boulton et al., 1999). El origen de *S. cerevisiae* es controversial, postulándose que es una especie domesticada originada de *S. paradoxus*, una levadura silvestre asociada a insectos, exudados de árboles y plantas fermentativas (Querol et al., 2003). No obstante su origen, *S. cerevisiae* ha sido sujeta a

presiones selectivas, siendo las más importantes la alta presión osmótica debido al azúcar presente en el mosto y la resistencia al etanol producido durante la fermentación, que le han otorgado la capacidad de crecer rápidamente en los mostos.

Dos subespecies destacan en la oferta comercial: *S. cerevisiae cerevisiae* y *S. cerevisiae bayanus*, donde la primera se destaca por la capacidad de utilizar mejor fructosa en comparación con *S. cerevisiae bayanus*, junto con producir vinos más aromáticos. *S. cerevisiae bayanus* destaca por ser una cepa más robusta en cuanto a capacidad fermentativa.

En la actualidad existen diversas compañías dedicadas a la producción de levaduras para la elaboración de cerveza, pan o vino. Entre éstas destacan a nivel mundial las compañías DSM (Dutch State Mines), Laffort Oenologie, y Lallemand, todas fundadas a comienzos del siglo pasado. Cada productor cuenta con una amplia gama de levaduras comerciales, cada una con características únicas (Tabla 1-2).

Tabla 1-2: Principales compañías que ofrecen levaduras vínicas comerciales.

| Compañía | Historia | Oferta |
|--|---|-----------------------------------|
| DSM (Dutch State Mines), DSM Oenologie | Fundada en el año 1902 como una empresa minera de carbón del gobierno holandés, después de la 1ª Guerra Mundial comenzó a diversificar su negocio en áreas como fertilizantes, químicos industriales, materias primas para fibras sintéticas, y entre otras, levaduras comerciales. | 18 levaduras vínicas comerciales. |
| Laffort Oenologie | Fundada en 1895 por Jean Laffort en Francia, después de los descubrimientos de Pasteur. La empresa inicialmente regional, creció para alcanzar nivel nacional y luego internacional, orientándose exclusivamente a productos enológicos. | 20 levaduras vínicas comerciales. |
| Lallemand | Fundada en 1915 por Fred Lallemand en Montreal, Canadá, inicialmente se dedicó al negocio de refinamiento de aceites para panaderos; posteriormente, en 1923 comenzó a producir levaduras para la producción de pan. En 1977, comienzan a producir levaduras | 35 levaduras vínicas comerciales. |

Si bien el uso de levaduras comerciales es una práctica relativamente reciente que busca asegurar el éxito del proceso fermentativo y la calidad del vino gracias a las buenas capacidades fermentativas y enológicas que éstas poseen, pocos estudios sobre las diferencias entre cepas comerciales han sido realizados, enfocándose más bien en estudiar principalmente diferencias entre géneros de levaduras. El uso industrial de levaduras vínicas comenzó en California durante los años 70 por problemas en bodega con la oferta de dos cepas de *S. cerevisiae*: Montrachet y Pasteur Champagne. Estas cepas fueron usadas como iniciadores de fermentación, pero su éxito fue limitado. Luego, surgieron nuevas cepas mejoradas por selección

de acuerdo a sus propiedades enológicas, a partir de cepas de levaduras aisladas en las viñas (Torija, 2002). Características deseables en una levadura vínica son (Boulton et al., 1999):

Producir una fermentación vigorosa.

Realizar una fermentación hasta alcanzar sequedad.

Poseer características fermentativas reproducibles y comportarse de una manera predecible.

Poseer una buena tolerancia al etanol.

Poseer una buena tolerancia a la temperatura.

No producir malos olores o sabores.

Ser tolerante a SO₂.

Flocular para ser fácilmente removida.

Más aún, hoy en día los productores de vinos buscan levaduras vínicas con un completo rango de propiedades especiales, las cuáles puedan agregar valor al vino elaborado. Esta búsqueda de levaduras ha llevado a una dedicación a la mejora de cepas por medio del cruzamiento de levaduras e ingeniería genética (Pretorius y Bauer, 2002).

Así, hoy en día un gran tema de discusión es el uso de levaduras genéticamente modificadas para la elaboración de vinos (Cebollero et al., 2007; Branduardi et al., 2008). El uso de ingeniería metabólica para redirigir los flujos metabólicos y poder redireccionarlos hacia productos metabólicos deseados se ha realizado exitosamente con cepas haploides de laboratorio de *S. cerevisiae*. Las levaduras comerciales descienden de cepas "silvestres" de levadura, las cuáles son diploides, aneuploides o poliploides, y son mucho más difíciles de modificar. A pesar de lo anterior, ya se han publicado varios trabajos sobre la generación de levaduras genéticamente modificadas, orientadas a la mejora de propiedades fermentativas u organolépticas del vino. Entre ellas destaca la construcción de la cepa *ML01*, la primera levadura genéticamente modificada comercial aprobada por la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU. (FDA) que transforma ácido málico en ácido láctico, destinada a deacidificar mostos con pH bajo reemplazando la fermentación maloláctica (Husnik et al., 2007). En este sentido, el uso de los distintos niveles de información biológica disponibles (genómica, transcriptoma, etc.) y la integración de éstos por medio de la modelación computacional, disciplina conocida como Biología de Sistemas, será esencial en el futuro para el desarrollo de nuevas cepas (Borneman et al., 2007; Pizarro et al., 2007). Más aún, a pesar de que actualmente existe una opinión contraria de los consumidores al uso de levaduras genéticamente modificadas para la elaboración de vinos, varios grupos de investigación ya las están produciendo y guardando para el futuro, cuando esta opinión cambie (Cebollero et al., 2007).

Un estudio del efecto de las levaduras vínicas en la microflora existente en las viñas ha señalado que la diseminación de éstas está restringida a distancias cortas (10 a 200 m) y limitada a periodos cortos de tiempo. Las levaduras vínicas comerciales no se adaptan y crecen en las viñas, sino que muestran un patrón natural fluctuante de aparición y desaparición, al igual que las cepas autóctonas. Así, la biodiversidad de la microflora depende más del clima y factores específicos asociados a la viña como antigüedad y tamaño (Valero et al., 2005; Valero et al., 2007). Además, un estudio similar señaló que la presencia de una cepa comercial vínica en plantaciones de vid cercanas a bodegas estaba asociada a cambios genéticos, aducidos a mecanismos de adaptación al ambiente (Schuller et al., 2007). Esto entrega importante información respecto al uso de levaduras genéticamente modificadas y su posible impacto en el medio ambiente.

Finalmente, comparaciones de levaduras vínicas entre cepas *Saccharomyces* han sido realizadas principalmente en mostos específicos, siendo orientadas a buscar diferencias entre consumos de sustratos y la producción de algunos compuestos volátiles específicos (Regodón Mateos et al., 2006; Zuzuarregui et al., 2006; Berthels et al., 2008). Dos interesantes trabajos son la comparación de la transcriptoma y proteómica de dos levaduras vínicas comerciales (Zuzuarregui et al., 2006), y un estudio de autenticidad de cepas comerciales vínicas por medio de técnicas moleculares (Fernández-Espinar et al., 2001). El primero señala que diferencias en rendimientos fermentativos podrían estar asociadas a diferencias en los perfiles de mRNA y proteínas, junto con diferencias de expresión de genes del metabolismo de carbohidratos, represión catabólica de nitrógeno, y respuesta a estímulos. El segundo revela que en una comparación de 45 cepas comerciales, solamente 30 de ellas pudieron ser determinadas como únicas. Más aún, muy pocos estudios con comparaciones entre levaduras comerciales vínicas considerando el aspecto sensorial han sido realizados (Erasmus et al., 2004). Recientemente, un estudio comparó 5 cepas comerciales utilizando 2 mostos varietales, cada uno en 3 cosechas, señalando el efecto de la cepa de levadura escogida en composición química y volátil, y sus repercusiones en el perfil sensorial de los vinos, independiente de la variedad y la cosecha (Torrens et al., 2008).

1.5 Extracción de Compuestos Aromáticos

La extracción de los compuestos aromáticos responsables del aroma del vino es la etapa más importante en el estudio del aroma del vino. El aroma del vino puede ser percibido por una persona de dos maneras: ortonasal y retronasalmente. La percepción ortonasal se refiere a la percepción en nariz, mientras que la percepción retronasal se refiere a la percepción en boca en el proceso de degustación. Se ha demostrado que estas formas de percibir los aromas generan respuestas distintas en el sistema nervioso, provocando percepciones distintas de intensidad y apreciación de una mezcla de aromas (Small et al., 2005). Utilizando estos términos como diferencia, es posible clasificar las diversas técnicas existentes para la extracción aromática, tanto para vino como para otro producto cuya componente aromática sea importante para su valor. A continuación se procederá a realizar una breve descripción de la técnica escogida para realizar la extracción de los compuestos volátiles en este trabajo. Más información respecto a otras técnicas

existentes y una comparación de las características, ventajas y desventajas de éstas pueden ser encontradas en el anexo A.

1.5.1 Extracción Líquido-Líquido (ELL)

La ELL corresponde a la extracción por medio de un solvente orgánico de los compuestos aromáticos presentes en el vino. Es la más antigua de las técnicas utilizadas y la más usada en años anteriores para el análisis de los compuestos aromáticos en vino. El principio de extracción se basa en el equilibrio fisicoquímico que ocurre entre un solvente orgánico y la fase acuosa del vino, donde el alto coeficiente de partición del solvente orgánico permite obtener una mayor concentración de equilibrio, cercana a la concentración original en el vino. Variables fundamentales para la extracción son: el solvente utilizado para la extracción (López y Gómez, 2000), el tiempo y la temperatura de extracción. Alternativas similares a la extracción líquido-líquido son la Extracción Líquido-Líquido asistida con Ultrasonido (Ultrasound Assisted Liquid-Liquid Extraction USAELL), y la Microextracción Líquido-Líquido (Liquid-Liquid Microextraction LLM). En la extracción asistida con ultrasonido, se busca mejorar la transferencia de masa entre ambas fases inmiscibles, la cual aumenta debido al ultrasonido, reduciéndose el tiempo de extracción y aumentando la eficiencia del método. Esta técnica ha sido empleada en vino (Hernanz Vila et al., 1999; Peña et al., 2005; Cabredo-Pinillos et al., 2006) y en otros productos (Júnior et al., 2006; Luque de Castro y Priego-Capote, 2007). La microextracción líquido-líquido consiste en la saturación con sales inorgánicas de la fase acuosa y adición de volúmenes pequeños de solvente orgánico (en proporciones de 100 a 200 entre fase acuosa (vino) y solvente). Esta técnica busca disminuir los puentes de hidrógeno responsables de la solubilidad de los compuestos orgánicos en agua, favoreciendo un desplazamiento del equilibrio hacia el solvente (Sáenz-Barrio y Cedrón-Fernández, 2000). Es una técnica utilizada para la extracción de componentes mayoritarios volátiles en vino dada su rapidez y bajo costo que permite determinar alrededor de 30 compuestos volátiles, útiles como marcadores del estado microbiológico de fermentación, de propiedades sensoriales del vino, o de su origen (Ortega et al., 2001; Gómez-Míguez et al., 2007).

En este trabajo se eligió la técnica de ELL tradicional para extraer los compuestos aromáticos, debido a las siguientes razones:

La técnica permite extraer la totalidad de los compuestos orgánicos volátiles, entregando la composición más completa de los compuestos presentes en el vino, a pesar de ser representativa sólo de las concentraciones en el líquido, y no de las concentraciones presentes en el espacio de cabeza estático o dinámico, correspondientes a las percepciones orthonasales o retronasales respectivamente.

Es la técnica utilizada por el Centro de Aromas UC para realizar sus análisis de aromas, por lo que ya está establecida y optimizada.

1.6 Cromatografía gaseosa con espectrometría de masa (GC-MS)

La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa es la unión de dos poderosas técnicas analíticas destinadas a la separación e identificación de compuestos químicos presentes en una mezcla. La cromatografía gaseosa fue introducida en 1952 por James y Martin (James y Martin, 1952), permitiendo la separación en el tiempo de compuestos presentes en una mezcla. El principio de separación de los compuestos de una mezcla en un cromatógrafo de gases (GC) consiste en una serie de particiones entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida estacionaria dispuesta en un tubo de diámetro pequeño. Esto se traduce primero en la volatilización de la muestra en un puerto de inyección, la separación de los compuestos de la mezcla en una columna rellena con una fase estacionaria y la detección de cada compuesto por un detector.

Existen muchos tipos de detectores, pero el más usado actualmente para la identificación de compuestos químicos en una mezcla son los detectores de espectrometría de masa (MS). Su principio de funcionamiento radica en la medición de las razones entre masa y carga de iones de gases (m/z), los cuáles son separados en ambientes de alto vacío por campos magnéticos o eléctricos. La detección de estos iones genera el espectro de masa del compuesto, el que es único para cada compuesto químico y consiste en una representación gráfica de las abundancias detectadas de cada ión respecto a su m/z (Kitson et al., 1996; Siuzdak, 1996). Además del detector MS, otro detector importante es el detector de ionización de llama (Flame Ionization Detector FID). En este detector se incorpora una llama de aire/hidrógeno en el paso del gas que sale de la columna, donde los compuestos combustionados al pasar cerca de la flama, provocan una corriente que fluye entre dos electrodos en el detector, señal que es amplificada posteriormente. La identificación de los compuestos por medio de este tipo de detector se basa en el uso de los tiempos de retención (Retention Times RT), que son definidos como los tiempos en que un compuesto químico es detectado al final de la columna cromatográfica. La señal eléctrica del detector representada en el tiempo es el cromatograma obtenido de la muestra, donde se supone que cada peak se relaciona con un compuesto químico en particular.

La cromatografía gaseosa ha sido aplicada ampliamente a la investigación de los aromas presentes en el vino. Los primeros trabajos comenzaron en los años 80, reportándose cerca de 800 compuestos en la fracción volátil presente del vino (Maarse y Visscher, 1989). Estos primeros acercamientos no fueron considerados exitosos dado que la enorme cantidad de datos no permitía explicar diferencias de aromas entre vinos. Pero con los avances en la tecnología, con nuevas y más eficientes formas de separación y extracción de compuestos, junto al cambio en la aproximación del problema, esforzándose en la cuantificación e identificación de un grupo de compuestos que tienen un mayor impacto olfativo en vez de la totalidad de los compuestos volátiles presentes, el entendimiento de los principios operantes en el aroma del vino comienzan a ser dilucidados (Ferreira et al., 2008). En el estudio de los compuestos aromáticos presentes en el vino a través de GC-MS, ciertos elementos han sido importantes. El primero de ellos es la utilización de los umbrales olfativos para determinar la importancia de un compuesto presente en el

vino por medio del uso de unidades de aromas o unidades activas de un aroma (Odor Activity Value OAV). Este concepto fue introducido en los años 60 (Rothe y Thomas, 1963; Guadagni et al., 1966) y se define como la razón entre la concentración del compuesto odorante y la concentración correspondiente al umbral de detección en la matriz investigada o en la más cercana posible. Se debe tener especial cuidado en el uso del umbral, que debe ser calculado en la matriz que se está analizando, dado que el umbral de percepción es altamente dependiente de ella, y de otras variables como el pH y la temperatura de la muestra, y la técnica experimental utilizada para determinar el umbral (Marsili, 2006). Además se debe considerar su uso solamente como un indicador y no debe ser relacionado necesariamente con la intensidad con que un compuesto puede ser percibido. En efecto, la relación entre concentración, umbral e intensidad de un compuesto, descrita por la Ley Psicofísica de Potencia de Stevens (Stevens, 1951, 1961), no permite concluir sobre las interacciones existentes entre los distintos compuestos odorantes y la percepción de la mezcla (Frijters, 1978). Otro elemento importante es el uso de herramientas de análisis multivariado, conocido también como Quimiometría (Chemometrics) para explorar los datos en búsqueda de relaciones, seguir alguna propiedad en función de ciertos compuestos, o clasificar muestras de acuerdo a las distintas variables. Ejemplos de herramientas exploratorias de datos son el análisis de componentes principales (Principal Component Analysis PCA) o el análisis jerarquizado de clústeres (Hierarchical Cluster Analysis), que buscan reducir un gran número de variables en unas pocas variables que agrupan a las iniciales, pero que permiten explicar de mejor forma los datos. Estas técnicas han sido ampliamente utilizadas en el estudio del vino, en especial para clasificar y discriminar vinos de acuerdo a su variedad, origen y otras variables (Sivertsen et al., 1999; Noble y Ebeler, 2002; Vilanova et al., 2007; Jurado et al., 2008).

1.7 Cromatografía gaseosa acoplada a olfactometría (GC-O)

El análisis de GC-O es una de las principales técnicas utilizadas para el análisis de la componente aromática de un producto. Permite entregar información aromática directa sobre los compuestos químicos detectados a través del análisis químico por GC-FID o GC-MS. Además de entregar información cualitativa sobre el compuesto químico percibido, dependiendo del tipo de procesamiento de datos utilizados, permite entregar información sobre la jerarquía existente en estos compuestos, la cuál no puede ser analizada de forma separada con la evaluación sensorial de las muestras. Esta técnica surge poco después de la invención del cromatógrafo de gases, reportándose en 1964 la primera descripción de un GC modificado para oler el efluente salido de la columna cromatográfica (Fuller et al., 1964; Mayol y Acree, 2001). Sin embargo, el desarrollo de la técnica ha sido lento, principalmente debido a la complejidad y poco entendimiento de la percepción de aromas y sus intensidades. Originalmente utilizado sólo para obtener una descripción del aroma percibido al final de la columna cromatográfica, diversos métodos cuantitativos han surgido, los cuales pueden ser clasificados como métodos de frecuencia de detección, métodos de diluciones, y métodos de intensidad (Plutowska y Wardencki, 2008). Para la realización de este trabajo fueron revisadas las características, ventajas y desventajas de los diversos métodos (ver anexo A), junto con la posibilidad de implementar el método escogido en el Centro de Aromas UC. Finalmente se escogió una metodología que utiliza una mezcla entre los métodos de

frecuencia e intensidad. Estos métodos han sido publicados recientemente en diversos trabajos, variando entre grupos de trabajo en la escala utilizada y el parámetro calculado para relacionar frecuencia de detección con intensidad. Uno de ellos, utilizado por el grupo de V. Ferreira de la Universidad de Zaragoza, España (Ferreira et al., 2003; Campo et al., 2005; Campo et al., 2006; Escudero et al., 2007), se basa en el cálculo de la Frecuencia Modificada FM (Modified Frequency), calculada como la raíz de la multiplicación de la frecuencia de detección y el promedio de intensidad (ambos calculados como porcentaje de la máxima frecuencia y máxima intensidad, respectivamente), parámetro propuesto por A. Dravnieks (Dravnieks, 1985) como un buen indicador de la importancia de un aroma. Se utiliza una escala de 0 a 3 (0 no percibido, 1 percibido débil y difícil de reconocer, 2 percibido claramente pero no intenso, 3 percibido intensamente), permitiéndose en algunos casos valores intermedios. Un segundo método, calcula el parámetro denominado Señal Olfatoria Total (Total Olfactory Signal TOS), la que es calculada como el producto entre la intensidad promedio obtenida por el panel y la frecuencia de detección, utiliza una escala de 1 a 5 para describir la intensidad (1, muy débil; 2, débil; 3, moderado; 4, fuerte; y 5, muy fuerte) (Berdagué et al., 2007). Este segundo método utiliza esta escala dado que permite una filtración mejor de los datos de TOS.

La metodología que se escogió fue la utilizada por el grupo de V. Ferreira principalmente debido a ser una escala más fácil de entrenar, ya que era muy similar a la escala utilizada en el entrenamiento del panel de evaluación sensorial del Centro de Aromas UC.

1.8 Evaluación Sensorial de Muestras

La evaluación sensorial es definida como:

"una disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar, e interpretar reacciones de las características de los alimentos y materiales mientras son percibidos por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído." (Stone y Sidel, 2004)

Esta disciplina tiene orígenes en los años 1940-1950, donde se comenzó a estimular el uso de la evaluación sensorial en el estudio de las preferencias de las comidas entregadas al ejército de los Estados Unidos, las cuáles a pesar de contar con todos los requerimientos nutricionales, no contaban con la aceptación del personal militar. Este fue un primer esfuerzo en buscar explicar porqué ciertos alimentos eran preferidos y otros no. La industria alimentaria, tomando como ejemplo al ejército comenzó a entregar soporte y fomentar el desarrollo de la evaluación sensorial, aunque no comenzó a ser considerada como una fuente importante de información hasta los años 90. La principal causa de esto, es la tradicional perspectiva de contar con un "experto" en la empresa (una muestra estadística donde N es 1), el que por medio de la experiencia obtenida en años era capaz de describir los productos y fijar estándares de calidad de los mismos, desde un punto de vista sensorial. Con el crecimiento de la economía y la competencia, junto a la rápida evolución de los procesos industriales, se volvió difícil mantenerse al tanto de todos los avances respecto a los productos de interés. Además, las líneas de producción se

expandieron de gran manera, proporcionando una gran cantidad de productos, siendo imposible tener conocimiento detallado de cada uno. Pero la mayor razón que permitió la nueva valoración de la evaluación sensorial fue la incapacidad de los expertos de explicar las preferencias de los consumidores y sus cambios, en conjunto con el cambio de orientación de muchas industrias, como la del vino, que antiguamente estaban orientadas a la producción (el productor decidía que producto ofrecía) pasando a ser orientadas al cliente (el cliente sabe lo que quiere y el productor debe ofrecerlo).

Existen tres tipos de análisis utilizados en evaluación sensorial: los análisis que buscan discriminar muestras entre sí (Test Discriminantes), los análisis que buscan describir muestras (Test Descriptivos), y los análisis que buscan relaciones de preferencia, aceptación o rechazo de productos (Test de Aceptación). A continuación se realizará una breve descripción de las técnicas de análisis sensorial utilizadas en este trabajo.

1.8.1 Test Triangular

El test triangular es un test discriminante que busca responder si dos muestras son diferentes entre sí. Es el más conocido de los test discriminantes, y por mucho tiempo fue considerado como un sinónimo del término evaluación sensorial. El método fue desarrollado en la cervecería Carlsberg por Bengtsson y colaboradores como un esfuerzo para utilizar test sensoriales en la evaluación de cerveza. En este test, como su nombre lo explica, los productos a diferenciar son presentados en tres muestras, dos de ellas iguales, y se les solicita a los integrantes del panel que determinen cuál de ellas es la diferente o cuáles dos son las más similares. La probabilidad asociada a determinar la muestra distinta correctamente en esta prueba es un 0,33.

1.8.2 Análisis Descriptivo Cuantitativo (Quantitative Descriptive Analysis QDA)

La evaluación sensorial por medio de Análisis Descriptivo Cuantitativo es una de las herramientas que permite entregar una descripción de las muestras analizadas, a partir de los términos generados por un panel entrenado. Por medio de estos datos es posible identificar las diferencias percibidas por el análisis discriminante, aunque es necesario considerar que QDA es una técnica que apunta a la descripción, y no a la diferenciación entre muestras. Los test descriptivos son muchos más sofisticados que los test discriminantes y de aceptación, en especial porque proveen información que puede ser utilizada tanto como para buscar diferencias o similitudes entre productos, junto con determinar atributos importantes en la aceptación o rechazo del producto. QDA es una metodología desarrollada en 1974, basada en el uso de un panel, el que por medio de la creación de un lenguaje consensuado orientado a todas las características del producto que buscan ser descritas, y el uso de replicación para alcanzar sensibilidad de los sujetos y los atributos permite identificar diferencias específicas entre los productos por medio de análisis estadísticos específicos. Esta metodología se caracteriza por requerir grandes cantidades de tiempo, en especial para el proceso de generación del vocabulario consensuado y la replicación para alcanzar la sensibilidad necesaria. La capacidad

de la metodología de evaluar múltiples productos se basa en la capacidad de los integrantes del panel de realizar juicios relativos con un alto grado de precisión. Para esto es necesario siempre contar con un panel con integrantes calificados para realizar las evaluaciones, lo que considera contar con sujetos disponibles, que estén en contacto con el producto o sean potenciales usuarios del mismo, que sean capaces de percibir diferencias entre clases de productos, y tengan la capacidad de verbalizar las percepciones y trabajar en grupo. Algunas de estas capacidades requieren de un entrenamiento previo, por lo que usualmente se cuenta con un panel entrenado para realizar esta metodología. El tamaño del panel se recomienda entre 10-12 personas, ya que para tamaños menores que 10 la contribución de cada sujeto en la variabilidad total aumenta, mientras que en tamaños mayores a 12, produce problemas de coordinación y de espacio para el entrenamiento grupal.

1.9 Hipótesis

La hipótesis de este trabajo es que existen diferencias significativas en la componente aromática de los mostos fermentados por distintas levaduras vínicas comerciales, y que estas diferencias pueden ser determinadas por medio de metodologías de evaluación sensorial, análisis químicos y análisis olfatométrico en fermentaciones realizadas en mosto sintético.

2. Objetivos

De acuerdo a la hipótesis propuesta, el objetivo general de esta tesis es caracterizar sensorial, olfatométrica y químicamente la síntesis de compuestos aromáticos por levaduras comerciales vínicas. Así, los objetivos específicos son los siguientes:

Diseñar un sistema experimental que permita aislar la contribución aromática de cada levadura después del proceso fermentativo.

Caracterizar cada levadura utilizada de acuerdo a parámetros fermentativos.

Comparar la componente aromática de vinos elaborados por distintas levaduras a través de análisis químico, olfatométrico y sensorial.

3. Materiales y Métodos

3.1 Cepas Utilizadas

Se utilizaron 6 cepas distintas de levaduras comerciales vínicas para realizar la comparación de la contribución aromática durante la fermentación alcohólica. La cepa EC-1118 fue utilizada como cepa control respecto a la contribución aromática dado que es reconocida como una cepa aromáticamente neutra y utilizada principalmente para asegurar una buena fermentación. Se seleccionaron 2 cepas recomendadas por los fabricantes como aromáticas para fermentaciones de vinos tintos: Uvaferm BDX de Lallemmand y RX-60 de Laffort. Para fermentaciones de vino blanco fueron recomendadas 2 cepas como aromáticas: QA-23 de Lallemmand y X-5 de Laffort. Además para fermentaciones de vino blanco se empleó también la cepa VIN-13 de Anchor (Lallemmand), recomendada para la producción de vinos blancos aromáticos de acuerdo a su fabricante.

La tabla 3-1 presenta un resumen con las principales características de cada cepa. En el anexo B se puede encontrar las fichas técnicas de cada una de las levaduras utilizadas.

Tabla 3-1: Características principales de las cepas de levaduras utilizadas.

| Cepa | Genero | Rango de Temperatura | Influencia aromática |
|-----------------|--|---|---|
| EC-1118 | <i>Saccharomyces cerevisiae bayanus</i> | Amplio rango de fermentación, rango óptimo entre 15° C a 25° C. | Neutra, recomendada para un amplio rango de aplicaciones. |
| Zymaflore RX-60 | <i>Saccharomyces cerevisiae cerevisiae</i> | 20° C a 30° C. | Cepa aromática y productora y reveladora; recomendada para variedades tintas, en particular Syrah. |
| Uvaferm BDx | <i>Saccharomyces cerevisiae cerevisiae</i> | Rango entre 18° C a 30° C, y temperatura óptima de fermentación es 24° C a 28° C. | Altamente recomendada para producción de vinos tintos de calidad, en especial Cabernet Sauvignon y Merlot, incrementando su carácter varietal. |
| VIN-13 | <i>Saccharomyces cerevisiae hibrida</i> | Rango óptimo recomendado para vinos del nuevo mundo: 10° C a 15° C. | Recomendada para vinos blancos aromáticos, dado que realza los caracteres frutales, tropicales y florales. |
| X-5 | <i>Saccharomyces cerevisiae cerevisiae</i> | 13° C a 18° C. | Recomendada para vinos blancos complejos, con alta revelación de aromas varietales y buena producción de aromas fermentativos (2-fenil-etanol, fenil-etil-acetato, alcohol-isoamílico). |
| QA-23 | <i>Saccharomyces cerevisiae bayanus</i> | 14° C a 28° C. | Recomendada para vinos blancos frescos, frutosos y limpios. Posee actividad reveladora de aromas principalmente. |

3.2. Condiciones de Fermentación

Las fermentaciones fueron realizadas en duplicado en fermentadores BIOFLO IIC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) de 2 L y 3 L, y BioStat B (Braun Biotech, Alemania) de 2,5 L utilizando un medio MS300 modificado (Varela et al., 2004; Molina et al., 2007). Este es un medio de cultivo que emula mosto de uva

estándar pero sin ningún precursor aromático varietal. El medio contiene 240 g/L de azúcares fermentables (glucosa y fructosa), y una fracción de nitrógeno asimilable de 300 mg/L, con amonio y aminoácidos como fuentes nitrogenadas (Tabla 3-2). Además posee una fracción de vitaminas y otra fracción de sales, las cuales contienen en exceso estos elementos. Además, el medio contiene factores anaeróbicos que permiten el crecimiento de la levadura en tales condiciones.

Tabla 3-2: Concentraciones de Amonio y Aminoácidos presentes en el medio MS300 modificado.

| Fracción de Nitrógeno | Concentración [g/L] |
|-----------------------|---------------------|
| NH ₄ Cl | 0,27 |
| Arginina | 0,179 |
| Glutamina | 0,335 |
| Prolina | 0,64 |
| Triptophano | 0,166 |
| Alanina | 0,118 |
| Ácido Glutámico | 0,199 |
| Serina | 0,074 |
| Threonina | 0,084 |
| Leucina | 0,057 |
| Ácido Aspártico | 0,054 |
| Valina | 0,048 |
| Fenilalanina | 0,058 |
| Isoleucina | 0,039 |
| Histidina | 0,015 |
| Metionina | 0,044 |
| Tirosina | 0,029 |
| Glicina | 0,012 |
| Lisina | 0,015 |
| Cisteina | 0,017 |

Se adicionó 5 ml por litro de medio de una solución de K₂S₂O₅ de concentración 0,7558 g/L para obtener una concentración en el mosto de 20 mg/L de SO₂ libre para emular el proceso de adición de bisulfito en mostos reales (más detalles ver anexo C). Para la inoculación, se diseñó un protocolo de rehidratación de levaduras secas activas a partir de las indicaciones de los productores (ver anexo D), y luego de un recuento de células de levaduras rehidratadas en una cámara de Neubauer, se agregó un volumen de inóculo con el objetivo de obtener 1x10⁶ células por ml de medio. El tiempo Lag fue considerado como el tiempo entre la inoculación y la 2ª generación. Todas las fermentaciones comenzaron en estado anaeróbico, como consecuencia de un burbujeo pleno con gas nitrógeno a un flujo de 1L/min por 20 minutos. Las fermentaciones se realizaron a 15° C para cepas destinadas a la fermentación de vinos blancos, y a 28° C para cepas destinadas a la fermentación de vinos tintos. Otras condiciones de fermentación fueron pH 3,5, agitación de 200 rpm y volúmenes de trabajo de 1 o 2 L, dependiendo de la disponibilidad de los fermentadores. La temperatura y el pH de las fermentaciones fueron controladas y

se tomaron muestras de 15 ml durante el transcurso de la fermentación para el seguimiento de biomasa, del consumo de los principales substratos (glucosa y fructosa), y de la producción de los principales productos metabólicos (etanol, glicerol, ácido succínico y ácido acético). Al finalizar la fase exponencial-comienzo de la fase estacionaria de cada fermentación, se burbujeó un volumen de 30 mL aire por litro de mosto, para simular la oxigenación del mosto que ocurre durante el proceso de remontaje en las bodegas (anexo E). Las fermentaciones fueron detenidas al alcanzar sequedad, considerado como una concentración menor de 2 g/L de azúcares totales en el medio (Lea y Piggott, 2003), comprobada por HPLC.

Una vez alcanzada la sequedad, se tomaron 2 muestras de la fermentación, separándola de las lías por medio de centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos. Una muestra (350 mL mínimo) fue destinada a la extracción de compuestos aromáticos y la otra (400 ml mínimo) a la evaluación sensorial. Las muestras destinadas a evaluación sensorial fueron almacenadas a 4° C en frascos Schott®, con su espacio de cabeza purgado de oxígeno con nitrógeno o argón (de acuerdo a disponibilidad) y la alrededor de la tapa del frasco fue sellado para evitar el ingreso de oxígeno con Parafilm®. Se mantuvo las muestras en estas condiciones hasta el momento de su evaluación.

Más detalles sobre diseño experimental, condiciones de fermentación y toma de muestras se encuentran en el anexo F. Además, para una mejor identificación de las fermentaciones se utilizó una codificación para el procesamiento de los datos de las fermentaciones (ver Anexo I).

14 Fermentaciones fueron realizadas y sus muestras finales, tomadas una vez detenida la fermentación al alcanzar sequedad, fueron utilizadas para los análisis químicos, olfatométricos y sensoriales. Las muestras tomadas durante el transcurso de las fermentaciones fueron utilizadas para el análisis de curvas de crecimientos de biomasa, consumo de nutrientes y producción de compuestos principales.

Los rendimientos y tasas promedios de consumo y producción volumétricas fueron calculados a partir de las concentraciones obtenidas por HPLC. Las concentraciones iniciales de metabolitos fueron calculadas como el promedio de la concentración de las muestras abiótica y 0, mientras que para la concentración final se usó el valor obtenido en la muestra final no diluida. Para el cálculo de la tasa promedio de consumo volumétrico de glucosa se considero el tiempo en que la glucosa alcanzó una concentración cercana a 0, y no el tiempo en que fue detenida la fermentación. La estimación de los tiempos de sequedad, tasas máximas de crecimiento de biomasa, tasas máximas de consumo y producción volumétricas se realizó utilizando el software TableCurve® 2D v5.0 (Systat Software, USA) para ajustar curvas sigmoidales en el caso de consumo y producción a los datos de obtenidos por HPLC, y curvas polinomiales de grado 8 para las curvas de biomasa (ver anexo I para un ejemplo de cálculo).

3.3 Técnicas Analíticas

La evolución de las concentraciones de glucosa, fructosa, etanol, glicerol, ácido málico, ácido cítrico y ácido acético fueron medidas mediante Cromatografía Líquida

de Alto Rendimiento (High-Performance Liquid Chromatography HPLC) usando una columna Aminex HPX-87X Bio-Rad® (Bio-Rad, California, USA) con un flujo de 5 ml/min de una solución a 5 mM H₂SO₄ a una temperatura de 55° C en la columna. Ácido málico, ácido cítrico, y ácido acético fueron determinados por un detector Waters 486 UV a 210 nm, mientras que los otros compuestos fueron determinados por un detector de índice de refracción Waters 410. La concentración de nitrógeno libre α-amino fue determinado utilizando el test de *o*-phtaldehyde/*N*-acetyl-L-cysteine (NOPA) usando un Espectrofotómetro Auto-Analizador Roche Cobas FARA (Roche, Basel, Suiza).

3.4 Extracción de compuestos aromáticos de muestras finales

Los compuestos aromáticos fueron extraídos mediante extracción líquido-líquido siguiendo el protocolo utilizado por el Centro de Aromas DICTUC S.A. (Anexo F). Cada muestra fue extraída en triplicado, donde cada réplica contiene 100 ml de muestra más 100 µl de estándar interno (4-Nonanol) extraídos en 2 pasos con un volumen de 25 ml de diclorometano utilizado como solvente orgánico durante 30 minutos en un baño con hielo, ambiente libre de oxígeno y bajo agitación. Para la separación de las fases en cada paso de extracción, después de los 30 minutos de contacto entre las fases orgánica y acuosa, se centrifugó por 20 minutos a 5000 rpm, para luego extraer la fase orgánica y repetir el proceso. El extracto obtenido de ambos pasos (50 ml aprox.) fue puesto a -20° C por al menos 2 h para eliminar cualquier contenido de agua al congelarla. Antes de su concentración, el extracto fue deshidratado mediante la adición de Na₂SO₄, y luego concentrado a un volumen de extracto final de 200 µl en un baño térmico a 40° C con una columna Vidreux y con la ayuda de un flujo de nitrógeno puro. El extracto obtenido fue almacenado a -20° C hasta su análisis.

3.5 Perfil de compuestos volátiles por GC-MS

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 conectado con un detector de masas Agilent 5972 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Se usó una columna polar Agilent JyW DB-WAXetr (60 m x 0,25 mm diámetro interno x 0,25 µm de espesor de film). La inyección fue realizada en modo splitless por un inyector automático con un volumen de 3 µl a una temperatura de 180° C en el puerto de inyección. El siguiente programa de temperatura para el horno fue usado: una temperatura inicial de 40° C por 5 minutos, seguido por una rampa creciente de temperatura de 3° C/min hasta llegar a 240° C, la cual se mantuvo por 25 minutos. Se usó helio (pureza de 99,999%) como gas de transporte con un flujo de 1,9 ml/min. Todos los espectros de masa fueron adquiridos por ionización de impacto electrónico (EI Electronic Impact) a 70 eV usando como modo escaneado completo con un rango de escaneo de 35-550 m/z a una tasa de 1,5 escaneos s⁻¹. La adquisición e integración de los datos fue realizada con el software de cromatografía Chemstation®. La deconvolución e identificación de cada peak fue realizada por el software AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) (Stein, 1999).

Los perfiles químicos fueron obtenidos por análisis de los cromatogramas GC-MS de los extractos de aromas de cada fermentación realizada y que alcanzó exitosamente sequedad. El análisis de estos datos requirió una gran cantidad de tiempo, ya que fueron analizados los cromatogramas de 14 de las fermentaciones realizadas con sus respectivas extracciones en triplicado como mínimo. El análisis de los cromatogramas consistió en la identificación del (de los) compuesto(s) en cada peak del cromatograma y la integración del área correspondiente al peak para el cálculo de la concentración del compuesto.

Para cada fermentación se obtuvo una lista de compuestos identificados y cuantificados en triplicado. Con estos valores de concentración se calcularon los valores de error estándar para cada fermentación, y se procedió a eliminar datos de forma de disminuir la variabilidad del proceso de extracción en los casos que fuera posible, tratando de llegar a un valor menor a 10% pero siempre dejando un mínimo de 2 valores para el cálculo de la concentración promedio.

A partir de estos datos, se hizo un listado de compuestos comunes encontrados en todas las fermentaciones, se calculó la concentración promedio y la variabilidad biológica obtenida entre los replicados de cada condición experimental, utilizando las concentraciones ya filtradas para disminuir la variabilidad de extracción. Con esto se determinó qué compuestos químicos presentaron mayor variabilidad microbiológica en los replicados, y por lo tanto no era posible obtener una conclusión acerca de ellos o se debía considerar esta variabilidad en las comparaciones realizadas y en las conclusiones obtenidas.

Finalmente, para cada compuesto común encontrado se buscó su umbral de detección en la literatura, y, en caso de ser encontrado, se calculó su valor de OAV (Odor Activity Value) como la razón entre la concentración del compuesto y su umbral de detección en una matriz específica (en este caso vino idealmente). Con los valores de OAV calculados, se verificó la existencia de diferencias significativas para los distintos compuestos con OAV mayor que 1. Las varianzas calculadas para los valores de OAV se obtuvieron a partir de todas las concentraciones obtenidas en triplicado por la extracción L-L de los duplicados de fermentación.

3.6 Perfil de compuestos aromáticos por GC-O

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo Agilent 6890 acoplado con un detector de ionización de llama (FID) y un puerto de olfatometría Sniffer 9000 (Brechtbühler Inc., Houston, TX, USA), ambos conectados por un divisor de flujo al final de la columna, dividiéndolo en una razón de 1:1. Se usó una columna polar Agilent JyW DB-WAXetr (60 m x 0,25 mm diámetro interno x 0,25 µm de espesor de film). La inyección fue realizada en modo splitless por inyección manual con un volumen de 3 µl a una temperatura de 180° C en el puerto de inyección. El siguiente programa de temperatura para el horno fue usado: temperatura inicial de 40° C por 5 minutos, seguido por una rampa de temperatura subiendo 3° C/min hasta llegar a 230° C, a la cual se mantuvo por 9 minutos, seguido de una rampa de temperatura de 40° C/min hasta llegar a 240° C, la cual se mantuvo por 5,4 min. El gas Helio (pureza de 99,998%) fue usado como gas de transporte con un flujo de 1,9 ml/min. La temperatura del detector FID fue de 250° C, con un flujo de

aire de 450 ml/min, un flujo de Hidrógeno de 49 ml/min, y un flujo de "make up" de 45 ml/min. El puerto de olfatometría está conectado al cromatógrafo por una línea de transferencia calentada a 190° C, con humidificación del flujo.

El panel que analizó las muestras consistió en 12 personas, compuesto por:

4 personas entrenadas en evaluación sensorial pertenecientes al panel de evaluación sensorial permanente del Centro de Aromas de DICTUC S.A.

4 personas pertenecientes al personal que trabaja en el mismo Centro de Aromas en áreas de análisis químico, las que fueron entrenadas.

4 alumnos de postgrados que también fueron entrenados.

El entrenamiento para alumnos y personal del Centro de Aromas consistió aproximadamente 8 sesiones para generar vocabulario, evaluar la capacidad de reconocimiento de estándares, la capacidad de percepción de distintas intensidades y categorizar muestras según intensidad, y el uso de la escala utilizada.

Se seleccionó 8 personas del panel según disponibilidad para evaluar todas las muestras. Cada panelista evaluó cada muestra en dos segmentos de tiempo de 35 minutos (cada segmento evaluado en 1 sesión por día para evitar fatiga olfativa). A los integrantes del panel se les solicitó entregar un descriptor y un valor de intensidad de acuerdo a una escala de 0 a 3, permitiéndose valores intermedios (0 cuando el aroma no es detectado, 1 si el aroma es débil, 2 si el aroma es detectado de manera sencilla, y 3 si el aroma es de alta intensidad (Ferreira et al., 2003; Campo et al., 2006; Gómez-Míguez et al., 2007). Los datos fueron adquiridos por el software Nose to Text® (Brechtbühler Inc., Houston, TX, USA) (Mottay, 2004), los cuales después fueron organizados y procesados de la siguiente manera:

1. En un archivo Excel, los descriptores y sus respectivos valores de intensidad mencionados por el panelista fueron ordenados por tiempo para cada persona. A cada persona se le asignó un color de celda. Luego, todos los descriptores dichos por los integrantes del panel fueron ordenados por tiempo.

2. Los descriptores fueron agrupados entonces de acuerdo a similitud entre ellos por categorías utilizando el nivel superior de la clasificación Rueda de Aromas del Vino (Noble et al., 1987). Algunos descriptores entregados no fueron considerados de acuerdo a las siguientes 3 razones:

- a. El descriptor fue mencionado por un sólo panelista y ningún otro panelista dijo otro descriptor similar en un tiempo cercano de 1 minuto.

- b. El mismo descriptor o muy similar fue dicho por un mismo panelista en un tiempo muy cercano (dentro de un minuto).

- c. El descriptor fue dicho por un panelista dentro de un intervalo de tiempo en donde más de 2 panelistas dijeron un descriptor notoriamente distinto (e.g. queso-frutoso) al mencionado por el panelista en mención.

3. Para cada zona odorante encontrada se determinó tiempo de inicio y fin, ancho (diferencia entre tiempo de fin e inicio), descriptor general común (de acuerdo a 9 categorías usadas de acuerdo a clasificación de la Rueda de Aromas del Vino (Noble et al., 1987): Caramelo, Químico, Floral, Frutoso, Vegetativo, Microbiológico, Madera, Tierra, Zona Odorante Desconocida (ZO)), su intensidad promedio (el valor promedio de las intensidades mencionadas), su frecuencia de detección (el número de personas que detectaron la zona odorante), y su frecuencia modificada FM (Dravnieks, 1985; Campo et al., 2006; Escudero et al., 2007) calculada según la siguiente fórmula:

$$FM(\%) = \sqrt{F(\%) \times I(\%)} \quad (\text{Ecuación 3-1})$$

Donde F(%) es el porcentaje de los panelistas que detectaron la zona odorante e I(%) es el porcentaje del promedio de intensidad con respecto al máximo valor posible en la escala.

4. Para simplificar el análisis de los datos y reducir el ruido de la señal olfatométrica, sólo se consideraron las zonas odorantes cuyos valores de FM eran mayores de 50%.

3.7 Evaluación Sensorial de las Muestras

Las muestras de cada duplicado de fermentación destinadas a evaluación sensorial fueron mezcladas para la realización de los distintos análisis sensoriales con el objetivo de obtener el volumen requerido para los análisis sensoriales a realizar. Esto lamentablemente tuvo que hacerse, no permitiendo evaluar la variabilidad biológica de los duplicados de fermentaciones por evaluación sensorial. Así, se obtuvo un volumen de muestra final aproximado de 800 ml, representativo de cada cepa a partir de las fermentaciones realizadas en duplicado. El análisis sensorial de cada muestra sólo se realizó en forma orthonasal y no retrornasal por degustación de las mismas, debido a que la presencia de ácido cítrico en el mosto MS300 modificado otorgaba un sabor muy ácido a las muestras que influiría en su evaluación.

Para determinar que tipo de análisis era posible realizar con las muestras a disposición se realizó una evaluación previa del aroma de cada una de las muestras. Se determinó realizar los siguientes análisis sensoriales:

Un análisis cuantitativo descriptivo de las 7 muestras utilizando el panel entrenado del Centro de Aromas.

6 Test triangulares discriminantes para la diferenciación de las 4 muestras correspondientes a las fermentaciones a baja temperatura.

3.7.1 Análisis Descriptivo Cuantitativo

El Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA) fue realizado por la Jefa de Laboratorio de Evaluación Sensorial del Centro de Aromas. Para ello se utilizó un panel compuesto

por 8 personas, 7 de las cuáles eran integrantes del panel de Evaluación Sensorial del Centro de Aromas y con una amplia experiencia en las metodologías de evaluación sensorial de distintos tipos de muestras, en especial vinos, y el alumno responsable de esta tesis, el cuál fue sometido a un entrenamiento intensivo con estándares aromáticos durante el primer semestre del año 2007 para aumentar su vocabulario y capacidad de reconocimiento de aromas. El procedimiento para la realización del análisis consistió primero en una sesión de reconocimiento de la muestra y la generación de términos descriptivos a utilizar para la realización del Análisis Descriptivo Cuantitativo. A partir de estos términos descriptivos propuestos se hicieron estándares aromáticos, y con ellos se realizó un entrenamiento en el reconocimiento de estos estándares. Después de 4 sesiones de entrenamiento, se realizaron 2 sesiones de evaluación preliminar de las muestras, donde se verificó la significancia estadística de los descriptores (repetitividad y consistencia del panel) por medio de un test ANOVA. Una vez que el panel fue consistente y repetible, se realizaron 2 sesiones de evaluación finales. Para el análisis estadístico se utilizaron los datos obtenidos en las últimas 3 evaluaciones, y se consideraron sólo los descriptores cuya varianza entre evaluación tenían diferencias estadísticamente significativas entre muestras, mediante el software Senstools® (OPyP Product Research, Holanda).

3.7.2 Evaluación Sensorial Discriminante

La evaluación sensorial discriminante consistió en 6 test triangulares realizados en duplicado, con el objetivo de verificar la existencia de diferencias entre los fermentados obtenidos a baja temperatura para las cepas EC-1118, VIN-13, X5 y QA-23. Los test fueron efectuados por un panel de 8 personas, el mismo utilizado para la realización del análisis descriptivo cuantitativo. A cada panelista se le entregó 3 copas, 2 de las cuáles contenían una misma muestra y una tercera era distinta, y se les pidió reconocer la muestra diferente. Para evitar que la decisión estuviera influenciada por el color de la muestra, se adicionó un colorante inodoro para dejar todas las muestras del mismo color. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software Senstools® (OPyP Product Research, Holanda).

4. Resultados y Discusión

Dada la gran cantidad de datos que fueron adquiridos en este trabajo, muchos de estos datos no procesados no eran tan relevantes o algunos datos procesados eran muy extensos para estar dentro del cuerpo de esta tesis. Por esto, muchas veces se redirigirá al lector a los anexos correspondientes donde se podrá obtener un ejemplo de cómo los datos fueron guardados junto con el archivo electrónico donde pueden ser encontrados, o una extensión de los resultados mostrados con un breve comentario.

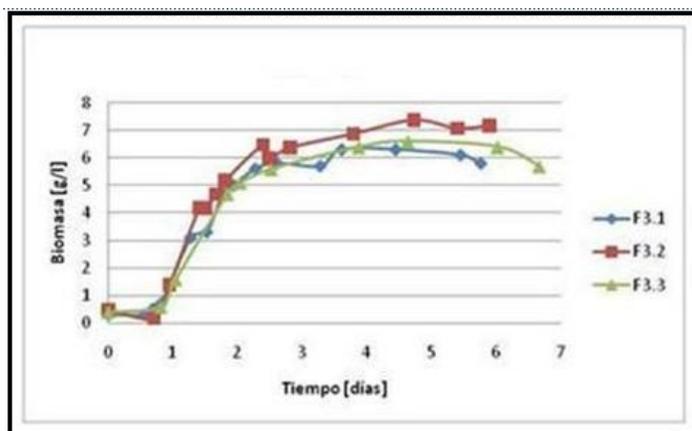
Los resultados obtenidos permitieron comparar las cepas utilizadas desde diversos aspectos. Los resultados fermentativos entregaron información sobre el comportamiento de las cepas respecto al proceso principal que realizan, que es la conversión del azúcar presente en el mosto a etanol. Para comparar las cepas respecto a los aromas producidos, los resultados obtenidos por evaluación sensorial entregan una evaluación del total de la contribución aromática de la cepa, buscándose discriminar y caracterizar esta contribución sensorialmente. Luego, a partir de los resultados químicos y olfatométricos se busca explicar los resultados obtenidos por evaluación sensorial al descomponer la contribución aromática por medio de la identificación y cuantificación de aromas de impacto, y luego recomponer esta contribución utilizando los resultados obtenidos de las tres aproximaciones utilizadas.

4.1 Caracterización de las cepas utilizadas: Cinética de crecimiento, consumo de nutrientes y síntesis de compuestos principales.

4.1.1 Curvas de cinética de crecimiento y rendimientos en biomasa

Las curvas de crecimiento de biomasa permiten observar el desarrollo de las distintas cepas de levadura frente a un mismo medio en iguales condiciones de crecimiento. La figura 4-1 muestra un ejemplo de las cinéticas de crecimiento de los réplicas realizadas con la cepa RX-60 a 28° C cuantificadas por medio del peso seco filtrado (más detalle sobre otras cepas, ver anexo I). Cada color representa una réplica distinta para la misma condición (codificación replicas ver Anexo I, tabla I-1).

Figura 4-1: Cinéticas de crecimiento de biomasa cuantificada a través de la medición de peso seco filtrado para 3 replicados de fermentaciones realizadas con la cepa RX-60 (Primera réplica no utilizada para análisis de datos).



Las curvas de crecimiento presentaron poca variabilidad, a pesar de algunas excepciones (ver anexo I). Las tasas de crecimiento máxima para cada cepa (tabla 4-1) fueron similares respecto a temperatura, no observándose diferencias significativas entre ellas (ver anexo I).

Tabla 4-1: Tasas de crecimiento máximo de cepas comerciales utilizadas obtenidas a partir del ajuste de curvas polinomiales de grado 8 a los datos de biomasa.

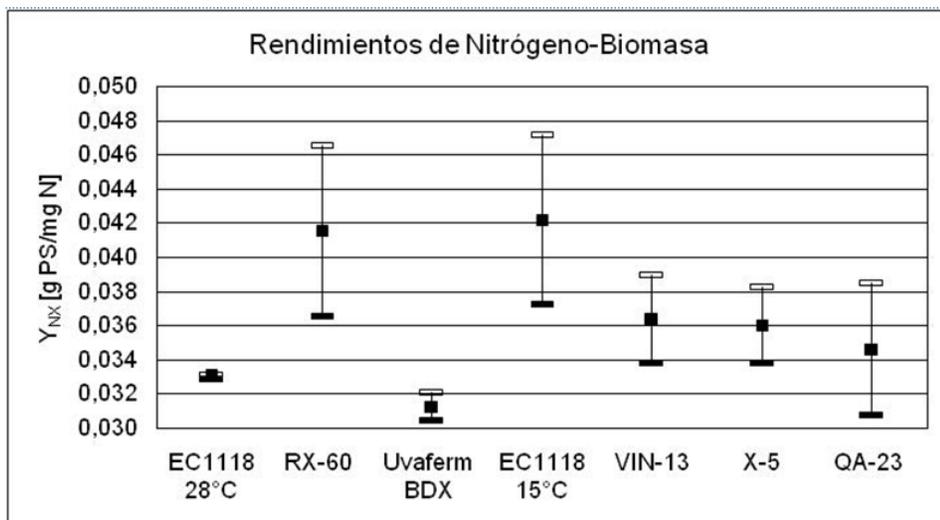
| Temperatura | Cepa | Tasa de Crecimiento Máxima (μ_{max}) [g/(L h)] |
|-------------|---------|--|
| 28° C | EC-1118 | 0,20 ± 0,01 |
| | RX-60 | 0,22 ± 0,04 |
| | VIN-13 | 0,20 ± 0,00 |
| 15° C | EC-1118 | 0,078 ± 0,005 |
| | VIN-13 | 0,067 ± 0,011 |
| | X-5 | 0,076 ± 0,026 |
| | QA-23 | 0,074 ± 0,015 |

La robustez de las cepas de levaduras vínicas comerciales puede ser observada en la poca variabilidad presentada por las curvas de crecimiento. Esto confirma que las levaduras vínicas comerciales son mucho más confiable respecto de su desempeño fermentativo que las levaduras nativas, responsables de las fermentaciones espontáneas que poseen una alta variabilidad debido a que son distintas levaduras las que participan en distintas etapas de la fermentación (Longo et al., 1992). Un factor en la poca variabilidad obtenida fue el control estricto de la temperatura, dado el importante efecto que ejerce ésta tanto en las cinéticas de fermentación como en el metabolismo de la levadura (Coleman et al., 2007; Tai, Daran-Lapujade,

Luttik et al., 2007; Tai, Daran-Lapujade, Walsh et al., 2007). Otro resultado fue el efecto observado al burbujear aire en las fermentaciones realizadas, lo que provocó un aumento en la biomasa y una disminución del tiempo para terminar la fermentación en comparación con trabajos anteriores del laboratorio, efecto reportado en otros estudios (Fornairon-Bonnefond et al., 2003; Rosenfeld et al., 2003). El aumento en biomasa podría ser explicado por el consumo de aminoácidos, específicamente prolina, los cuáles no pueden ser metabolizados en condiciones anaeróbicas. De hecho, la disolución de oxígeno ha sido señalada como una solución para fermentaciones paralizadas o lentas (Ingledew et al., 1987). Además, otro trabajo (Rossignol et al., 2003) señala que la levadura durante la fermentación alcohólica expresa genes para la metabolización de prolina, a pesar de que ésta no es consumida, demostrando que la célula posee estructuras moleculares preparadas para su consumo en caso de la presencia de oxígeno. Sin embargo, dado que los aminoácidos no fueron cuantificados durante las fermentaciones, no es posible comprobar esto.

Un parámetro fundamental para la comparación de cepas de levaduras vínicas es el rendimiento de biomasa en base al substrato limitante: el nitrógeno. El rendimiento de biomasa en base a nitrógeno (Y_{NX}) es un indicador de la eficiencia de la cepa para producir biomasa en función del nitrógeno disponible y asimilable en las condiciones de fermentaciones vínicas, donde la concentración de biomasa es una variable fundamental para la tasa fermentativa (Varela et al., 2004). Los resultados obtenidos (Figura 4-2) indican que no existen diferencias significativas en los rendimientos de biomasa-nitrógeno al comparar una cepa con el resto. Sin embargo, se observan diferencias al comparar las cepas en pares, lo que señala la existencia de cepas con requerimientos de nitrógeno más bajos (EC-1118 a 15° C y RX-60) y más altos (Uvaferm BDX) dentro de las cepas analizadas, algo que debe ser considerado para evitar fermentaciones problemáticas (e.g. fermentaciones lentas o paralizadas) donde el nitrógeno asimilable presente no es suficiente para los requerimientos de la cepa (Bisson, 1999; Varela et al., 2004).

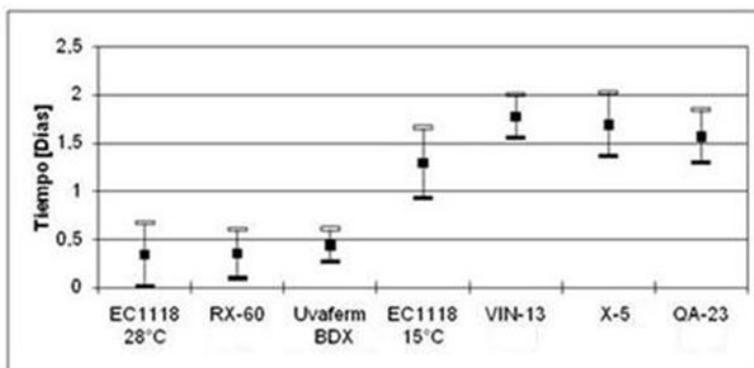
Figura 4-2: Datos de Rendimiento de Biomasa (g de Peso Seco Filtrado) por mg de Nitrógeno consumido, obtenidos por el promedio de los rendimientos de ambos duplicados, y el intervalo dado por la suma y resta de la desviación estándar.



Al utilizar levaduras vínicas comerciales, es necesario asegurar su rápida implementación y dominación. Para este fin, una variable que indica que tan rápido una cepa de levadura puede adaptarse al medio y crecer en él es el tiempo en que demora desde la población inoculada en aumentar su número, como duplicarse o mejor aún cuadruplicarse (Tiempo de latencia, comunicación personal, Pedro Carriles, Lallemand). Este valor podría ser usado por la industria como un indicador temprano del futuro de la fermentación (Figura 4-3). Se observaron valores similares entre cepas de acuerdo a su temperatura de fermentación. Luego, el uso de esta medición podría ser válida como indicador temprano dado que el tiempo de cuadruplicación está dentro de los primeros 2 días de fermentación, y que el recuento de células es una medición muy sencilla. Sin embargo, se debe tener cuidado y considerar que estos valores de tiempos de latencia han sido obtenidos en condiciones de laboratorio y con mosto sintético, y no pueden ser extrapolados de estas condiciones. Luego, los valores de tiempo de latencia en condiciones de fermentaciones industriales deberán ser distintos a los obtenidos en esta tesis.

Figura 4-3: Tiempos de latencia de cada cepa, calculado como el tiempo entre la inoculación y la 2^a generación, en su temperatura correspondiente, señalado como un

posible indicador temprano del futuro de una fermentación en las condiciones



experimentales utilizadas.

4.1.2 Consumo de nutrientes y producción de compuestos principales

La capacidad de consumir los azúcares presentes en el medio y de metabolizarlos en etanol es de vital importancia dado que entrega información sobre qué tan eficiente es la levadura en el proceso fermentativo.

Usualmente una fermentación es detenida en las viñas cuando ésta alcanza una densidad cercana a 990 mg/l, lo que se traduce en una concentración de azúcares totales inferior a 2 g/l y un contenido alcohólico dependiendo de la concentración inicial de azúcar. El tiempo desde la inoculación del mosto hasta el término de la fermentación es considerado como el tiempo necesario por la levadura para alcanzar sequedad en el vino o tiempo de sequedad. Los tiempos de sequedad son un parámetro importante al realizar el plan de fermentaciones durante la época de vendimia, donde el trabajo es intenso y contar con un buen plan es necesario para dar un buen uso a los fermentadores disponibles.

Se estimó el tiempo necesario para alcanzar sequedad con cada cepa al ajustar una curva sigmoideal a todos los tiempos en que las muestras fueron tomadas, graficados en función a las concentraciones medidas (ver anexo I).

Tabla 4.2: Tiempos estimados para alcanzar sequedad con cada cepa, considerada como una concentración de azúcares totales menor a 2 g/L.

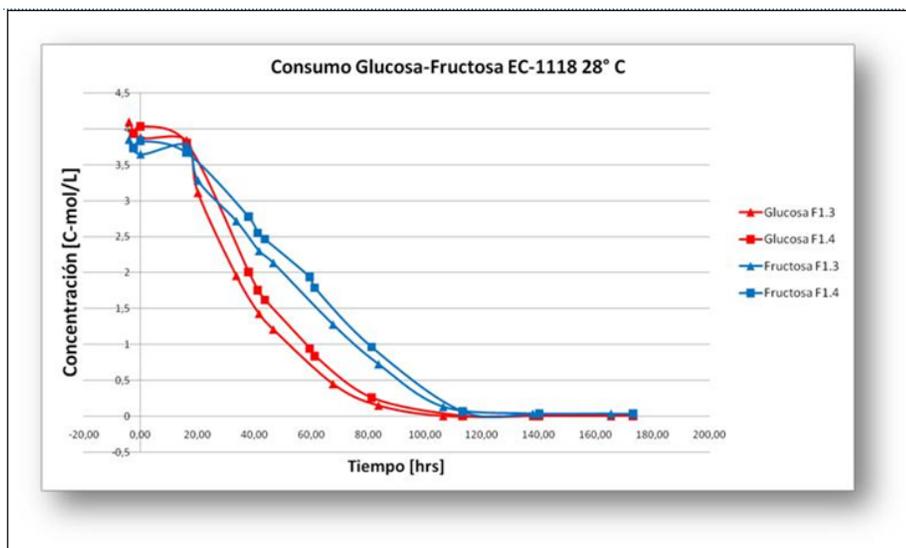
| Temperatura | Cepa | Tiempo Estimado [días] |
|-------------|--------------|------------------------|
| 28° C | EC1118 | 5,8 ± 0,0 |
| | RX-60 | 5,6 ± 0,0 |
| | Uvaferm BDX | 5,8 ± 0,0 |
| 15° C | EC1118 | 14,6 ± 1,4 |
| | QA-23 | 14,3 ± 0,5 |
| | VIN-13 | 16,1 ± 0,1 |
| | X-5 | 15,8 ± 0,3 |

* En negrillas se presentan valores con diferencias estadísticamente significativas al compararla con otras cepas a su misma temperatura.

Se observa que ciertas cepas que demoran más tiempo en alcanzar sequedad para ambas temperaturas de fermentación vínica, y que estas diferencias son mayores a 15° C con una diferencia de casi 2 días más entre EC-1118 y VIN-13 (Tabla 4-2). Se observa una diferencia estadística significativa, pero no relevante, entre RX-60, y EC-1118 y Uvaferm BDX. Además, en las fermentaciones a 15° C se observa que las cepas aromáticas VIN-13 y X-5 fueron las que más demoraron en alcanzar sequedad, siendo VIN-13 la más lenta de todas. Es interesante señalar que no se observan diferencias en tiempo de sequedad entre la cepa neutra EC-1118 y las cepas aromáticas QA-23 y RX-60, a 15° C y a 28° C respectivamente.

Las curvas de consumo de glucosa y fructosa (Figura 4-4 y Anexo I) muestran distintas tasas de consumo de cada azúcar, fenómeno reportado previamente en literatura, y que depende de la cepa y de las condiciones de fermentación utilizadas (Bertherls et al., 2004).

Figura 4-4: Consumos de Glucosa y Fructosa para réplicas de fermentaciones con *S. cerevisiae* EC-1118 a 28° C obtenidas a partir de datos de HPLC.



Existen también algunas diferencias significativas en los consumos promedios de fructosa entre cepas al compararlas según temperatura de fermentación (tabla 4-3), y estas diferencias se encuentran relacionadas a las diferencias observadas en tiempos de sequedad. RX-60, presenta un mayor consumo promedio de fructosa y un tiempo menor de sequedad, y X-5 y VIN-13, presentan consumos promedios menores de fructosa y mayores tiempos de sequedad. Además, VIN-13 presenta un consumo promedio menor de glucosa, lo que explica que sea la cepa que más demora en alcanzar sequedad. Se observa así que las cepas con mayor afinidad a fructosa demoran menos en alcanzar sequedad. En un estudio reciente se señala que la discrepancia glucosa/fructosa (diferencias entre las tasas de consumo de glucosa y fructosa) está correlacionada a la proporción de fosforilación de fructosa/glucosa, y esta proporción es un buen marcador para la selección de levaduras vínicas con menor tendencia a fermentaciones lentas de fructosa (Berthels et al., 2008).

Tabla 4-3: Tasas máxima y promedio de consumo volumétricas de glucosa y fructosa de las cepas de levaduras comerciales vínicas utilizadas. Las comparaciones entre cepas fueron realizadas de acuerdo a temperatura de fermentación.

| \times | Cepa \times | $q_{\max, \text{GLU}} [\text{C- mol}/(\text{L h})]_{\times}$ | $q_{\max, \text{FRU}} [\text{C- mol}/(\text{L h})]_{\times}$ | $q_{\text{prom, GLU}} [\text{C- mol}/(\text{L h})]_{\times}$ | $q_{\text{prom, FRU}} [\text{C- mol}/(\text{L h})]_{\times}$ |
|----------------|-------------------------|--|--|--|--|
| 28° C \times | EC-1118 \times | -0,102 0,011 \times | \pm -0,054 \pm 0,005 \times | \pm -0,037 \pm 0,002 \times | \pm -0,023 \pm 0,001 \times |
| | RX-60 \times | -0,089 0,014 \times | \pm -0,048 \pm 0,001 \times | \pm -0,036 \pm 0,001 \times | \pm -0,025 \pm 0,002 \times |
| | Uvaferm BDX \times | -0,108 0,006 \times | \pm -0,052 \pm 0,001 \times | \pm -0,037 \pm 0,010 \times | \pm -0,021 \pm 0,001 \times |
| \times | \times | \times | \times | \times | \times |
| 15° C \times | EC-1118 \times | -0,031 0,000 \times | \pm -0,019 \pm 0,002 \times | \pm -0,014 \pm 0,002 \times | \pm -0,011 \pm 0,001 \times |
| | QA-23 \times | -0,031 0,001 \times | \pm -0,019 \pm 0,000 \times | \pm -0,014 \pm 0,000 \times | \pm -0,011 \pm 0,000 \times |
| | VIN-13 \times | -0,023 0,003 \times | \pm -0,017 \pm 0,003 \times | \pm -0,011 \pm 0,001 \times | \pm -0,010 \pm 0,001 \times |
| | X-5 \times | -0,025 0,002 \times | \pm -0,014 \pm 0,001 \times | \pm -0,013 \pm 0,000 \times | \pm -0,010 \pm 0,000 \times |

En negrillas consumos volumétricos que presentan una diferencia significativa entre la media de la cepa y la media del resto de las cepas a la misma temperatura con prueba estadística t-Student.

La cantidad de etanol producido en base al substrato consumido indica la eficiencia con que la cepa produce etanol, variable que es especialmente importante para países productores vitivinícolas del Nuevo Mundo, que por tener veranos más cálidos las bayas de uvas se deshidratan obteniéndose una concentración mayor de azúcar en el mosto obtenido a partir de ellas, lo que se traduce en vino con mayor grado alcohólico. Por este motivo se calcularon el rendimiento de etanol en base a las azúcares totales presentes, el grado alcohólico alcanzado, y las tasas máximas y promedio de productividades volumétricas de etanol.

Tabla 4-4: Rendimientos Etanol-Azúcares Totales, grado alcohólico y tasas máxima y promedio de producción volumétrica de etanol. Comparación realizada entre una cepa y el resto de ellas, sin separarlas de acuerdo a temperatura de fermentación.

| Temperatura | Fermentación | Rendimiento Azúcares Totales-Etanol [g/g] \times | Y_{AE} | Grado Alcohólico | Tasa máxima de producción volumétrica de Etanol | Tasa promedio de producción volumétrica de Etanol | $q_{max,E}$ [C-mol/(L h)] | $q_{prom,E}$ [C-mol/(L h)] |
|-------------|--------------|--|----------|---------------------------|---|---|---------------------------|----------------------------|
| | | | | | $q_{max,E}$ [C-mol/(L h)] | $q_{prom,E}$ [C-mol/(L h)] | | |
| 28° C | EC1118 | 0,44 ± 0,01 | | 13,50 ± 0,29 | 0,110 ± 0,008 | 0,027 ± 0,000 | | |
| | RX-60 | 0,47 ± 0,01 | | 14,23 ± 0,52 | 0,087 ± 0,017 | 0,032 ± 0,002 | | |
| | Uvaferm BDX | 0,46 ± 0,01 ^a | | 14,32 ± 0,35 | 0,086 ± 0,008 | 0,026 ± 0,001 | | |
| | | | | | | | | |
| 15° C | EC1118 | 0,44 ± 0,01 | | 13,80 ± 0,52 | 0,032 ± 0,001 | 0,013 ± 0,001 | | |
| | VIN-13 | 0,46 ± 0,02 | | 14,33 ± 0,77 | 0,026 ± 0,001 | 0,012 ± 0,002 ^a | | |
| | X-5 | 0,45 ± 0,02 | | 14,33 ± 0,58 | 0,034 ± 0,001 | 0,012 ± 0,000 | | |
| | QA-23 | 0,44 ± 0,00 ^a | | 13,64 ± 0,21 ^a | 0,038 ± 0,004 | 0,013 ± 0,000 | | |

En negrillas consumos volumétricos que presentan una diferencia significativa entre la media de la cepa y la media del resto de las cepas a la misma temperatura con prueba estadística t-Student.

a Se realiza Test No Paramétrico Kruskal-Wallis dado que no se cumple requisito de Homocedasticidad de Varianza.

No se observan diferencias significativas en los rendimientos de azúcares totales-etanol ni en el grado alcohólico alcanzado por las distintas cepas al comparar entre ellas (tabla 4-4). Se observaron algunas diferencias significativas en las tasas volumétricas máxima y promedio para algunas cepas.

Los resultados fermentativos señalan que no que existen grandes diferencias en parámetros fermentativos, en especial en los rendimientos azúcar-etanol ni en la eficiencia de fermentación. Esto señala la importancia de la búsqueda de una levadura hipoprodutora de etanol como una solución al problema de mostos con mayor concentración de azúcar en los países del hemisferio sur. Las únicas diferencias observadas fueron respecto a tiempos de sequedad y tasas de consumo volumétrico de fructosa, ambos parámetros relacionados entre sí.

4.2 Evaluación sensorial de las muestras

Los resultados de evaluación sensorial representan a todo el aroma que presenta una muestra, en la cuál surgen efectos de potenciación o supresión entre compuestos químicos aromáticos y no aromáticos en 3 niveles: en la mezcla líquida, el equilibrio en el espacio de cabeza como mezcla gaseosa, y en la interacción de la mezcla gaseosa con nuestros receptores olfativos. Estos resultados son más importantes desde un punto de vista aplicado para argumentar si dos levaduras producen vinos distintos, dado que es así como nosotros percibimos los aromas de un vino (Atanasova et al., 2005; Ferreira et al., 2008). A partir de estos resultados, son determinadas las diferencias sensoriales existentes entre los productos fermentativos producidos por las distintas cepas, las cuáles se buscan explicar por medio de la integración de resultados de los análisis químicos y olfatométricos, que representan una descomposición de la componente aromática. **4.2.1**

Evaluación Sensorial Discriminante

El test discriminante triangular es recomendado sólo para muestras similares sensorialmente. Por medio de la evaluación sensorial preliminar mencionada en la sección de Materiales y Métodos, se determinó que los fermentados producidos a alta temperatura eran notoriamente diferentes uno del otro, por lo que no se realizaron test discriminantes para demostrar aquello, y se consideró como resultado que las cepas usadas producen fermentados diferentes. Para los vinos elaborados a baja temperatura, debido a que fueron preliminarmente percibidos como muy similares, se les realizó test discriminante para verificar si éstos eran percibidos como muestras distintas.

Los test discriminantes establecieron como iguales los caldos producidos por las cepas EC-1118 y X-5, y los caldos producidos por las cepas VIN-13 y QA-23, mientras que fueron percibidos como distintos los vinos producidos por las cepas EC-1118 y VIN-13; EC-1118 y QA-23; VIN-13 y X-5; y X-5 y QA-23 (Tabla 4-5).

Tabla 4-5: Comparación entre caldos obtenidos por distintas cepas mediante evaluación sensorial discriminante a través de comparaciones pareadas entre cepas por test triangular.

| × | VIN-13× | X-5× | QA-23× |
|----------|---------|------|--------|
| EC-1118× | +× | -× | +× |
| VIN-13× | × | +× | -× |
| X-5× | × | × | +× |

+ : Hay diferencias significativas con 95% de confianza.

- : No ha diferencias significativas con 95% de confianza.

Respecto a las parejas de cepas cuyos fermentados no fueron percibidos como distintos, X-5 es recomendada como una cepa productora de aromas, además de ser reveladora de aromas varietales; sin embargo no produjo un vino diferenciado al de la cepa EC-1118, una cepa caracterizada como buena fermentadora, pero aromáticamente neutra. Luego, la diferencia de síntesis de aromas fermentativos entre estas 2 cepas en las condiciones experimentales utilizadas no es percibida sensorialmente y no es útil para su diferenciación. También, no se percibieron diferencias entre las cepas VIN-13 y QA-23, ambas cepas recomendadas principalmente como reveladoras de aromas varietales. VIN-13 es una cepa también recomendada como productora de esteres, característica que no contribuyó a la discriminación del vino producido respecto al elaborado con QA-23.

Si bien los productos fermentativos de 2 parejas de cepas no son significativamente distintos, aquellos correspondientes a las otras 4 parejas de cepas sí lo fueron, donde EC-1118, produjo fermentados distintos de las 2 cepas caracterizadas como reveladoras de aromas varietales (VIN-13 y QA-23). De la misma forma X-5, se diferenció de las cepas reveladoras de aromas. Así, se observó una diferencia en entre los fermentados elaborados con cepas productoras de aromas (EC-1118 y X5) y reveladoras de aromas (VIN-13 y QA-23). Además, estas diferencias no están relacionadas con el hecho de que algunas cepas sean del género *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces bayanus* o cepas híbridas resultantes de la fusión entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

Además, es interesante notar que solamente fue necesario realizar test discriminante para diferenciar los vinos elaborados por las cepas fermentadas a baja temperatura. En efecto, las cepas a alta temperatura produjeron caldos lo suficientemente distintos entre sí para no requerir este tipo de test. Esto puede señalar un efecto de temperatura respecto a las diferencias entre cepas, donde a alta temperatura sea más fácil diferenciar entre cepas que a baja temperatura.

En resumen, a partir de la evaluación sensorial se observó que la mayoría de los fermentados producidos por cepas distintas fue posible discriminarlos entre sí. Sin embargo, algunos vinos elaborados por cepas distintas en fermentaciones a baja temperatura no fue posible diferenciarlos.

4.2.2 Análisis Descriptivo Cuantitativo

Las muestras fueron analizadas en una primera instancia por el panel de evaluación sensorial del Centro de Aromas. Un grupo de 19 descriptores fueron propuestos para realizar la descripción de las muestras (ver Anexo J). Con estos 19 descriptores, se realizaron 2 sesiones de evaluación sensorial preliminares, donde se verificó que los descriptores propuestos eran estadísticamente significativos al comparar si existían o no diferencias significativas entre las medias de cada sesión. Luego de esto, se realizaron 2 sesiones de evaluación sensorial más para ampliar el set de datos. A partir de los datos obtenidos en las últimas 3 sesiones se obtuvo 9 de los 19 descriptores iniciales cuyas varianzas entre sesiones no presentaron diferencias significativas y por lo tanto pueden ser utilizados para el QDA (Tabla 4-6).

Tabla 4-6: Descriptores significativos utilizados para la realización del QDA. Significancia obtenida al comparar promedios de intensidad para cada descriptor entre las 3 sesiones realizadas por el panel de evaluación sensorial.

| Descriptores Significativos | Valor-P en test a ANOVA considerando las 3 últimas sesiones de evaluación |
|-----------------------------|---|
| Plátano | 0,06823* |
| Caramelo | 0,02809 |
| Alcohol irritante | 0,04152 |
| Piña | 0,04583 |
| Pasas | 0,00429 |
| Cola fría | 0,02021 |
| Oxidado | 0,00035 |
| Candy plátano | 0,02391 |
| Pan añejo | 0,00008 |

* El descriptor Plátano fue utilizado también a pesar de tener un valor-p > 0,05 dado que al calcular los valor-p con las otras mediciones, siempre fue menor a 0,05.

Luego, a partir de los valores promedio de intensidad de cada descriptor obtenidos en las 3 sesiones consideradas para el análisis de QDA, se obtuvieron perfiles aromáticos característicos para cada cepa. El descriptor Caramelo no fue utilizado para graficar los perfiles aromáticos obtenidos, debido a que se consideró que éste podría ser un artefacto del mosto sintético utilizado, el cuál al ser autoclavado está sujeto a la caramelización de las azúcares presentes, lo que pudo haber generado la nota aromática de Caramelo. Los perfiles aromáticos obtenidos para cada cepa pueden ser observados en separado en el anexo J, y en superposición para cada temperatura de fermentación en las figuras 4-5 y 4-6 para 28° C y 15° C, respectivamente.

Figura 4-5: Perfiles Aromáticos a través de QDA de los caldos obtenidos con distintas cepas comerciales de *S. cerevisiae* fermentadas a 28° C. Descriptores con diferencias significativas entre perfiles se encuentran dentro de elipses rojas, y los niveles de significancia estadística están representados por letras.

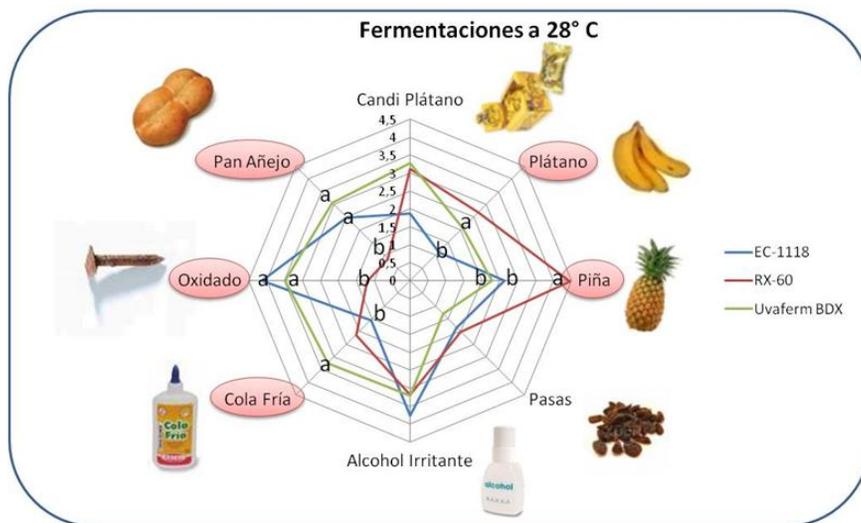
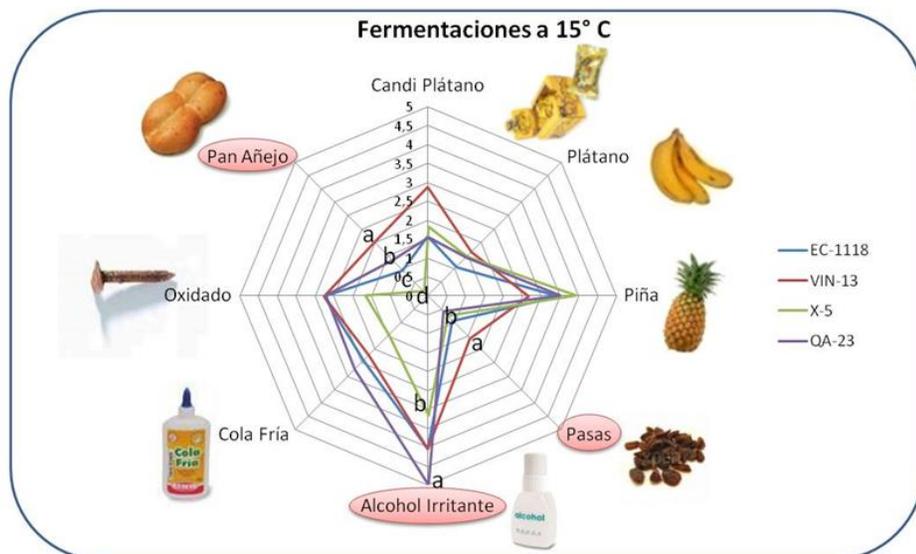


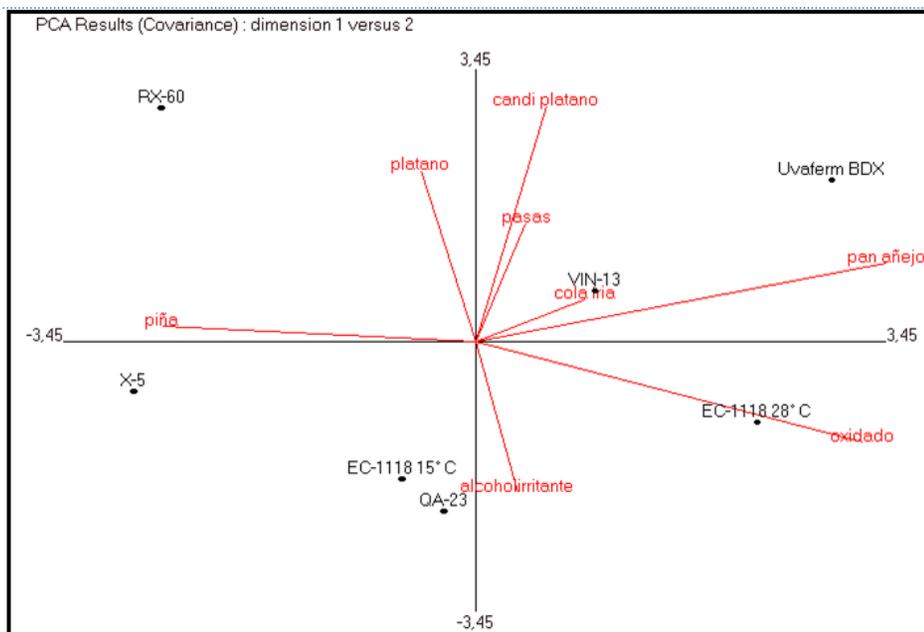
Figura 4-6: Perfiles Aromáticos a través de QDA de los caldos obtenidos con distintas cepas comerciales de *S. cerevisiae* fermentadas a 15° C. Descriptores con diferencias significativas entre perfiles se encuentran dentro de elipses rojas, y los niveles de significancia estadística están representados por letras.



Los perfiles aromáticos obtenidos muestran diferencias en especial para algunos descriptores específicos, e.g. piña para fermentaciones a 28° C y pan añejo para fermentaciones a 15° C, mientras que para otros prácticamente los valores son similares para todas las cepas, e.g. oxidado a 15° C y alcohol irritante a 28° C (más detalles, Anexo J). Además, las formas de los perfiles son más pronunciadas entre cepas para alta temperatura que para baja temperatura, donde se observan menos diferencias.

A partir de estos datos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA), permitiendo explicar la varianza de los descriptores en un 91%. Así, con 3 componentes principales es posible explicar la mayor parte de la varianza de los datos, donde los descriptores piña, pan añejo y oxidado dan cuenta del 51% de la varianza explicada por medio de la componente 1, mientras que candy plátano, plátano y alcohol irritante dan cuenta de un 29% explicado por medio de la componente 2. Del 20% de la varianza restante, que no es explicada por las primeras 2 componentes, 11% es explicada por la tercera componente. Esto señala que los atributos utilizados permitieron efectivamente determinar las diferencias entre las muestras.

Figura 4-7: Gráfica de Análisis de Componentes Principales, representando las 2 componentes principales que explican el 81% de la varianza de los datos obtenidos por QDA.



A partir de estos resultados se clasificaron las cepas de acuerdo al peso obtenido por cada descriptor en su perfil aromático y el análisis de PCA. La componente 1 ubicada en el eje horizontal de la figura 4-7, posee en sus valores positivos características microbiológicas (pan añejo) y oxidado (oxidado), y en sus valores negativos representa un carácter frutal tropical (piña). La componente 2 ubicada en el eje vertical de la figura 4-7 y posee en sus valores positivos características frutales (plátano, frutos secos y candy plátano), y en sus valores negativos una característica química (alcohol irritante). Con esto se determinó que:

Las cepas X-5 y RX-60 otorgan un aroma frutal superior a las otras cepas, aunque RX-60 entrega una característica frutal mayor en comparación a X-5, ya que se ubica en las 2 componentes en coeficientes frutales, en cambio X-5 la componente 2

se encuentra en el medio, lo que implica un equilibrio entre las características químicas y frutales.

Las cepas VIN-13 y Uvaferm BDX entregan aromas microbiológicos en la componente 1, y en características frutosas y caramelizadas en la componente 2. Ambas cepas poseen una razón similar al ser proyectadas en cada eje, pero se diferencian en la intensidad de cada atributo, siendo mayores con Uvaferm BDX.

La cepa QA-23 es una cepa poco aromática, entregando un aporte similar a la cepa EC-1118 a baja temperatura, con un bajo aporte frutal y un aporte medio en características químicas.

La cepa EC-1118 a alta temperatura entrega características más bien fermentativas respecto, particularmente microbiológico y oxidado, y químico en menor grado, pero con un muy bajo aporte en características frutosas.

Respecto al alto valor entregado para el descriptor oxidado en la cepa EC-1118 a alta temperatura, se señala que estas fermentaciones fueron las primeras realizadas, por lo tanto las que permanecieron por más tiempo en las condiciones de almacenamiento. Luego no es posible determinar si esta característica oxidada es un efecto de la cepa o un artefacto introducido por las condiciones de almacenamiento.

Además se hicieron análisis de PCA de las cepas separadas por temperatura, y observándose los resultados similares a los anteriores (ver anexo J). Sin embargo, se señala que estos análisis no cumplen con el requisito que el número de muestras debe ser idealmente igual al número de descriptores al cuadrado.

A partir de los datos, se hicieron análisis ANOVA por cada descriptor para determinar si existían diferencias significativas entre los valores obtenidos para cada vino. Esto se hizo separando los fermentados elaborados por cepas a baja temperatura de los elaborados por cepas a alta temperatura.

A alta temperatura (Figura 4-5), destaca la cepa RX-60, la cual posee características frutales (piña) estadísticamente significativas mayores que las cepas EC-1118 y Uvaferm BDX, y posee características oxidadas y microbiológicas (oxidado y pan añejo) significativamente menores que EC-1118 y Uvaferm BDX. EC-1118 se destaca por tener en el descriptor plátano el menor valor de las tres cepas.

Respecto a baja temperatura (Figura 4-6), la cepa VIN-13 tiene el mayor valor en el descriptor caramelo y pasas; las diferencias con las otras cepas no son estadísticamente significativas. Respecto al caramelo, éste se descartó dado que resultaría del proceso de autoclavado y por lo tanto artefactual.

Es interesante señalar que los descriptores que poseen diferencias estadísticas a 28° C son distintos a los descriptores a 15° C, pero las categorías de los aromas son las mismas: frutoso, microbiológico y químico. A ambas temperaturas el descriptor pan añejo (microbiológico) presenta diferencias en su percepción. A 28° C las diferencias se encuentran en descriptores frutosos (plátano y piña), junto con químicos y oxidados. Mientras que a 15° C, éstas radican en descriptores frutosos

(Pasas) y químicos (alcohol irritante). Esto nuevamente señala un efecto de temperatura en las diferencias percibidas entre cepas, presentando diferencias más acentuadas en aromas frutosos (frutas tropicales) a 28° C, en tanto que a 15° C éstas radican en aromas químicos y frutosos (frutas secas). Esto se relaciona con trabajos anteriores (Killian & Ough, 1979; Molina et al., 2007) donde se señala que los ésteres frutosos frescos están en una concentración mayor a baja temperatura, mientras que algunos ésteres frutosos secos y florales están en mayor concentración a alta temperatura. Además, se ha demostrado que existe un efecto importante de temperatura para otros tipos de compuestos que generan aromas frutosos, como los tioles presentes en Sauvignon blanc, donde a mayor temperatura (20° C) se observan mayores concentraciones de estos compuestos libres que a baja temperatura (13° C) (Masneuf-Pomarède et al., 2006) (más detalle en anexo J).

En resumen, el análisis descriptivo señaló la existencia de diferencias significativas en las intensidades percibidas en ciertos descriptores entre vinos producidos a ambas temperaturas, y se observa un efecto de la temperatura en la mayor semejanza de los perfiles aromáticos de vinos fermentados a 15° C respecto a los vinos fermentados a 28° C.

4.3 Comparación de Compuestos Volátiles

Se obtuvo un listado de compuestos para cada condición, que varió entre 84 y 108 compuestos identificados con el nombre del compuesto, su concentración calculada para cada replica y su coeficiente de variación (ver anexo K). De los compuestos identificados para cada condición, se obtuvo un listado que consistió en un total de 66 compuestos comunes, presentes en todas las condiciones experimentales o por lo menos en 5 de las condiciones (ver anexo K). Además, se identificó 14 compuestos presentes en el mosto sin inocular que se encontraron entre los 66 compuestos comunes en las fermentaciones. No se encontró que las concentraciones de los 14 compuestos presentes en el mosto sin inocular fueran importantes en compuestos sintetizados por la levadura (e.g. alcohol isoamílico, ácido acético $\leq 1\%$, mayor valor para ácido hexanoico 11%, más detalle ver anexo K). Del total de 66 compuestos comunes, sólo 13 compuestos presentaron valores de OAV mayor que 1. Estos compuestos presentaron diferencias significativas en sus valores de OAV (Tabla 4-7 y 4-8). Se debe recordar la importancia del umbral olfativo en los valores de OAV calculados, el depende principalmente de la matriz donde fue calculado, y la técnica experimental utilizada para determinar el umbral (Marsili, 2006).

Tabla 4-7: Compuestos y Valores de OAV para Fermentaciones realizadas a 28° C con 3 cepas comerciales de *S. cerevisiae*. Comparación realizada de valores de OAV entre cepas por One-Way ANOVA de datos de concentración obtenidos a partir de triplicados de extracción L-L en ambos duplicados.

| Compuesto \times | Umbral de Detección [$\mu\text{g/L}$] \times | OAV EC-1118 \times | OAV RX-60 \times | OAV Uvaferm BD \times | Diferencia Estadística OAV \times |
|---------------------------------|--|-------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Alcohol Isoamílico \times | 30000 ^a | 1,7 \pm 0,2 \times | 1,7 \pm 0,4 \times | 2,7 \pm 0,2 \times | SI \times |
| Etil Hexanoato \times | 14 ^b | 16,9 \pm 2,1 \times | 19,5 \pm 4,7 \times | 12,4 \pm 0,8 \times | SI [*] \times |
| 3-Ethoxy-1-propanol \times | 100 ^c | 7,1 \pm 1,4 \times | 3,4 \pm 1,6 ^a | 1,6 \pm 0,2 \times | SI [*] \times |
| Etil Octanoato \times | 580 ^d | 1,0 \pm 0,2 \times | 0,9 \pm 0,2 \times | 0,6 \pm 0,0 \times | SI [*] \times |
| Ácido Butírico \times | 173 ^b | 1,0 \pm 0,3 \times | 0,9 \pm 0,2 \times | 1,3 \pm 0,1 \times | SI \times |
| Etil Decanoato \times | 200 ^b | 1,2 \pm 0,8 \times | 1,4 \pm 0,1 \times | 1,1 \pm 0,3 \times | NO [*] \times |
| Ácido Isovalérico \times | 33 ^b | 10,3 \pm 0,6 \times | 7,4 \pm 0,3 \times | 7,8 \pm 0,8 \times | SI [*] \times |
| Metionol \times | 1000 ^a \times | 2,0 \pm 0,2 \times | 3,0 \pm 0,6 \times | 4,7 \pm 0,1 \times | SI [*] \times |
| Acetato de Fenil Etilo \times | 250 ^a \times | 6,7 \pm 0,5 \times | 4,1 \pm 0,3 \times | 5,3 \pm 0,3 \times | SI \times |
| Ácido Hexanoico \times | 420 ^b | 2,6 \pm 0,6 \times | 2,1 \pm 0,1 \times | 1,9 \pm 0,1 \times | SI [*] \times |
| Fenil Etanol \times | 14000 ^b | 3,1 \pm 0,5 \times | 3,0 \pm 1,2 \times | 3,4 \pm 0,3 \times | NO [*] \times |
| Ácido Octanoico \times | 500 ^b | 4,0 \pm 1,2 \times | 3,8 \pm 0,3 \times | 2,5 \pm 0,2 \times | SI [*] \times |
| Ácido Decanoico \times | 1000 ^b | 1,3 \pm 0,4 \times | 1,5 \pm 0,1 \times | 0,9 \pm 0,3 \times | SI [*] \times |

a (Guth, 1997) Umbral obtenido en solución agua-etanol al 10% p/p.

b (Ferreira et al., 2000) Umbral obtenido en solución agua-etanol al 11%, con 7 g/L de glicerol, 5 g/L de ácido tartárico, y pH ajustado a 3.4 con 1 M NaOH.

c (Muñoz et al., 2007) No se entrega información sobre que matriz fue usada para calcular el umbral.

d (Etiévant, 1991; Escudero et al., 2007) Umbral calculado en vino.

* Datos comparados con Test No Paramétrico Kruskal-Wallis dado que no cumplían con normalidad o homocedasticidad de varianza.

(Datos en negrillas poseen una variabilidad microbiológica superior o igual al 50%.)

A 28° C, existen diferencias significativas en los valores de OAV en 11 de los 13 compuestos que presentan OAV mayores a 1. Estas diferencias en las concentraciones existentes en estos compuestos son importantes para explicar algunas de las diferencias encontradas por medio del análisis de los resultados obtenidos por evaluación sensorial de los fermentados. Así, las diferencias estadísticas de los ésteres etil hexanoato, etil octanoato, y del alcohol superior alcohol isoamílico pueden explicar las diferencias significativas percibidas en los descriptores plátano y piña. En especial etil hexanoato, un compuesto cuyos descriptores asociados por literatura son: frutoso, piña, plátano, piel de manzana, y cuya concentración promedio obtenida con la cepa RX-60 es la mayor de las 3 cepas usadas para alta temperatura y coincide con la percepción del fermentado producido por esta cepa como el más frutoso. La tabla 4-8 muestra los resultados para las fermentaciones realizadas con distintas cepas a baja temperatura.

Tabla 4-8: Compuestos y Valores de OAV para Fermentaciones realizadas con 4 cepas comerciales de *S. cerevisiae* a 15° C. Comparación realizada de valores de OAV entre cepas por One-Way ANOVA de datos de concentración obtenidos a partir de triplicados de extracción L-L en ambos duplicados.

| Compuesto | Umbral | OAV EC- | OAV VIN- | OAV X-5 | OAV QA- | Diferencia |
|-----------|--------|---------|----------|---------|---------|------------|
|-----------|--------|---------|----------|---------|---------|------------|

| | [$\mu\text{g/L}$] | 1118 | 13 | | 23 | Estadística OAV |
|------------------------|---------------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|
| Alcohol Isoamílico | 30000 ^a | 1,9 \pm 0,2 | 1,6 \pm 0,1 | 1,6 \pm 0,2 | 2,3 \pm 0,3 | SI |
| Etil Hexanoato | 14 ^b | 27,5 \pm 1,2 | 31,5 \pm 2,2 | 44,4 \pm 9,5 | 31,5 \pm 9,0 | SI* |
| 3-Ethoxy-1-propanol | 100 ^c | 9,4 \pm 3,1 | 9,3 \pm 0,5 | 11,8 \pm 0,4 | 8,3 \pm 0,9 | SI* |
| Etil Octanoato | 580 ^d | 1,4 \pm 0,4 | 1,2 \pm 0,4 | 1,9 \pm 0,2 | 1,7 \pm 0,3 | SI |
| Acido Butírico | 173 ^b | 1,6 \pm 0,1 | 1,6 \pm 0,00 | 1,8 \pm 0,4 | 1,7 \pm 0,3 | NO* |
| Etil Decanoato | 200 ^b | 3,9 \pm 1,6 | 7,5 \pm 1,0 | 9,0 \pm 0,5 | 6,5 \pm 1,8 | SI* |
| Acido Isovalérico | 33 ^b | 21,3 \pm 1,6 | 23,5 \pm 3,1 | 18,2 \pm 1,4 | 20,6 \pm 5,1 | SI* |
| Metionol | 1000 ^a | 2,0 \pm 0,7 | 1,8 \pm 0,2 | 1,0 \pm 0,2 | 1,9 \pm 0,2 | SI* |
| Acetato de Fenil Etilo | 250 ^a | 2,3 \pm 1,3 | 1,6 \pm 0,1 | 2,1 \pm 0,1 | 2,3 \pm 0,6 | NO* |
| Acido Hexanoico | 420 ^b | 4,1 \pm 0,1 | 3,8 \pm 0,1 | 3,8 \pm 0,5 | 2,1 \pm 0,3 | SI* |
| Fenil Etanol | 14000 ^b | 2,8 \pm 0,6 | 1,5 \pm 0,1 | 1,9 \pm 0,3 | 3,0 \pm 0,1 | SI* |
| Acido Octanoico | 500 ^b | 6,2 \pm 1,4 | 5,9 \pm 0,6 | 6,1 \pm 0,3 | 7,2 \pm 0,7 | NO* |
| Acido Decanoico | 1000 ^b | 2,1 \pm 0,2 | 4,2 \pm 0,3 | 3,4 \pm 0,2 | 3,9 \pm 0,5 | SI* |

a (Guth, 1997) Umbral obtenido en solución agua-etanol al 10% p/p.

b (Ferreira et al., 2000) Umbral obtenido en solución agua-etanol al 11%, con 7 g/L de glicerol, 5 g/L de ácido tartárico, y pH ajustado a 3.4 con 1 M NaOH.

c (Muñoz et al., 2007) No se entrega información sobre que matriz fue usada para calcular el umbral.

d (Etiévant, 1991; Escudero et al., 2007) Umbral calculado en vino.

* Datos comparados con Test No Paramétrico Kruskal-Wallis dado que no cumplan con normalidad o homocedasticidad de varianza.

(Datos en negrillas poseen una variabilidad microbiológica superior o igual al 50%.)

Sólo 3 compuestos no mostraron diferencias significativas a 15° C en OAV (ácido butírico, acetato de fenil etilo, y ácido octanoico). Recordando que las diferencias significativas en los descriptores percibidas por evaluación sensorial fue para los descriptores alcohol irritante, pasas, y pan añejo, se observa que las diferencias significativas existentes de OAV de los ésteres etil hexanoato, etil octanoato y etil decanoato no fueron percibidas por evaluación sensorial, por lo que esta diferencia en concentración no produce un efecto significativo diferenciador sensorial. Tampoco con estas diferencias en concentración es posible explicar que la cepa VIN-13 sea percibida significativamente con la mayor intensidad para el descriptor pasas.

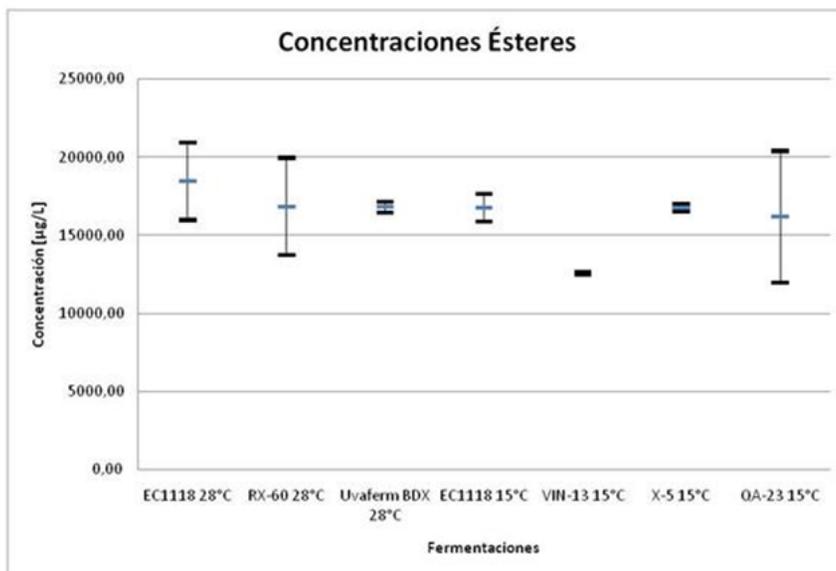
El mismo análisis estadístico con los 13 compuestos que presentaron OAV mayores que 1 se realizó respecto a temperatura, es decir los perfiles de las cepas fermentadas a 28° C fueron comparadas con los de las cepas fermentadas a 15° C. 12 de los 13 compuestos presentaron diferencias significativas en concentración y

en sus OAV's al ser comparados. El único compuesto que no presentó diferencias significativas fue alcohol isoamílico. Esto reafirma trabajos anteriores del grupo que mostraron que la temperatura ejerce un efecto significativo en las concentraciones obtenidas al final del proceso fermentativo (Molina et al., 2007). Además, comparando las fermentaciones realizadas con la cepa EC-1118 a alta y baja temperatura, se encontró que a 15° C hay una concentración mayor de los tres ésteres con OAV mayor que 1 (etil hexanoato, etil octanoato y etil decanoato) que 28° C.

Una de las principales críticas que posee el cálculo de OAV y la relación entre el impacto e importancia del compuesto es que no existe una relación directamente proporcional entre intensidad percibida y el número de veces que la concentración de un compuesto se encuentra sobre su umbral (Pollien et al., 1997; Kamadia et al., 2006). Esto es consecuencia que la ley que mejor describe la intensidad percibida respecto a la concentración de un compuesto es la Ley Psicofísica de Potencia de Stevens. Así, algunos autores (McGorrin & Gimelfarb, 1998; Marsili, 2006) proponen usar el logaritmo de OAV para buscar compuestos importantes. Así, se calculó el logaritmo de OAV de los compuestos con OAV mayores que 1 y se realizó el mismo análisis anterior, pero tampoco se encontrar diferencias al respecto.

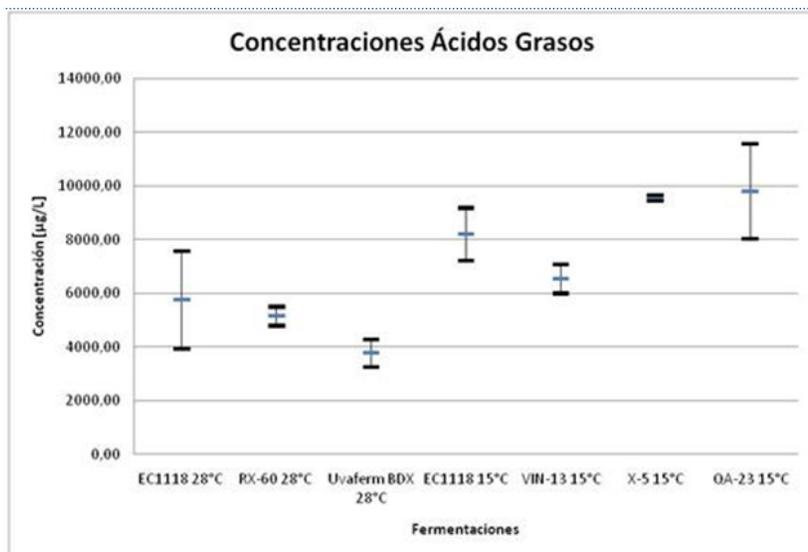
Utilizando los compuestos presentes en todas las fermentaciones, se clasificaron de acuerdo al tipo de compuesto en 4 categorías: Ésteres, Alcoholes Superiores, Ácidos Grasos y Otros. Luego, en cada replica de fermentación se calculó un promedio de concentración para cada compuesto, los que fueron sumados por categoría, obteniéndose una concentración total para cada una. Con ambas concentraciones totales por categoría se calculó un promedio y una desviación estándar de los dos valores. Los promedios para cada categoría junto con el intervalo definido por su desviación estándar se graficaron para determinar diferencias existentes en la producción total de las 3 categorías de aromas fermentativos (Figuras 4-8, 4-9, y 4-10).

Figura 4-8: Comparación de las concentraciones totales de ésteres entre las cepas utilizadas. Concentraciones de ésteres no considera a acetato de etilo.



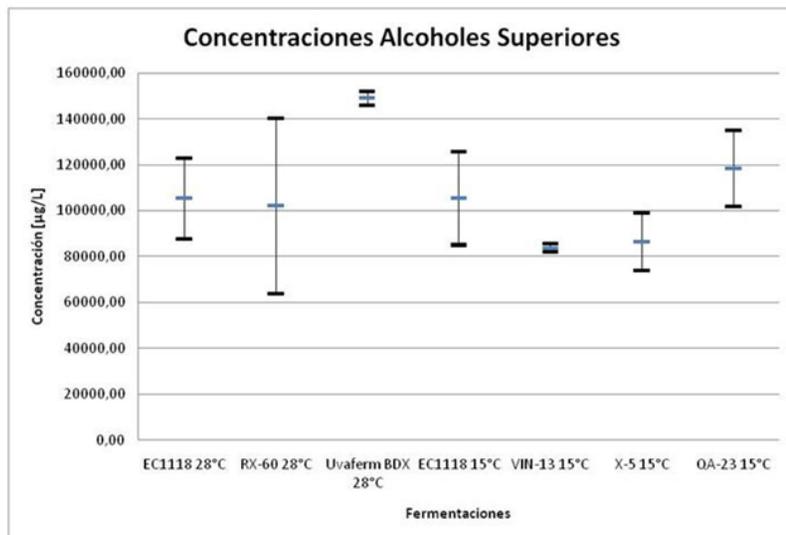
La concentración total de ésteres es un indicador posible del aroma frutal obtenido por una cepa, si se considera que existen efectos sinérgicos entre compuestos de una misma familia química (Ferreira et al., 2008). Los compuestos que fueron considerados en esta clasificación fueron los siguientes: propanoato de etilo, acetato de isoamilo, etil hexanoato, etil lactato, etil octanoato, etil 3-hidroxybutirato, 2,3-butanodiol monoacetato, etil decanoato, 1,3-propanediol monoacetato, etil 4-hidroxybutirato, 2-fenil acetato, y 4-hidroxybutirato de isopentilo. El promedio de concentración total de ésteres fue similar para todas las fermentaciones, exceptuando al promedio obtenido con la cepa VIN-13 (Figura 4-8). Esto no se relacionó con las diferencias observadas en los aromas frutales por evaluación sensorial, en especial en los vinos obtenidos a 28° C. Otro aspecto a señalar es que la concentración total de ésteres obtenida con la cepa EC-1118 a 28° C fue similar a la concentración de ésteres a 15° C con la misma cepa.

Figura 4-9: Comparación de las concentraciones totales de ácidos grasos entre las cepas utilizadas. No considera la concentración de ácido acético.



Del mismo modo que para los ésteres, la concentración total de ácidos grasos es un indicador de aromas microbiológicos debido a efectos sinérgicos entre los compuestos (a excepción de ácido acético, que posee aroma químico). Los compuestos considerados dentro de los ácidos grasos fueron: ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, y el ácido hexadecanoico. Ácido acético no fue considerado debido a tener una mayor concentración que el resto de los ácidos, y no fue utilizado como un descriptor significativo en evaluación sensorial ni tampoco tener valores de OAV mayores a 1. Para las concentraciones totales de ácidos grasos, no se observa una relación entre las diferencias de percepción del descriptor pan añejo en las concentraciones totales de ácidos grasos.

Figura 4-10: Comparación de las concentraciones totales de alcoholes superiores entre las cepas utilizadas.

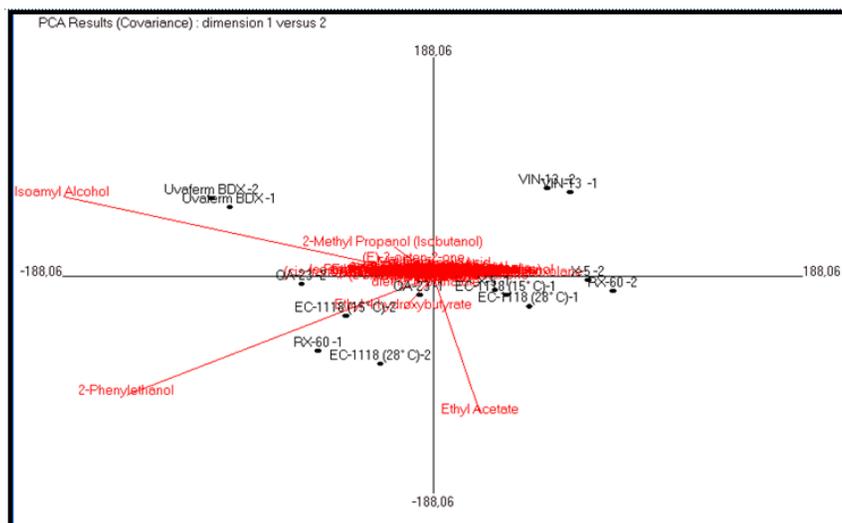


Del mismo modo, las concentraciones totales de alcoholes superiores son un indicador del aroma químico característico de esta familia de compuestos, aunque también entregan algunas notas frutales o florales, dependiendo de su concentración y tipo. Los compuestos que fueron considerados dentro de esta categoría fueron: isobutanol, alcohol isoamílico, Z-3-hexenol, 1-hexanol, 3-etoxi-1-propanol, 2,3-butanodiol, 1,2-propanodiol, furfuril alcohol, metionol, fenil etanol, y tirosol. Nuevamente se obtuvieron valores similares en las concentraciones totales de alcoholes superiores para las cepas, a excepción de la cepa Uvaferm BDX, lo que se relacionó a una mayor intensidad en la percepción del descriptor cola fría en el vino elaborado por aquella cepa.

Los datos obtenidos en los perfiles químicos de cada fermentación fueron analizados mediante análisis de componentes principales para explicar la variabilidad de los datos con el objetivo de buscar relaciones existentes entre algunos compuestos, y la clasificación de las cepas. Se utilizaron las concentraciones de los compuestos comunes encontrados en las fermentaciones y los OAV calculados anteriormente para estos análisis, lo que fueron realizados en 3 aproximaciones: usando datos de todas las cepas juntas y separándolas por temperatura de fermentación. Para el análisis de PCA que involucró las concentraciones de los 66 compuestos comunes, en las 3 aproximaciones se explicó en las primeras 2 dimensiones aproximadamente el 90% de la variabilidad de los datos. Al analizar todas las fermentaciones no se observa una clara separación entre cepas, pero al tratar los datos de forma separada por temperaturas, se observa que algunas cepas (Uvaferm BDX a 28° C y VIN-13 a 15° C) se separan del grupo central en ambos casos. Comparando todas las cepas, los compuestos químicos que explican la varianza y tienen un coeficiente mayor en las componentes principales son el etil acetato, alcohol isoamílico, y el 2-fenil etanol (Figura 4-11) (ver anexo K para resultados de PCA realizados a cada temperatura).

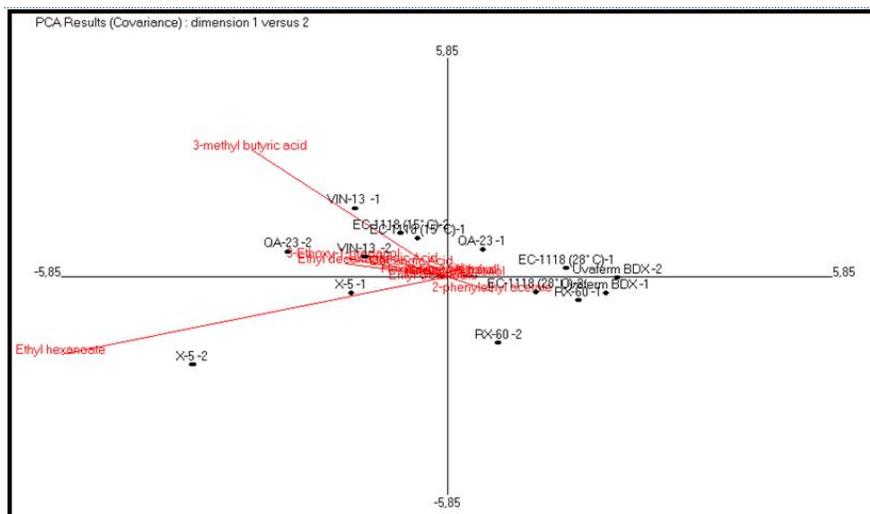
Figura 4-11: PCA de las concentraciones de los compuestos comunes encontrados en el análisis químico para todos los replicados de fermentaciones realizadas. Componente 1

explica el 68% de la varianza de los datos, mientras que la componente 2 explica un 18%.



Para el análisis de PCA de los 13 compuestos con OAV mayor que 1 en usando las mismas aproximaciones anteriores se encontró que se explicaba más del 90% de la variabilidad de los datos por las primeras 2 componentes principales. Nuevamente al comparar todas las fermentaciones no se logra una separación de los replicados, pero sí al compararlas separadas por su temperatura de fermentación. Aunque, a diferencia con el resultado anterior, sólo a 28° C se observa una separación entre Uvaferm BDX y el resto de ellas, pero no a 15° C. Al utilizar los datos de OAV, los compuestos que poseen un coeficiente mayor en las componentes principales son etil hexanoato y ácido 3-metilbutírico (ácido isovalérico) (Figura 4-12) (ver anexo K para resultados de PCA con datos de OAV por temperaturas).

Figura 4-12: PCA de los OAV de los compuestos comunes encontrados en el análisis químico, y que se encontró su umbral de detección, para todos los replicados de fermentaciones realizadas. Componente 1 explica el 85% de la varianza de los datos, mientras que la componente 2 explica un 10%.



El análisis de PCA utilizando los datos químicos no entregó resultados satisfactorios debido a la alta variabilidad de algunos compuestos cuantificados en los replicados de fermentación, lo que no permitió que algunos duplicados se posicionaran cercanos uno al otro, estando dispersos y mezclándose con otras condiciones. Aún así, al tratar los datos separados por temperatura de fermentación, se produce la separación de algunos vinos producidos por ciertas cepas (Uvaferm BDX y VIN-13). Si bien este tipo de análisis se ha usado para diferenciar entre vinos de acuerdo a las concentraciones químicas de compuestos volátiles presentes (Sivertsen et al., 1999; Martí et al., 2004; Korenovská & Suhaj, 2005; Jurado et al., 2008), en este caso la diferenciación no es clara con nuestros resultados. Sin embargo, entrega información sobre que compuestos son los que explican la mayor parte de la varianza de los datos, observándose diferentes compuestos al considerar los datos de concentración química y OAV. Estos compuestos podrían ser utilizados como marcadores para discriminar entre cepas comerciales de levaduras, pero se debería comprobar que estos resultados no son artefactos de la variabilidad del proceso de extracción.

En resumen, el análisis químico encontró 13 compuestos de impacto olfativo entre los compuestos cuantificados e identificados por GC-MS, y que diferencias significativas en las concentraciones de estos 13 compuestos podían ser relacionadas a diferencias percibidas por evaluación sensorial.

4.4 Comparación de Perfiles Olfatométricos

Los resultados obtenidos por medio del análisis olfatométrico fueron un desafío, por ser la primera vez que esta metodología y aproximación para el análisis de los datos olfatométricos han sido utilizadas en nuestro grupo. Sin embargo, la importancia de estos resultados para validar los datos obtenidos por el análisis de GC-MS, utilizando una aproximación distinta, lo hace un aspecto imprescindible para este tipo de estudios. El cálculo del valor de frecuencia modificada (FM) para cada compuesto aromático permitió entregar un valor sobre la importancia del aroma. Con esto, la información entregada por el análisis de GC-O es una descomposición

de la componente aromática representada gráficamente en un aromagrama, i.e. la gráfica de los compuestos aromáticos respecto al tiempo que eluyen de la columna cromatográfica. Así, el principal resultado del análisis de GC-O fue obtener para cada fermentación su perfil olfatométrico, que consistió en graficar los valores de FM obtenidos con respecto al tiempo a partir de la evaluación de la intensidad y una descripción del aroma realizada por un panel de 8 personas para dar validez a los datos y asegurar su reproducibilidad (Pollien et al., 1997). Para 14 de las fermentaciones realizadas (las mismas usadas en el análisis químico) y además el mosto sin inocular, fueron obtenidos perfiles olfatométricos, en los cuáles por medio de un ajuste de los cromatogramas obtenidos por los equipos FID y GC-MS, fue posible identificar un intervalo de tiempo y una lista de posibles candidatos responsables de algunos aromas percibidos.

Los perfiles olfatométricos fueron realizados para cada duplicado, y a partir de éstos se construyó un perfil olfatométrico con los aromas comunes para cada replicado (ver anexo L). Inicialmente se intentó realizar una comparación entre los aromagramas de cada replicado utilizando todos los compuestos aromáticos percibidos, pero dado que la señal olfatométrica era altamente ruidosa, se determinó utilizar sólo los compuestos aromáticos cuyo valor de FM era mayor a 50% (ver Materiales y Métodos). El anexo L contiene todos los aromagramas construidos para cada réplica, tanto con todos sus compuestos aromáticos como con sólo aquéllos con FM mayor a 50%. Luego de la construcción de aromagramas promedio para cada cepa, se descartaron los compuestos aromáticos de cada aromagrama promedio que eran comunes con los compuestos activos presentes en el aromagrama del mosto MS300. Así, por ejemplo los descriptores como caramelizado eran principalmente influencia del mosto MS300. Finalmente, en los casos posibles, se identificó los compuestos químicos responsables de los aromas en cada aromagrama. En los aromas identificados, se observó que algunos presentaban OAV bajos (menores que 0,1), los cuáles fueron también descartados. Con esta última aproximación, se obtuvieron los aromagramas donde mejor se observaron diferencias entre ellos (Figura 4-13 y 4-14). Considerando lo anterior, y a partir de los aromagramas obtenidos para cada cepa se compararon los distintos perfiles olfatométricos.

Figura 4-13: Aromagramas generado al descartar aromas comunes al medio MS300 y compuestos aromáticos con valores de OAV bajos de cepas comerciales vónicas de *S. cerevisiae* fermentadas a 28° C. Anchos de barras representan diferencia entre el primer tiempo que una persona y el último tiempo en que otra persona del panel dijo el mismo descriptor.

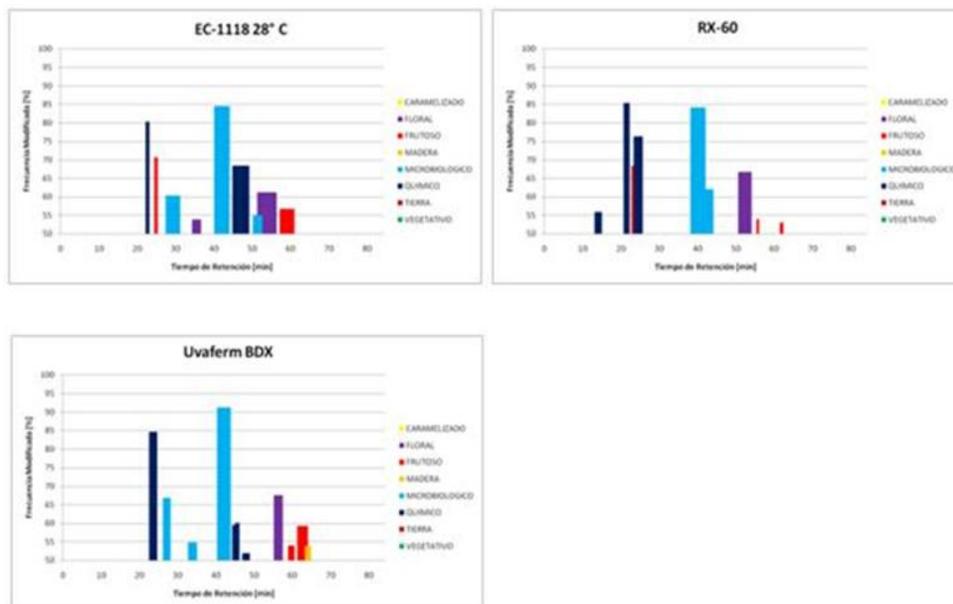
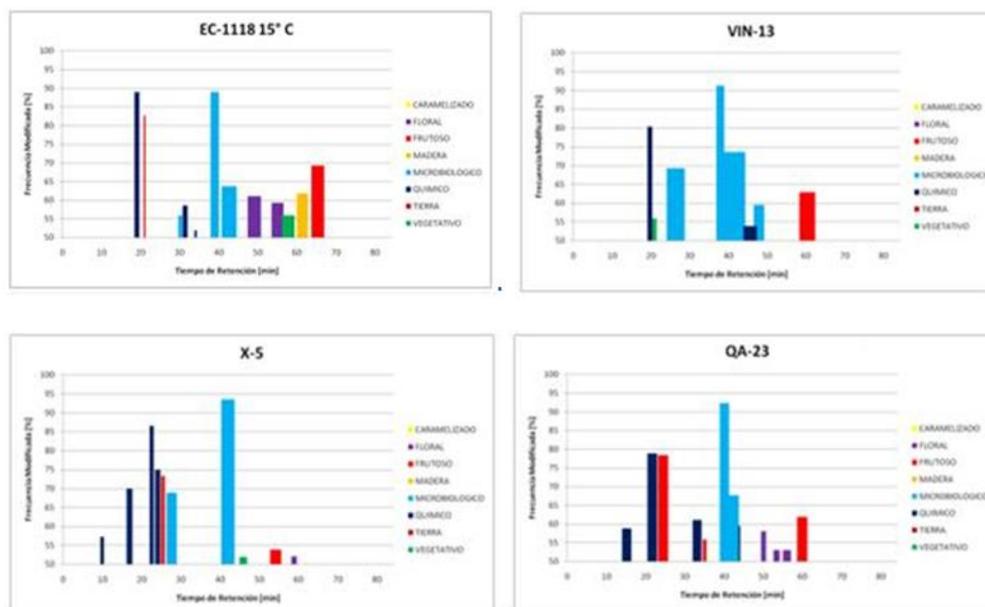


Figura 4-14: Aromagramas generado al descartar aromas comunes al medio MS300 y compuestos aromáticos con valores de OAV bajos de cepas comerciales vónicas de *S. cerevisiae* fermentadas a 15° C.



En una primera instancia, se ordenaron los aromas de acuerdo a su valor de FM, mostrándose que existen compuestos odorantes que se mantienen en las primeras posiciones en el ranking de aromas, aunque el orden de éstos varía entre cepa y cepa. Esto se observó especialmente en los primeros 3 compuestos odorantes con

mayor valor de FM, los cuales eran comunes para todas las fermentaciones (Tabla 4-9). Después de los primeros tres, el ranking de aromas fue diferente para cada cepa. Además, los valores de FM dentro de una misma zona odorante fueron distintos entre cepas. Finalmente, el ranking aromático de acuerdo al valor de FM de cada cepa fue graficado para comparar las distintas configuraciones aromáticas que cada cepa entrega al fermentar (Figura 4-15). En los rankings aromáticos, además de observarse las distintas configuraciones aromáticas de que entrega cada cepa, y utilizando los datos químicos obtenidos previamente, es posible notar que existen proporciones entre las concentraciones de algunos compuestos que están dentro del grupo de aromas con principal impacto olfativo. Estas proporciones pueden servir como indicadores de las características aromáticas que entrega la levadura.

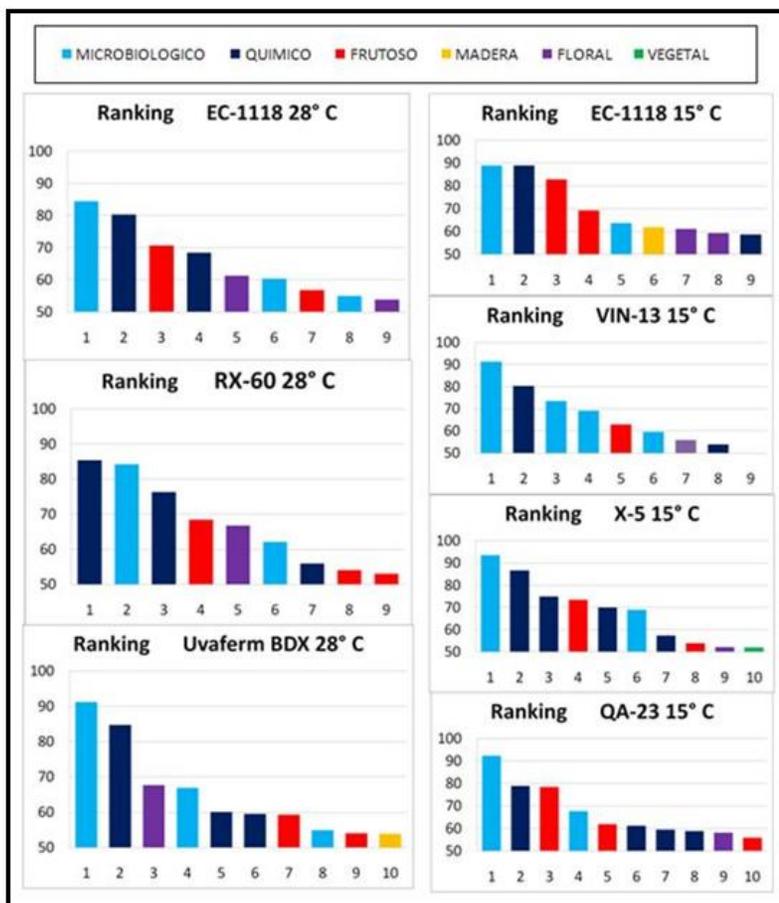
Tabla 4-9: Posición de los tres compuestos aromáticos con mayor FM y comunes en los aromagramas promedios de cada cepa obtenidos inicialmente, previo al descarte de aromas con OAV bajos para cada cepa.

| Tiempo Promedio | Descriptor (Compuesto Químico) | Posición en F1 | Posición en F2 | Posición en F3 | Posición en F4 | Posición en F5 | Posición en F6 | Posición en F7 | MS300 |
|-----------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| 30,48 | Químico, Acético (Acido Acético) | 1 | 2-4* | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | N.P. |
| 40,02 | Microbiológico, Butírico (Acido Butírico) | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1 | N.P. |
| 21,42 | Químico, Colas (Alcohol Isoamilico) | 3 | 2-4* | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | N.P. |

N.P.: No presente.

* Aroma se posee mismo valor de FM que 2 compuestos más, comparten el 2^{da}, 3^{era} y 4^a posición.

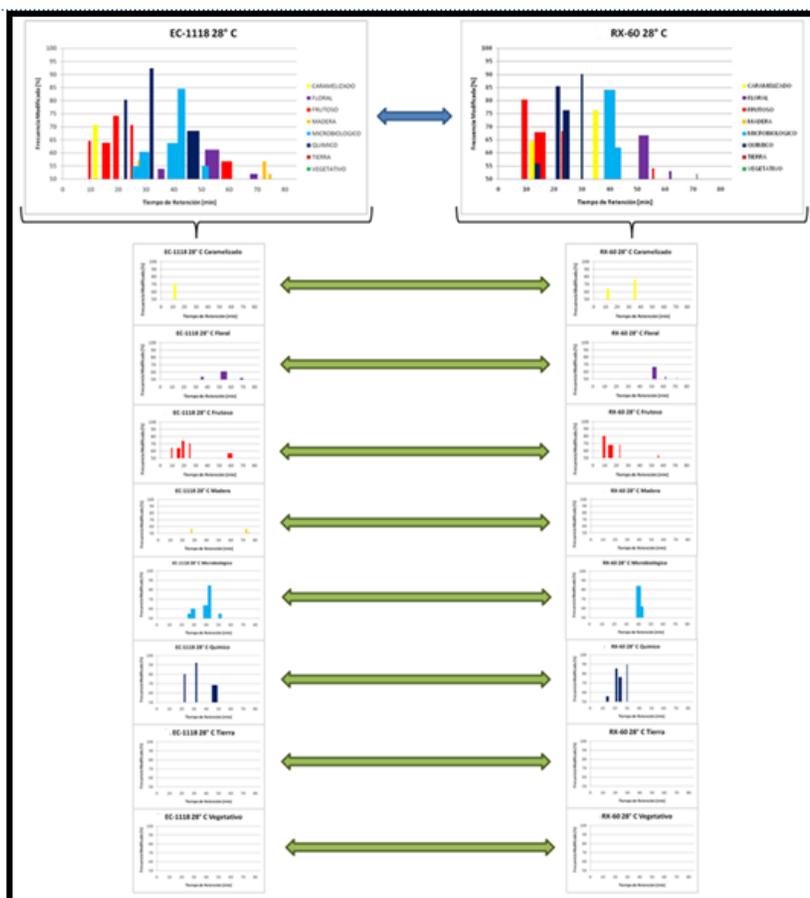
Figura 4-15: Comparación entre Ranking de Compuestos Aromáticos, de acuerdo a valor de FM, de los aromas presentes en los aromagramas de las distintas cepas utilizadas. No considera compuestos aromáticos comunes con medio MS300 y con bajo OAV.



En una segunda etapa, los aromagramas obtenidos fueron comparados gráficamente para evaluar la factibilidad de emplearlos como huellas dactilares de la levadura utilizada para realizar la fermentación. Con este fin, cada aromagrama fue separado en 8 categorías generales que fueron usadas como descriptores comunes para los usados por el panel. Con esto fue posible determinar con más fácilmente que en la comparación anterior, las diferencias existentes entre cada aromagrama por categoría de aromas y verificar que los valores de FM para un mismo compuesto aromático eran distintos entre cepas. En particular, en los aromagramas obtenidos al eliminar los compuestos aromáticos correspondientes al medio MS300 y los aromas con bajos OAV, al separarlos en categorías aromáticas se identificaron los compuestos aromáticos comunes y aquellos específicos para una cepa. Los aromas comunes identificados refuerzan la propuesta de la existencia de una "matriz vinosa" (Ferreira et al., 2008) responsable del aroma general del vino. Los aromas específicos de una cepa son posiblemente compuestos presentes en concentraciones distintas y mayores que en las otras cepas, los que pueden romper la matriz vinosa e influenciar en la percepción del vino. Los aromas comunes encontrados son: etil propanoato*, acetato de isoamilo*, alcohol isoamílico, ácido acético*, ácido butírico, y fenil etanol (* pueden no ser considerados por su bajo OAV). Algunos ejemplos de compuestos específicos son: etil hexanoato a 28° C (EC-1118 y RX-60), etil octanoato (QA-23), isobutanol (RX-60, X-5, y QA-23), y ácido isovalérico (RX-60,

EC-1118 15° C, VIN-13 y QA-23). Además, hay aromas cuyo compuesto responsable no fue posible identificar y que son específicos para algunas cepas, en especial ciertas notas vegetales (más detalles en anexo L). Además, dado el procesamiento de los datos realizado, se obtuvo que en algunas ocasiones un aroma era clasificado en una categoría para una cepa, mientras que en otra cepa era clasificado en otra, fenómeno también observado al realizar el aromagrama común para cada cepa. Esto ocurrió específicamente con aromas que tenían un valor de FM bajo, lo que implicaba que el aroma debía tener una baja intensidad o una baja frecuencia de reconocimiento en el panel. Como el compuesto odorante era clasificado de acuerdo a la mayoría, entonces ocurría lo descrito. Este fenómeno puede ser explicado tanto por su concentración como por el compuesto per se, ya que dependiendo de la concentración del compuesto y de la sensibilidad que cada persona tiene respecto a éste, es la percepción y el descriptor que explicita la persona, lo genera una alta variabilidad al usar sólo consenso para clasificarlo. Otra posible explicación es que algunos compuestos aromáticos percibidos pueden representar dos o más compuestos químicos que se encuentran coeluyendo, y que estas diferencias de tipo de aroma percibido se deban a diferencias en las proporciones de los compuestos que coeluyen. Se ha demostrado que proporciones distintas de concentraciones de mezclas binarias de aromas generan percepciones distintas (Zou y Buck, 2006).

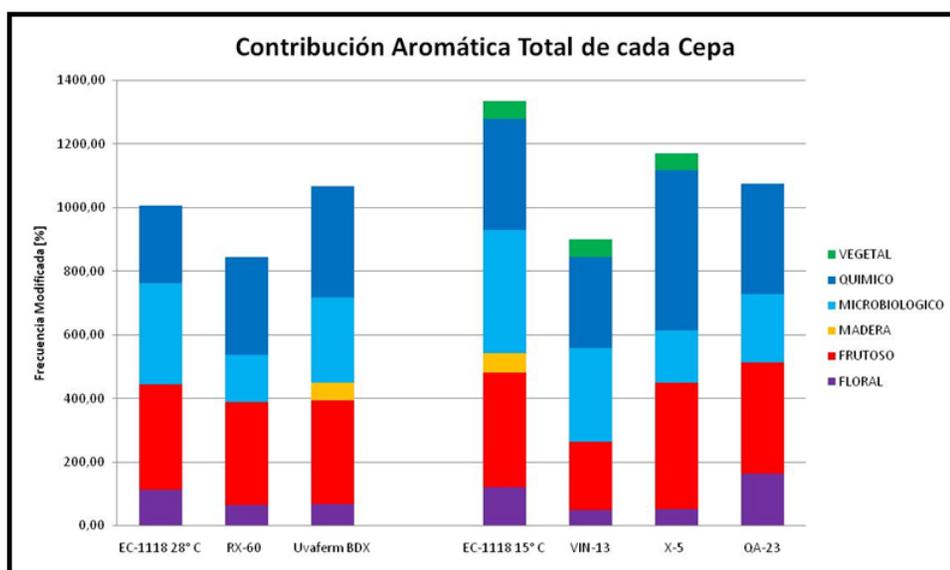
Figura 4-16: Ejemplo de comparación de aromagramas obtenidos para la cepa EC-1118 a 28° C y la cepa RX-60.



Finalmente, la tercera etapa que se utilizó para analizar los datos olfatométricos fue la suma de los valores de FM obtenidos a través del perfil olfatométrico de cada cepa de levadura, sin considerar los aromas comunes presentes en el medio MS300. Así, se ordenaron los valores obtenidos de acuerdo a su categoría a la que pertenecían; y para cada categoría se sumaron los valores de FM (Figura 4-17). Además, se calcularon los porcentajes de cada categoría respecto a la suma total de valores de FM (Figura 4-18). De esta forma se obtuvo lo que denominamos la "Contribución Aromática Relativa" (el porcentaje obtenido para cada categoría) y la "Contribución Aromática Total" (el total obtenido) de cada cepa de levadura. Nuevamente, utilizando esta clasificación, se observó que entre algunas cepas existen diferencias, pero estas diferencias no son extensivas para todas. A partir de la Contribución Aromática Total, es posible observar que en algunas de las cepas se obtuvieron un número mayor de compuestos odorantes que en otras; por ejemplo, se presentan las cepas EC-1118 a 28° C, Uvaferm BDX, EC-1118 a 15° C, X-5 y QA-23 con valores mayores totales que las cepas RX-60, y VIN-13. Dado que todos los caldos fueron extraídos y concentrados de una manera similar, se puede concluir que en complejidad aromática, primero existe un efecto de temperatura, que puede observarse en los valores mayores de FM para EC-1118 a 15° C que a 28° C; y segundo, que entre cepas existen diferencias, tanto por presencia o ausencia de ciertos tipos de aromas, como vegetativo entre las cepas EC-1118 a 15° C, VIN-13,

y X-5 con la cepa QA-23, o como en madera con las cepas EC-1118 a 28° C, y Uvaferm BDX, con la cepa RX-60, y las cepas EC-1118 a 15° C, con las cepas VIN-13, X-5, y QA-23.

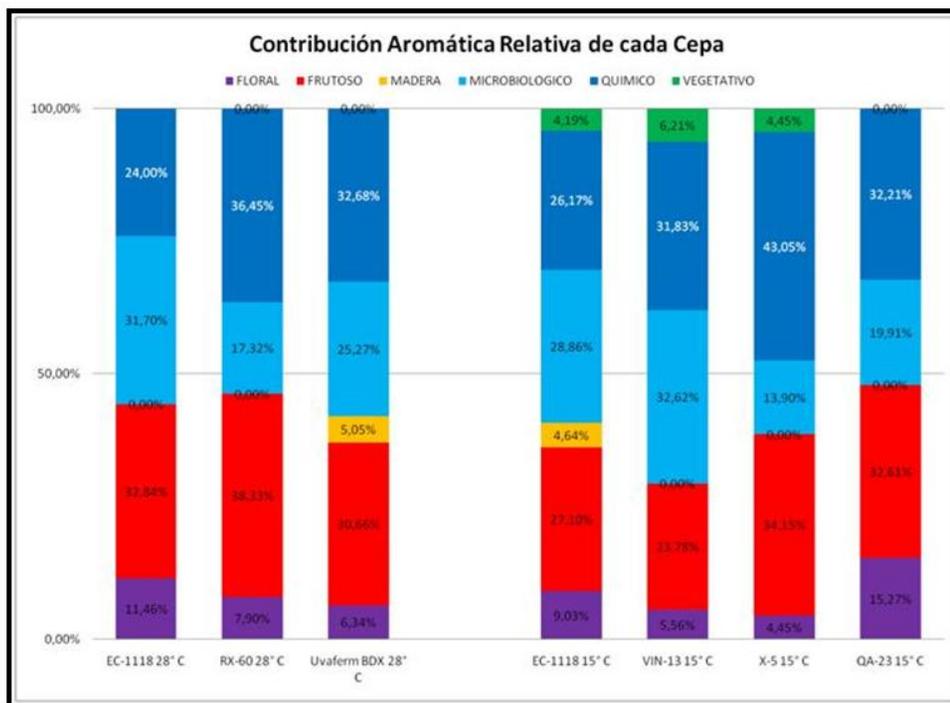
Figura 4-17: Contribución Aromática Total de cada cepa utilizada, considera la suma de los valores de FM para los aromas presentes en los aromagramas de cada cepa de acuerdo a las categorías aromáticas de la Rueda del Vino.



Las proporciones entre aromas cambian en todas las cepas (Figura 4-17). Nuevamente, las combinaciones totales de aromas son distintas para la mayoría de las cepas, tal como se observa al comparar los rankings de aromas de acuerdo a su FM. Así, la complejidad de los caldos cambia, pero esta vez de acuerdo a la contribución relativa de las categorías de aromas entregadas por cada cepa, produciéndose combinaciones que pueden explicar las diferencias existentes. En el caso de las cepas crecidas a 28° C, se observa que RX-60, a pesar de tener una mayor cantidad de aromas químicos, presenta la mayor proporción de aromas positivos como frutosos y florales; en cambio, las cepas EC-1118 a 28° C y Uvaferm BDX presentan valores similares. Para las cepas crecidas a 15° C, las proporciones de aromas positivos son similares, pero existen diferencias en aromas químicos y madera, donde X-5 presenta la mayor proporción de aromas químicos y la menor proporción de aromas microbiológicos.

Las proporciones distintas en las razones entre los aromas frutales y microbiológicos podrían ser un indicador importante del grado de expresión aromática. Se observó que la proporción existente entre los porcentajes de contribución en los aromas frutosos y microbiológicos en las cepas que el panel de evaluación sensorial describió como frutales (X-5 y RX-60) es cercana o superior a dos; mientras que las cepas descritas como poco frutosas, con notas químicas y microbiológicas (EC-1118 a 28° C y 15° C, Uvaferm BDX, VIN-13, y QA-23) poseen una razón cercana a 1.

Figura 4-18: Contribución Aromática Relativa de cada cepa utilizada, considera el porcentaje respecto de la Contribución Aromática Total de cada categoría de la suma de los valores de FM para los aromas presentes en los aromagramas de cada cepa.



En resumen, los datos olfatométricos permitieron observar que la descomposición de la contribución aromática realizada por cada levadura en el mosto MS300 presenta tanto compuestos comunes como distintos al comparar entre los aromagramas obtenidos para cada cepa. Se observan relaciones existentes entre los aromas de impacto aromático, tanto en el orden de acuerdo a su valor de FM (Ranking de aromas), como en proporciones entre compuestos específicos o categorías de aromas. Se comparan estas relaciones con el fenómeno observado en la música, donde la teoría musical considera intervalos, distancias entre dos notas musicales, como consonantes o disonantes de acuerdo al tamaño del intervalo. En particular, se señala la relación existente entre los aromas frutuosos y los aromas microbiológicos con la percepción de descriptores frutuosos en evaluación sensorial (X5 y RX-60).

5. Conclusiones

El objetivo inicial de este trabajo fue comparar los aromas producidos por distintas cepas de levaduras comerciales vínicas para identificar compuestos aromáticos significativos en la diferenciación de cepas, para posteriormente atacar el problema por medio de la modelación de la producción de aromas fermentativos significativos. El interés en la componente aromática de los vinos radica en su diferenciación y su uso como herramienta de control. El manejo del aroma de un vino es una aspiración albergada por los productores, dado que los resultados del proceso son difíciles de predecir con el conocimiento que se tiene actualmente.

Los resultados obtenidos de la caracterización de las levaduras señalan que existen diferencias en algunos parámetros fermentativos como el rendimiento de biomasa-nitrógeno, o los tiempos necesarios para alcanzar sequedad. Sin embargo, respecto al desempeño de una cepa en la conversión del azúcar a etanol no se observaron diferencias significativas, por lo que en cuanto a esta función la selección de la levadura es irrelevante. Esto puede resultar del extensivo proceso de selección a la que han sido sometidas estas levaduras comerciales, donde uno de los principales criterios de selección es la capacidad fermentativa de la cepa, descartándose aquellas levaduras que no cumplan con un rendimiento mínimo (Torija, 2002). Esto refuerza la necesidad de encontrar o generar levaduras hipoproductoras de etanol, que posean rendimientos significativamente menores a las existentes en el mercado actual y que puedan ser utilizadas para producir vinos de menor contenido alcohólico. Además, dada la poca variabilidad de los resultados fermentativos se confirman los beneficios en la estandarización de resultados al utilizar una cepa comercial vínica.

El análisis sensorial discriminante mostró que a 15° C las diferencias en la síntesis de aromas fermentativos no fueron percibidas entre las cepas productoras de éstos, ni entre cepas caracterizadas como reveladoras de aromas varietales. Por el contrario, si fue posible diferenciar entre cepas productoras de aromas fermentativos y cepas reveladoras. Además, las diferencias percibidas aumentan en fermentaciones a 28° C, donde todos los productos fermentativos fueron percibidos como diferentes. Con esto, es posible plantear que la contribución aromática de una cepa al fermentar será percibida distinta con respecto a otra cepa, dependiendo del balance que ésta tenga en su aporte aromático fermentativo y revelador-varietal, balance que se ve afectado por la temperatura de fermentación. Así, se observa que si una cepa posee una capacidad reveladora incrementada, considerando únicamente los aromas fermentativos, entonces produce caldos que son percibidos distintos a los caldos generados por cepas que poseen una capacidad reveladora "normal".

Por medio de la descripción sensorial de los caldos fermentados con distintas cepas se concluye que existen diferencias significativas entre ciertas cepas en descriptores específicos, las cuáles pueden ser responsables de la diferenciación entre ellas,

aunque estas diferencias no son extensivas para todas. Además, el número de descriptores significativamente diferentes no asegura que los fermentados puedan ser diferenciados. Se observó que las diferencias existentes entre los perfiles de ciertas cepas no son suficientemente fuertes para provocar una diferenciación de los fermentados producidos, a pesar de que estos sean descritos de forma distinta. Nuevamente se observa el hecho que las diferencias entre cepas se acentúan en las fermentaciones a 28° C

Por su parte, los análisis químicos permitieron determinar compuestos específicos en los cuáles se observaron diferencias significativas en la concentración final presente en los caldos producidos por cepas distintas. Así, se pudo explicar algunos aspectos distintos obtenidos en evaluación sensorial, aunque también se observó que algunas diferencias químicas que no eran significativas sensorialmente.

Los resultados olfatométricos entregaron importante información cualitativa, respecto de que las cepas producen una configuración distinta de aromas, y que las relaciones entre compuestos aromáticos de alto impacto varían dependiendo de la cepa. Si bien se observa que los tres aromas más importantes son los mismos para cada cepa, es interesante observar que las diferencias ocurridas en los aromas posteriores a los tres de mayor FM pueden generar que los fermentados sean percibidos como distintos. Un punto interesante de estos resultados fue observar que la deconstrucción aromática de los fermentados muestra que los aromas más importantes fueron negativos y poco agradables, como vinagre (ácido acético), queso (ácido butírico), y alcohol irritante (alcohol isoamílico). Sin embargo, la integración de estos aromas analizado por la evaluación sensorial de las muestras, señaló que los aromas de mayor FM no presentan el primer impacto en las muestras. Esto rinde cuenta de múltiples interacciones que ocurren entre los compuestos químicos en el mosto, las cuales influyen en la composición del espacio de cabeza, y a las cuáles se suman las interacciones de los múltiples compuestos volátiles del espacio de cabeza con nuestros receptores olfativos.

A manera de conclusión final, se puede afirmar que la hipótesis planteada inicialmente en este trabajo es cierta, pero el grado de certeza depende estrictamente del par de cepas utilizadas en la comparación. En efecto, es cierto que existen algunas cepas que permiten entregar una contribución aromática que es percibida como sensorialmente distinta, y esto puede ser explicado por la existencia de diferencias significativas en las concentraciones químicas existentes entre ciertos compuestos químicos (con concentraciones mayores o menores a su umbral olfativo) o grupos de compuestos químicos que contribuyen aromáticamente y pueden romper la "matriz vinosa" (Ferreira et al., 2008). Pero la existencia de estas diferencias no asegura que las contribuciones aromáticas entre una cepa y otra sean distintas. En este trabajo, se observó que a pesar de encontrarse diferencias significativas en concentración y tener perfiles aromáticos distintos, las diferencias entre las contribuciones a la componente aromática del vino en algunos pares de cepas no son percibidas. En este sentido, planteamos como propuesta la importancia de la configuración aromática y de las interrelaciones entre los aromas presentes (proporciones entre compuestos y entre notas aromáticas) respecto a su contribución aromática. En otras palabras, las diferencias en las relaciones existentes entre los aromas de impacto olfativo influyen en la discriminación entre vinos producidos por distintas cepas. Luego, es posible imaginar que en la

componente aromática de un vino, además de existir notas aromáticas principales, el orden de ellas y las relaciones entre ellas, definen el aroma percibido y cuán agradable es.

Finalmente, se destaca el efecto de la temperatura para diferenciar entre las contribuciones aromáticas de cada cepa, en especial considerando que trabajos anteriores señalaban que las fermentaciones realizadas a baja temperatura eran más aromáticas que las producidas a alta temperatura. Aquí se muestra que las diferencias en la componente aromática percibidas por medio de análisis sensorial de los fermentados a 28° C son mayores que a 15° C, a pesar de que la contribución aromática total es mayor a baja temperatura. Luego, se puede concluir que la decisión sobre qué cepa usar es de mayor importancia en fermentaciones de mostos tintos que de mostos blancos, dado que en los primeros se perciben mejor las diferencias, aunque se debe señalar que no han sido extensivamente evaluadas diferencias entre cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* respecto a la revelación de aromas varietales (Ugliano et al., 2006).

Para terminar, se debe tener cuidado con extrapolar las conclusiones obtenidas en este trabajo a fermentaciones en mosto real, dado que es necesaria una etapa de validación de estos resultados. Se debe recordar que en este trabajo sólo fue abordada la contribución de aromas fermentativos sintetizados por la levadura en un mosto sintético, separándola de la contribución de aromas varietales revelados.

6. Trabajo Futuro

Cuatro temas son considerados como centrales para avanzar hacia un mayor entendimiento sobre cómo las levaduras vínicas afectan el aroma de un vino:

El primero es la reconstrucción aromática a partir de los datos obtenidos en este trabajo para la verificación de la influencia de las relaciones existentes entre categorías de aromas o compuestos aromáticos específicos en la diferenciación de vinos de una misma categoría. Se propone construir soluciones modelo de vino (11% v/v solución etanol-agua, 7 g/L de glicerol, 5 g/L de ácido tartárico) y adicionar concentraciones de los compuestos etil hexanoato y ácido butírico (o ácido isovalérico) similares a las obtenidas de en los vinos elaborados por las cepas RX-60 y X-5, y EC-1118 a ambas temperaturas.

El tercer tema es el estudio cambios en los aromas fermentativos en un vino, con el objetivo de determinar si el aroma oxidado percibido en los vinos que fueron almacenados por mayor tiempo (EC-1118 a 28° C y Uvaferm BDX) no es influencia de aquello.

El segundo de los temas, es la continuación de este trabajo de caracterización, pero enfocado hacia las concentraciones químicas presentes en el espacio de cabeza, para luego validar los resultados obtenidos, tanto en concentración líquida como gaseosa en mosto real. Esto es necesario para complementar los datos obtenidos en esta tesis.

El cuarto de ellos, es la modelación del efecto producido por la levadura. Para esto, es necesario tener un mayor conocimiento sobre cómo se desarrolla cada compuesto a lo largo de la fermentación alcohólica, cuáles son las interacciones que éste tiene con respecto a otros compuestos en el medio líquido, cómo afectan estas interacciones su equilibrio en el espacio de cabeza, y que interacciones presenta el compuesto, en presencia de otros, frente a nuestros receptores olfativos y nuestra percepción final. La división de las interacciones que ocurren en el fenómeno de percibir un aroma producido o liberado por la acción de la levadura es necesaria para comprender el proceso y poder modelarlo.

BIBLIOGRAFIA

Alves, R. F., Nascimento, A. M. D., y Nogueira, J. M. F. (2005). Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Analytica Chimica Acta*, 546(1), 11-21.

- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., y Carnacini, A. (1999). Yeast influence on volatile composition of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1139-1144.
- Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Chabanet, C., Langlois, D., Nicklaus, S., y Etievant, P. (2005). Perceptual Interactions in Odour Mixtures: Odour Quality in Binary Mixtures of Woody and Fruity Wine Odorants. *Chemical Senses*, 30(3), 209-217.
- Aznar, M., Lopez, R., Cacho, J. F., y Ferreira, V. (2001). Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2924-2929.
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., y Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 11(10), 737-747
- Barnett, J. A. (2003). Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology*, 149(3), 557-567.
- Bartle, K. D., y Myers, P. (2002). History of gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 21(9-10), 547-557
- Belancic, A., y Agosin, E. (2007). Methoxypyrazines in Grapes and Wines of *Vitis vinifera* cv. Carmenere. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(4), 462.
- Berdagué, J. L., Tournayre, P., y Cambou, S. (2007). Novel multi-gas chromatography-olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds. *Journal of Chromatography A*, 1146(1), 85-92
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Pretorius, I. S., y Thevelein, J. M. (2008). Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(5), 1083-1091.
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., y Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 683-689.

- Bisson, L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107-119.
- Bisson, L. F., Waterhouse, A. L., Ebeler, S. E., Walker, M. A., y Lapsley, J. T. (2002). The present and future of the international wine industry. *Nature*, 418, 696-699.
- Borneman, A. R., Chambers, P. J., y Pretorius, I. S. (2007). Yeast systems biology: modelling the winemaker's art. *Trends in Biotechnology*, 25(8), 349-355.
- Boulton, R. (1995). Red Wines. In Lea, A. G. H. y Piggott, J. R. (Eds.), *Fermented Beverage Production* (pp. 107-137). New York, USA: Blackie Academic y Professional
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., y Kunkee, R. E. (1999). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. y Kunkee, R. E. (Eds.), *Principles and Practices of Winemaking* (pp. 102–181). New York, USA.: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Branduardi, P., Smeraldi, C., y Porro, D. (2008). Metabolically engineered yeasts: 'potential' industrial applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(1), 31-40.
- Bravdo, B., Hepner, Y., Loinger, C., Cohen, S., y Tabacman, H. (1985). Effect of Crop Level and Crop Load on Growth, Yield, Must and Wine Composition, and Quality of Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(2), 125-131.
- Brossard, C., Rousseau, F., y Dumont, J.-P. (2007). Perceptual Interactions between Characteristic Notes Smelled above Aqueous Solutions of Odorant Mixtures. *Chemical Senses*, 32(4), 319-327
- Buettner, A. (2004). Investigation of potent odorants and afterodor development in two Chardonnay wines using the buccal odor screening system (BOSS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2339-2346.
- Buettner, A., Otto, S., Beer, A., Mestres, M., Schieberle, P., y Hummel, T. (2008). Dynamics of retronasal aroma perception during consumption: Cross-linking on-line breath analysis with medico-analytical tools to elucidate a complex process. *Food Chemistry*, 108(4), 1234-1246

- Bult, J. H. F., Schifferstein, H. N. J., Roozen, J. P., Voragen, A. G. J., y Kroeze, J. H. A. (2001). The Influence of Olfactory Concept on the Probability of Detecting Sub- and Peri-threshold Components in a Mixture of Odorants. *Chemical Senses*, 26(5), 459-469
- Cabredo-Pinillos, S., Cedrón-Fernández, T., González-Briongos, M., Puente-Pascual, L., y Sáenz-Barrio, C. (2006). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimisation of the method. *Talanta*, 69(5), 1123-1129.
- Campo, E., Cacho, J., y Ferreira, V. (2006). Multidimensional chromatographic approach applied to the identification of novel aroma compounds in wine : Identification of ethyl cyclohexanoate, ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate and ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate. *Journal of Chromatography A*, 1137(2), 223-230
- Campo, E., Cacho, J., y Ferreira, V. (2007). Solid phase extraction, multidimensional gas chromatography mass spectrometry determination of four novel aroma powerful ethyl esters : Assessment of their occurrence and importance in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 1140(1-2), 180-188
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., y Cacho, J. (2005). Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5682-5690.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Marqués, J. C., y Cacho, J. (2006). Quantitative gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 180-187.
- Campo, E., Ferreira, V., López, R., Escudero, A., y Cacho, J. (2006). Identification of three novel compounds in wine by means of a laboratory-constructed multidimensional gas chromatographic system. *Journal of Chromatography A*, 1122(1-2), 202-208
- Cavalieri, McGovern, Hartl, Mortimer, y Polsinelli. (2003). Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. *Journal of Molecular Evolution*, 57(0), S226-S232
- Caven-Quantrill, D. J., y Buglass, A. J. (2006). Comparison of micro-scale simultaneous distillation-extraction and stir bar sorptive extraction for the determination of volatile organic constituents of grape juice. *Journal of Chromatography A*, 1117(2), 121-131.

- Cebollero, E., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., y Gonzalez, R. (2007). Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? *Biotechnology Letters*, 29(2), 191-200.
- Coleman, M. C., Fish, R., y Block, D. E. (2007). Temperature-Dependent Kinetic Model for Nitrogen-Limited Wine Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5875-5884
- Chapman, D. M., Matthews, M. A., y Guinard, J. X. (2004). Sensory Attributes of Cabernet Sauvignon Wines Made from Vines with Different Crop Yields. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(4), 325-334.
- de Roos, K. B. (2006). Modelling aroma interactions in food matrices. In Voilley, A. y Etiévant, P. (Eds.), *Flavour in Food* (pp. 229-259). Boca Raton, USA.: CRC Press.
- Debonneville, C., Orsier, B., Flament, I., y Chaintreau, A. (1999). Improved Hardware and Software for Quick Gas Chromatography-Olfactometry Using CHARM and GC-“SNIF” Analysis. *Food Chemistry*, 47, 1673-1680.
- Devatine, A., Chiciuc, I., Poupot, C., y Mietton-Peuchot, M. (2007). Micro-oxygenation of wine in presence of dissolved carbon dioxide. *Chemical Engineering Science*, 62(17), 4579-4588
- Dravnieks, A. (1985). *Atlas of Odor Character Profiles*. American Society for Testing & Materials (ASTM) International.
- du Toit, W. J., Marais, J., Pretorius, I. S., y du Toit, M. (2006). Oxygen in Must and Wine: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 76-94.
- Eaton, D. K., Nielsen, L. T., y Wright, D. W. (2006). An integrated MDGC-MS-olfactometry approach to aroma and flavor analysis. In Marsili, R. (Ed.), *Sensory-Directed Flavor Analysis* (pp. 81-110): CRC Press.
- Eden, A., Van Nederveelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N., y Debourg, A. (2001). Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3), 296-300

- Engel, W., Bahr, W., y Schieberle, P. (1999). Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *European Food Research and Technology*, 209(3), 237-241
- Erasmus, D. J., Cliff, M., y van Vuuren, H. J. J. (2004). Impact of Yeast Strain on the Production of Acetic Acid, Glycerol, and the Sensory Attributes of Icewine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(4), 371-378.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., y Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4501-4510.
- Etiévant, P. X. (1991). Wine. In Maarse, H. (Ed.), *Volatile Compounds in Food and Beverages* (pp. 483–546). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Etiévant, P. X., Callement, G., Langlois, D., Issanchou, S., y Coquibus, N. (1999). Odor Intensity Evaluation in Gas Chromatography-Olfactometry by Finger Span Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1673-1680
- Ewart, A. (2003). White Wines. In Lea, A. G. H. y Piggott, J. R. (Eds.), *Fermented Beverage Production* (pp. 89-106). New York, USA: Blackie Academic y Professional.
- Fernández-Espinar, M. T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., y Querol, A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1-2), 1-10.
- Ferreira, V., Escudero, A., y Cacho, J. (2008). The chemical foundations of wine aroma - a role game aimed at wine quality, personality, and varietal expression. *Proceedings - Thirteenth Australian Wine Industry Technical Conference*, 142-150.
- Ferreira, V., Lopez, R., y Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), 1659-1667.
- Ferreira, V., Pet'ka, J., Aznar, M., y Cacho, J. (2003). Quantitative gas chromatography-olfactometry. Analytical characteristics of a panel of judges using a simple quantitative

- scale as gas chromatography detector. *Journal of Chromatography A*, 1002(1-2), 169-178.
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, 413(6852), 211-218.
- Firestein, S. (2005). A Nobel Nose: The 2004 Nobel Prize in Physiology and Medicine. *Neuron*, 45(3), 333-338
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22.
- Fornairon-Bonnefond, C., Aguera, E., Deytieux, C., Sablayrolles, J. M., y Salmon, J. M. (2003). Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(5), 496-503.
- Fornairon-Bonnefond, C., y Salmon, J. M. (2003). Impact of Oxygen Consumption by Yeast Lees on the Autolysis Phenomenon during Simulation of Wine Aging on Lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2584-2590.
- Frijters, J. E. R. (1978). A critical analysis of the odour unit number and its use. *Chemical Senses*, 3(2), 227-233
- Fuller, G. H., Steltenkamp, R., y Tisserand, G. A. (1964). The Gas Chromatograph with Human Sensor: Perfumer Model. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 116, 711-724.
- Gómez-Míguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., y Heredia, F. J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100(4), 1464-1473.
- Grabenhorst, F., Rolls, E. T., Margot, C., da Silva, M. A. A. P., y Velazco, M. I. (2007). How Pleasant and Unpleasant Stimuli Combine in Different Brain Regions: Odor Mixtures. *The Journal of Neurosciences*, 27(49), 13532-13540.
- Grosch, W., Kersch, R., Kubickova, J., y Jagella, T. (2001). Aroma extract dilution analysis versus aroma extract concentration analysis. *Gas chromatography-olfactometry: the state of the art. ACS Symposium Series*, 138-147.

- Guadagni, D. G., Buttery, R. G., y Harris, J. (1966). Odour intensities of hop oil components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17(3), 142-144
- Guadagni, D. G., Buttery, R. G., y Okano, S. (1963). Odor thresholds of some organic compounds associated with food flavors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14(161).
- Gürbüz, O., Rouseff, J. M., y Rouseff, R. L. (2006). Comparison of Aroma Volatiles in Commercial Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Gas Chromatography-Olfactometry and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3990-3996
- Hayasaka, Y., MacNamara, K., Baldock, G. A., Taylor, R. L., y Pollnitz, A. P. (2003). Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(7), 948-955
- Hennion, M.-C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856(1-2), 3-54
- Hernández-Orte, P., Cacho, J. F., y Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2891-2899.
- Hernández-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., y Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry*, 107(3), 1064-1077.
- Hernández, A. (2000). *Introducción al vino de Chile* (2ª Edición ed. Vol. 100). Santiago, Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Hernández, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martín-Álvarez, P. J., y Moreno-Arribas, M. V. (2006). Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 116-125.
- Hernanz Vila, D., Heredia Mira, F. J., Beltran Lucena, R., y Fernández Recamales, M. A. (1999). Optimization of an extraction method of aroma compounds in white wine using ultrasound. *Talanta*, 50(2), 413-421.

- Howard, K. L., Mike, J. H., y Riesen, R. (2005). Validation of a Solid-Phase Microextraction Method for Headspace Analysis of Wine Aroma Components. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(1), 37-45.
- Husnik, J. I., Delaquis, P. J., Cliff, M. A., y van Vuuren, H. J. J. (2007). Functional Analyses of the Malolactic Wine Yeast ML01. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 42-52.
- Ingledeew, W. M., Magnus, C. A., y Sosulski, F. W. (1987). Influence of Oxygen on Proline Utilization During the Wine Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(3), 246-248.
- Jackson, D. I., y Lombard, P. B. (1993). Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality-A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 409-430.
- James, A. T., y Martin, A. J. P. (1952). Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *The Biochemical Journal*, 50(5), 679-690.
- Júnior, D. S., Krug, F. J., Pereira, M. G., y Korn, M. (2006). Currents on Ultrasound-Assisted Extraction for Sample Preparation and Spectroscopic Analytes Determination. *Applied Spectroscopy Reviews*, 41(3), 305-321.
- Jurado, J. M., Ballesteros, O., Alcázar, A., Pablos, F., Martín, M. J., Vilchez, J. L., et al. (2008). Differentiation of certified brands of origins of Spanish white wines by HS-SPME-GC and chemometrics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(3), 961-970.
- Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H., y Touhara, K. (2001). Molecular Bases of Odor Discrimination: Reconstitution of Olfactory Receptors that Recognize Overlapping Sets of Odorants. *The Journal of Neurosciences*, 21(16), 6018-6025.
- Kamadia, V. V., Yoon, Y., Schilling, M. W., y Marshall, D. L. (2006). Relationships between Odorant Concentration and Aroma Intensity. *Journal of Food Sciences*, 71(3), S193-197.

- Kelly, M., y Wollan, D. (2005). Micro-oxygenation of Wine in Barrels. *The Australian y New Zealand Grapegrower y Winemaker*, 6, 35-40.
- Killian, E., y Ough, C. S. (1979). Fermentation Esters -- Formation and Retention as Affected by Fermentation Temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(4), 301-305
- Kinzer, G., y Schreier, P. (1980). Influence of Different Pressing Systems on the Composition of Volatile Constituents in Unfermented Grape Musts and Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31(1), 7-13
- Kitson, F. G., McEwen, C. N., y Larsen, B. S. (1996). *Gas chromatography and mass spectrometry*: Academic Press San Diego.
- Korenovská, M., y Suhaj, M. (2005). Identification of some Slovakian and European wines origin by the use of factor analysis of elemental data. *European Food Research and Technology*, 221(3), 550-558.
- Lambrechts, M. G., y Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 97-129.
- Lapid, H., Harel, D., y Sobel, N. (2008). Prediction Models for the Pleasantness of Binary Mixtures in Olfaction. *Chemical Senses*, bjn026.
- Le Berre, E., Beno, N., Ishii, A., Chabanet, C., Etievant, P., y Thomas-Danguin, T. (2008). Just Noticeable Differences in Component Concentrations Modify the Odor Quality of a Blending Mixture. *Chemical Senses*(33), 389-395.
- Le Fur, Y., Mercurio, V., Moio, L., Blanquet, J., y Meunier, J. M. (2003). A New Approach To Examine the Relationships between Sensory and Gas Chromatography-Olfactometry Data Using Generalized Procrustes Analysis Applied to Six French Chardonnay Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 443-452
- Lea, A. G. H., y Piggott, J. R. (2003). *Fermented Beverage Production, Second Edition* (2nd ed.): Springer.
- Lee, S. J., y Noble, A. C. (2003). Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-Olfactometry and GC-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8036-8044

- Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., y Pretorius, I. S. (2004). The development of yeast for the optimal production of flavor-active esters and higher alcohols in wine and distillates. PhD Thesis, Stellenbosch University.
- Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D., y Pretorius, I. S. (2006). The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23(9), 641-659
- Longo, E., Velázquez, J. B., Sieiro, C., Cansado, J., Calo, P., y Villa, T. G. (1992). Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, NW Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(5), 539-541.
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P. L., y Glories, Y. (2007). Main Routes of Oxygen Ingress through Different Closures into Wine Bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5167-5170.
- López, E. F., y Gómez, E. F. (2000). Comparison of solvents for determination of monoterpenes in wine using liquid-liquid extraction. *Chromatographia*, 52(11), 798-802.
- López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J., y Ferreira, V. (2004). Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 88(1), 95-103
- Lord, H., y Pawliszyn, J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), 153-193.
- Loscos, N., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., y Ferreira, V. (2007). Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6674-6684.
- Luque de Castro, M. D., y Priego-Capote, F. (2007). Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. *Talanta*, 72(2), 321-334.

- Maarse, H., y Visscher, C. A. (1989). Volatile Compounds in Food. *Qualitative and Quantitative Data*, 1, 111.
- Macris, B. J., y Markakis, P. (1974). Transport and toxicity of sulphur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(1), 21-29.
- Marín, J., Zalacain, A., De Miguel, C., Alonso, G. L., y Salinas, M. R. (2005). Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. *Journal of Chromatography A*, 1098(1-2), 1-6.
- Marsili, R. T. (2006). Application of sensory-directed flavor-analysis techniques. In Marsili, R. (Ed.), *Sensory-Directed Flavor Analysis*. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Martí, M. P., Busto, O., y Guasch, J. (2004). Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing. *Journal of Chromatography A*, 1057(1-2), 211-217.
- Martí, M. P., Mestres, M., Sala, C., Busto, O., y Guasch, J. (2003). Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Olfactometry Analysis of Successively Diluted Samples. A New Approach of the Aroma Extract Dilution Analysis Applied to the Characterization of Wine Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7861-7865
- Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, M.-L., Tominaga, T., y Dubourdiou, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 385-390.
- Maugh, T. H. (1985). A New Dimension in Gas Chromatography. *Science*, 227(4694), 1570-1571
- Mayol, A. R., y Acree, T. E. (2001). Advances in gas chromatography-olfactometry. Gas chromatography-olfactometry. The state of the art. American Chemistry Society, Washington, 1-10.
- McGorin, R. J., y Gimelfarb, L. (1998). Comparison of Flavor Components in Fresh and Cooked Tomatillo with Red Plum Tomato. *Food Flavors: Formation, Analysis, and*

Packaging Influences: Proceedings of the 9th International Flavor Conference, the George Charalambous Memorial Symposium, Limnos, Greece, 1-4 July 1997.

McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., y Voigt, M. M. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature*, 381(6582), 480-481.

Moio, L., y Etievant, P. X. (1995). Ethyl Anthranilate, Ethyl Cinnamate, 2,3-Dihydrocinnamate, and Methyl Anthranilate: Four Important Odorants Identified in Pinot noir Wines of Burgundy. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(3), 392-398

Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., y Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 675-687.

Mottay, P. (2004). Nose to text: voice recognition software for gas chromatography olfactometry. In Deibler, K. D. y Delwiche, J. (Eds.), *Handbook of Flavor Characterization: Sensory Analysis, Chemistry, and Physiology*. New York, USA: CRC Press.

Mundos, N. (2006). La Industria Vitivinícola de Chile. In *Compendio Vitivinícola de Chile* (Vol. 1). Santiago, Chile: Editorial Nuevos Mundos.

Muñoz, D., Peinado, R. A., Medina, M., y Moreno, J. (2007). Biological aging of sherry wines under periodic and controlled microaerations with *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis*: Effect on odorant series. *Food Chemistry*, 100(3), 1188-1195.

Nielsen, J., Villadsen, J., y Lidén, G. (2003). Mass transfer. In Nielsen, J., Villadsen, J. y Lidén, G. (Eds.), *Bioreaction engineering principles* (2nd ed. ed., pp. 423-475). New York, USA.: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Nielsen, J. C., y Richelieu, M. (1999). Control of Flavor Development in Wine during and after Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 740-745

Noble, A. C., Arnold, R. A., Buechsenstein, J., Leach, E. J., Schmidt, J. O., y Stern, P. M. (1987). Modification of a Standardized System of Wine Aroma Terminology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(2), 143-146

- Noble, A. C., y Ebeler, S. E. (2002). Use of multivariate statistics in understanding wine flavor. *Food Reviews International*, 18(1), 1-20.
- Ortega-Heras, M., González-SanJosé, M. L., y Beltrán, S. (2002). Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 85-93.
- Ortega, C., López, R., Cacho, J., y Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923(1-2), 205-214
- Parish, M., Wollan, D., y Paul, R. (2000). Micro-oxygenation: A Review. *The Australian y New Zealand Grapegrower y Winemaker* 47-50.
- Pawliszyn, J. (1997). Solid Phase Microextraction: Theory and Practice: Wiley-VCH.
- Peña, R. M., Barciela, J., Herrero, C., y García-Martín, S. (2005). Comparison of ultrasound-assisted extraction and direct immersion solid-phase microextraction methods for the analysis of monoterpenoids in wine. *Talanta*, 67(1), 129-135.
- Pizarro, F., Vargas, F. A., y Agosin, E. (2007). A systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast*, 24(11), 977-991.
- Plutowska, B., y Wardencki, W. (2008). Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages - A review. *Food Chemistry*, 107(1), 449-463
- Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., Munoz-Box, R., y Chaintreau, A. (1997). Hyphenated headspace gas chromatography sniffing technique: screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2630-2637.
- Pretorius, I. S., y Bauer, F. F. (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends in Biotechnology*, 20(10), 426-432.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., del Olmo, M., y Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 3-10.
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung/ Food*, 42(6), 351-363.

- Rapp, A., y Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 42(8), 873-884.
- Regodón Mateos, J. A., Pérez-Navado, F., y Ramírez Fernández, M. (2006). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 151-157.
- Rocha, S., Ramalheira, V., Barros, A., Delgadillo, I., y Coimbra, M. A. (2001). Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5142-5151.
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., y Salmon, J.-M. (2003). Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 113-121.
- Rospars, J.-P., Lansky, P., Chaput, M., y Duchamp-Viret, P. (2008). Competitive and Noncompetitive Odorant Interactions in the Early Neural Coding of Odorant Mixtures. *The Journal of Neuroscience*, 28(10), 2659-2666
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., y Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, 20(16), 1369-1385.
- Rothe, M., y Thomas, B. (1963). Aromastoffe des Brotes. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 119(4), 302-310
- Ryan, D., Shellie, R., Tranchida, P., Casilli, A., Mondello, L., y Marriott, P. (2004). Analysis of roasted coffee bean volatiles by using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 57-65.
- Sáenz-Barrio, C., y Cedrón-Fernández, T. (2000). Microextraction of volatile compounds from wine samples and their determination by GC-FID. The effect of the salts and extraction solvents used. *Chromatographia*, 51(3), 221-225.
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., y Delvaux, F. R. (2008). Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces*

cerevisiae during Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 454-461.

Saerens, S. M. G., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Voet, A. R. D., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., et al. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 Genes Encode Novel Enzymes with Medium-chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and Hydrolysis Capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4446-4456.

Salmon, J. M., y Vuchot, P. (2003). Maintenance and Protection of Yeast Morphology by Contact with Wine Polyphenols During Simulation of Wine Aging on Lees. *Journal of Food Science*, 68(5), 1782-1787.

Schuller, D., Pereira, L., Alves, H., Cambon, B., Dequin, S., y Casal, M. (2007). Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. *Yeast*, 24(8), 625-636.

Setkova, L., Risticovic, S., y Pawliszyn, J. (2007). Rapid headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction : II: Classification of Canadian and Czech ice wines using statistical evaluation of the data. *Journal of Chromatography A*, 1147(2), 224-240

Siuzdak, G. (1996). *Mass Spectrometry for Biotechnology*: Academic Press.

Sivertsen, H. K., Holen, B., Nicolaysen, F., y Risvik, E. (1999). Classification of French red wines according to their geographical origin by the use of multivariate analyses. *Journal of the science of food and agriculture*, 79(1), 107-115.

Small, D. M., Gerber, J. C., Mak, Y. E., y Hummel, T. (2005). Differential Neural Responses Evoked by Orthonasal versus Retronasal Odorant Perception in Humans. *Neuron*, 47(4), 593-605.

Stein, S. E. (1999). An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(8), 770-781.

Stevens, S. S. (1951). Mathematics, measurement, and psychophysics. *Handbook of experimental psychology*, 1-49.

- Stevens, S. S. (1961). To Honor Fechner and Repeal His Law: A power function, not a log function, describes the operating characteristic of a sensory system. *Science*, 133(3446), 80-86.
- Stone, H., y Sidel, J. L. (2004). *Sensory Evaluation Practices*: Academic Press.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., y Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173.
- Tai, S. L., Daran-Lapujade, P., Luttk, M. A. H., Walsh, M. C., Diderich, J. A., Krijger, G. C., et al. (2007). Control of the Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae* Grown at Low Temperature: A Multi-Level Analysis in Anaerobic Chemostat Cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10243-10251.
- Tai, S. L., Daran-Lapujade, P., Walsh, M. C., Pronk, J. T., y Daran, J.-M. (2007b). Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to Low Temperature: A Chemostat-based Transcriptome Analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 18(12), 5100-5112
- Tao, J., Dykes, S. I., y Kilmartin, P. A. (2007). Effect of SO₂ Concentration on Polyphenol Development during Red Wine Micro-oxygenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6104-6109.
- Thorngate, J. H. (1998). Yeast Strain and Wine Flavor: Nature or Nurture? In Waterhouse, A. L. y Ebeler, S. E. (Eds.), *Chemistry of Wine Flavor* (Vol. ACS SYMPOSIUM SERIES 714, pp. 66-80). Washigton: American Chemical Sociaty.
- Toriya, M. (2002). Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España.
- Torrens, J., Urpí, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E., y Buxaderas, S. (2008). Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *International Journal of Food Microbiology*.
- Ugliano, M., Bartowsky, E. J., McCarthy, J., Moio, L., y Henschke, P. A. (2006). Hydrolysis and Transformation of Grape Glycosidically Bound Volatile Compounds during Fermentation with Three *Saccharomyces* Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6322-6331.

- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., y Dequin, S. (2007). Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research*, 7(2), 317-329.
- Valero, E., Moyano, L., Millan, M. C., Medina, M., y Ortega, J. M. (2002). Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chemistry*, 78(1), 57-61.
- Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M., y Dequin, S. (2005). Selected yeast utilization and biodiversity. *Cahier des Entretiens Scientifiques* (13), 55-60.
- Van Leeuwen, C., y Seguin, G. (2006). The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research*, 17(1), 1-10.
- Varela, C., Pizarro, F., y Agosin, E. (2004). Biomass Content Governs Fermentation Rate in Nitrogen-Deficient Wine Musts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3392.
- Vaudour, E. (2002). The Quality of Grapes and Wine in Relation to Geography: Notions of Terroir at Various Scales. *Journal of Wine Research*, 13(2), 117-141.
- Vilanova, M., Cortés, S., Santiago, J. L., Martínez, C., y Fernández, E. (2007). Aromatic Compounds in Wines Produced During Fermentation: Effect of Three Red Cultivars. *International Journal of Food Properties*, 10(4), 867 - 875.
- Waterhouse, A. L., y Kennedy, J. A. (2004). *Red Wine Color: Revealing the Mysteries: An American Chemical Society Publication*.
- Zalacain, A., Marín, J., Alonso, G. L., y Salinas, M. R. (2007). Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta*, 71(4), 1610-1615
- Zhang, W., Wu, P., y Li, C. (2006). Study of automated mass spectral deconvolution and identification system (AMDIS) in pesticide residue analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(10), 1563-1568
- Zou, Z., y Buck, L. B. (2006). Combinatorial Effects of Odorant Mixes in Olfactory Cortex. *Science*, 311(5766), 1477-1481.
- Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C., y del Olmo, M. (2006). Transcriptomic and Proteomic Approach for Understanding the Molecular Basis of Adaptation of

Saccharomyces cerevisiae to Wine Fermentation. *Applied Environmental Microbiology*, 72(1), 836-847.

A N E X O S

Anexo A: Información complementaria de introducción

En este anexo se revisarán elementos introductorios no imprescindibles en la introducción, pero que si fueron revisados en el desarrollo de la tesis como: la revisión bibliográfica realizada para decidir la técnica de extracción de aromas y el procedimiento de realización de GC-O.

A.1.- Técnicas de Extracción

A.1.1.- Micro-Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Microextraction SPME)

Esta técnica consiste en la utilización de una fibra delgada cubierta con un polímero o un adsorbente que posee un coeficiente de partición mucho mayor que el de la fase acuosa o gaseosa y permite la extracción de compuestos orgánicos. Esta técnica permite medir compuestos presentes en el espacio de cabeza (HS-SPME) o en el líquido mismo, por contacto directo con la fibra (D-SPME). Después de un tiempo de exposición de la fibra en el medio a extraer, tiempo necesario para alcanzar equilibrio entre las fases, la fibra es llevada al puerto de inyección del equipo de cromatografía en donde la fibra es calentada para la desorción de los compuestos adsorbidos. Esta técnica fue desarrollada a comienzos de los años 90, ganando una amplia aceptación debido a la facilidad de extracción, a que no usa solventes tóxicos, y economía. El análisis de aromas en vinos no es una excepción (Martí et al., 2004; Howard et al., 2005; Setkova et al., 2007). La principal variable a considerar es el tipo de recubrimiento de fibra a utilizar, dado que cada una posee afinidades diferentes y permite extraer con mayor eficiencia ciertos compuestos. Otras variables que deben ser optimizadas para mejorar el proceso de extracción son: la cantidad de sales que son adicionadas, el tiempo y la temperatura de extracción, la agitación y el volumen de la muestra (Pawliszyn, 1997; Lord & Pawliszyn, 2000). Para la extracción en vino, ha sido reportado que la composición de la matriz de extracción ejerce un efecto importante en los compuestos a extraer (Rocha et al., 2001).

A.1.2.- Extracción con Barra Adsorptiva de Agitación Sorbedora (Stir-Bar Sorptive Extraction)

Esta técnica consiste en el mismo principio de equilibrio que D-SPME, desarrollado también en los años 90, pero que se diferencia en el uso de una barra de agitación de vidrio recubierta por el adsorbente polidimetilsiloxano (PDMS) en mayores cantidades que las presentes en una fibra de SPME (24 μ l versus 0,5 μ l), de manera

que la superficie de contacto entre las dos fases es mayor, permitiendo una mayor eficiencia en la extracción y aumentando 100 veces su sensibilidad (Baltussen et al., 1999). Luego de la extracción la barra es colocada en un sistema de desorción térmica (Thermal Desorption System TDS) donde los compuestos son volatilizados y capturados en una trampa de frío que contiene Tenax, una resina adsorbente específica para bajas temperaturas. Posteriormente los compuestos son desorbidos hacia la columna capilar del cromatógrafo gaseoso (Caven-Quantrill & Buglass, 2006). Tal como SPME, es una técnica rápida, económica y que no requiere uso de solventes; sus parámetros de optimización son temperatura, tiempo, pH y adición de sales. A pesar de sus ventajas sobre SPME, ha sido poco utilizada para el análisis de aromas de vinos y mostos (Hayasaka et al., 2003; Alves et al., 2005; Marín et al., 2005; Caven-Quantrill & Buglass, 2006; Zalacain et al., 2007).

A.1.3.- Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction SPE)

Técnica basada en la afinidad que posee los compuestos orgánicos al pasar por una fase sólida estacionaria, en la cuál los compuestos de interés pueden o no ser retenidos en la fase sólida, permitiendo la separación de éstos. Técnica que se ha desarrollado durante los últimos años con nuevos formatos, cartuchos de absorción y varias fases disponibles, junto con la presión existente en los laboratorios para reducir el uso de solventes orgánicos en las opciones de extracción (Hennion, 1999). Es una técnica utilizada para la extracción de muestras o la limpieza de las muestras. El problema mayor de esta técnica radica en que la selectividad (medida como la razón entre los factores cromatográficos de retención entre los compuestos que se desean medir y los que interfieren en su medición) que posee para compuestos que no son altamente apolares o polares es baja.

A.1.4.- Solvent Assisted Flavour Analysis SAFE

Técnica de extracción a vacío y a temperatura ambiente para compuestos aromáticos presentes tanto en muestras líquidas como sólidas. Es una técnica introducida en 1999 por el grupo de trabajo del prof. Schieberle (Engel et al., 1999). En un aparato de vidrio especialmente diseñado se conecta una bomba de alto vacío (Figura A-1). La muestra es introducida en el compartimiento 1, y por medio de la acción del vacío, los compuestos volátiles migran a la sección 2, donde en nitrógeno líquido en el compartimiento 3, son condensados y caen en el compartimiento de destilación (4). Esta técnica es utilizada tanto para la extracción de la muestra misma, como para la concentración de extractos de muestras obtenidos por otra técnica (e.g. extracción líquido-líquido). Las bajas temperaturas de extracción permiten reducir la posible formación de artefactos y la pérdida de compuestos altamente volátiles o termolábiles. Más aún, el vacío permite aumentar la eficiencia de extracción de los compuestos. El gran inconveniente de esta técnica es el costo de implementación, ya que las bombas de alto vacío requeridas son de alto costo.

Figura A-1: Esquema del aparato de destilación de la técnica SAFE (Engel et al., 1999).

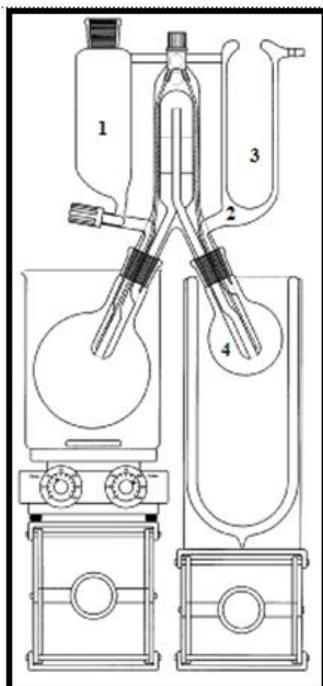


Tabla A-1: Comparación de acuerdo a variables de funcionamiento de técnicas de extracción de aromas.

| Técnica × | Representatividad × | Sensibilidad × | Uso de Solventes × | Costo × | Simplicidad × | Reproducible × |
|--|---|---|--------------------|---|---------------|----------------|
| Extracción L-L × | Baja en HS, Media en boca × | Alta (µg/L) (Ortega-Heras et al., 2002) × | Si, tóxicos × | Alta × | Baja × | Alta × |
| Solid-Phase Microextraction (SPME) × | Alta en HS para orthonasal, ¶ Media en DI × | Alta × | No × | Si, una vez que se tienen los equipos × | Alta × | Alta × |
| Stir-Bar Sorptive Extraction (SBME) × | Nula en HS, ¶ Alta en boca × | Alta × | No × | Media, requiere equipos de desorción × | Media × | Alta × |
| Solid-Phase Extraction (SPE) × | Media × | Alta × | No × | Media × | Media × | Buena × |
| Solvent Assisted Flavour Extraction (SAFE) × | Alta en HS para retronasal por ser una técnica dinámica. ¶ Media en boca × | Alta × | Si y No × | Baja, aparato de vidrio y bombas de alto costo. × | Baja × | Alta × |

HS: Espacio de Cabeza

Tabla A-2: Comparación en ventajas y desventajas de técnicas de extracción de aromas en vino.

| Técnica× | Ventaja× | Desventaja× |
|--|---|--|
| Extracción L-L × | <p>Extrae la totalidad de los compuestos: alta, media y baja volatilidad.¶</p> <p>Es la técnica más usada para la extracción de aromas. ×</p> | <p>El uso de solvente permite la formación con los compuestos a extraer, que degradar o perder al evaporar el solvente. ×</p> <p>Baja sensibilidad para compuestos ebullición bajo.¶</p> <p>Requiere mayor manipulación de muestra tiempo dependiente. ×</p> |
| Solid-Phase Microextraction (SPME) × | <p>Automatizable.¶</p> <p>Sencilla preparación, se necesita poca muestra. ×</p> | <p>Menor sensibilidad para compuestos comparación con SBSE. ×</p> |
| Stir-Bar Sorptive Extraction (SBSE) × | <p>Tiene una mayor capacidad de extracción debido a que posee mayor volumen de fibra para absorber, en especial compuestos trazas. ×</p> | <p>Adsorción limitada de las grasas.×</p> |
| Solid-Phase Extraction (SPE) × | <p>Útil para realizar procesos preextractivos (remoción de compuestos de bajo interés)×</p> | <p>Su reproducibilidad y eficiencia de menor que SPME. ×</p> |
| Solvent Flavour Assisted Extraction (SAFE) × | <p>Alta capacidad de extracción, aún en compuestos de punto de ebullición alto. ×</p> | <p>Alto costo.¶</p> <p>Equipo difícil de operar.×</p> |

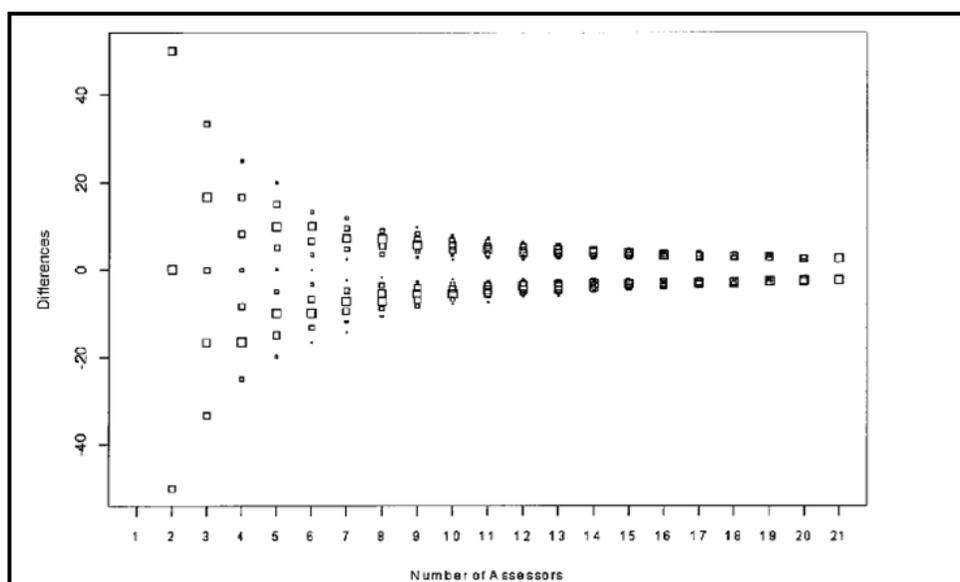
A.2.- Cromatografía gaseosa acoplada a olfactometría

A continuación se presenta una descripción de los métodos cuantitativos existentes en GC-O:

Los métodos de frecuencia de detección se basan en el uso de un panel de detección con un número entre 6-12 personas, las cuáles huelen la muestra y se les pide informar si detectan el aroma y entregar un descriptor asociado, luego la importancia del aroma detectado esta dada por el número de personas del panel que han detectado el aroma (a mayor frecuencia de detección, mayor importancia). El método principal de frecuencia calcula dos parámetros en base a los datos obtenidos, los que son la superficie de frecuencia nasal de impacto (SNIF Surface of Nasal Impact Frequency) y la frecuencia nasal de impacto (NIF Nasal Impact Frequency), donde el primero considera la detección del aroma y el tiempo en que

es percibido, y el segundo solamente la detección misma (Pollen et al., 1997). La principal ventaja de este método radica en que la diferencia del valor calculado de NIF y SNIF entre un panel de n y un panel de $n+1$ personas disminuye a medida que incrementa el número de integrantes del panel, con cerca del 50% para un panel de 2 personas y un 5% para un panel de 21 personas (Figura A-2). Se encontró que esta técnica ha sido utilizada en el estudio del aroma del vino en un solo trabajo (Le Fur et al., 2003).

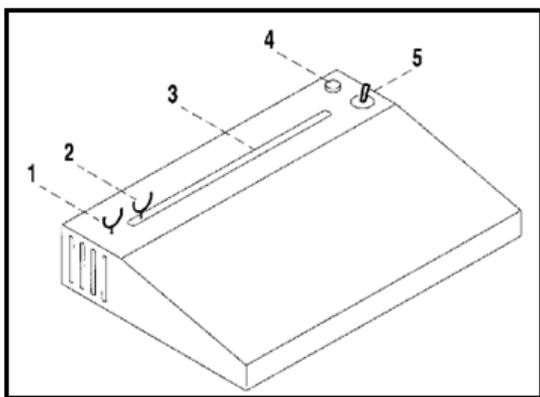
Figura A-2: Disminución de la diferencia entre un panel de n y $n+1$ personas (Pollen et al., 1997).



Los métodos de dilución se caracterizan por realizar análisis olfatométrico de sucesivas diluciones de una muestra, hasta que ningún compuesto sea percibido. Dos métodos existen, uno es el análisis de diluciones de extractos de aroma (Aroma Extraction Dilution Analysis AEDA), donde para cada compuesto percibido es calculado un factor de dilución (FD), y la importancia del aroma esta dada por este valor (a mayor FD, mayor importancia), el segundo método es el análisis de medición de respuestas aroma hedónicas combinadas (Combined Hedonic Aroma Response CHARM Analysis), el cuál además de determinar la presencia del peak aromático en cada dilución, se determina la duración del mismo, a partir de ambos datos son calculados los valores CHARM (CHARM values), los cuáles son proporcionales a la cantidad del compuesto presente en la muestra e inversamente proporcionales al umbral de percepción. Un método alternativo, pero con el mismo objetivo que los métodos de dilución es el análisis de concentraciones seriadas (Aroma Extraction Concentration Analysis AECA), donde el extracto es concentrado sucesivamente, con el objetivo de ver en que concentración aparece cierto aroma (Grosch et al., 2001). Estas técnicas han sido usadas en el análisis de vinos (Aznar et al., 2001; Martí et al., 2003; Campo et al., 2007) y AECA ha sido utilizada para el estudio del aroma en mostos de uva (López, R. et al., 2004).

Los métodos de intensidad se basan en la medición directa de la intensidad de un compuesto utilizando una escala determinada. Dos métodos se destacan en esta categoría, OSME (del griego "olfato") y el método de Finger-Span (Etiévant et al., 1999), ambos consisten en la medición directa de intensidad a medida que el compuesto odorante eluye de la columna cromatográfica, diferenciándose el segundo en el uso de un equipo (potenciómetro) permite modificar una señal eléctrica utilizando los dedos índice o mayor, y el pulgar, separándose de acuerdo a la intensidad percibida (Figura A-3). Estas técnicas han sido utilizadas también para el estudio de aromas en el vino (Lee & Noble, 2003; Gürbüz et al., 2006).

Figura A-3: Aparato utilizado en la técnica Finger-Span. 1: anillo fijo para pulgar; 2: anillo móvil para dedo índice o mayor; 3: pista del curso; 4: lámpara indicadora de señal; 5: switch encendido y apagado (Etiévant et al., 1999).



Cada técnica posee ventajas y desventajas, y las informaciones entregadas son complementarias son perspectivas distintas de la importancia de un aroma (Tabla A-3). Cada tipo de técnica permite entregar distinta información, pero todas son graficadas de la misma forma, por medio de la construcción del aromagrama, que es análogo al cromatograma. En esta gráfica, se grafica el parámetro calculado con la metodología escogida respecto al tiempo en que cada compuesto fue percibido.

Finalmente se señala que, si bien GC-O ha entregado valiosa información sobre la importancia de ciertos aromas en distintas muestras, aún quedan varias dificultades por vencer. Una de ellas es el tiempo requerido para analizar muestras por un panel en un análisis olfatométrico, el cuál es de mínimo dos días para análisis de frecuencia y cercano a dos semanas para análisis de diluciones. Para resolver este problema, el uso de múltiples puertos olfatométricos conectados a un mismo GC es una alternativa, lo que permite que varias personas huelan la salida del efluente, distribuido de tal forma que cada uno perciba la misma cantidad (Debonneville et al., 1999; Berdagué et al., 2007). Otra herramienta nueva es el uso de MDGC acoplada con olfatometría (MDGC-O-MS) y espectrofotometría de masa, debido a la mejor separación lograda por MDGC permite que compuestos en concentraciones muy pequeñas que usualmente pueden estar coeluyendo con compuestos en mayores concentraciones, lo que no permite ni su detección, por supresión de aromas, ni su identificación (Eaton et al., 2006).

Tabla A-3: Comparación entre metodologías de análisis de GC-O (Plutowska & Wardencki, 2008).

| Técnica | Ventaja | Desventaja |
|---|--|--|
| Métodos de Frecuencia de Detección | <ul style="list-style-type: none"> • Simplicidad, no requiere de entrenamiento para integrantes del panel. • Mejor reproducibilidad de los resultados. • Permite detectar diferencias en capacidades de detección de ciertos aromas (anosmias específicas) en el panel. • Facilidad de realización. • Menor consumo de tiempo en realización. | <ul style="list-style-type: none"> • No se entrega información sobre intensidad de un compuesto detectado, lo que no permite observar diferencias entre compuestos detectados con la misma frecuencia, en especial si todos los integrantes del panel detectan el compuesto. |
| Métodos de Diluciones | <ul style="list-style-type: none"> • Permite determinar los compuestos con mayor impacto olfativo, comparando esta información con los OAV calculados a partir del análisis químico. | <ul style="list-style-type: none"> • Son los métodos que consumen más tiempo debido al gran número de diluciones necesarias. Esto puede ser reducido considerando pocos niveles (tres) de dilución para clasificar aromas de acuerdo a ello, relacionándolo con el impacto olfativo. • Requiere que los integrantes del panel sean altamente sensibles y entrenados, lo que puede arrojar resultados subjetivos. • Se basan en el falso supuesto que las intensidades (y su impacto olfativo) de los aromas son directamente proporcionales a la concentración. |

Anexo B: Fichas Técnicas de Levaruas Vínicas Utilizadas.

1.- EC-1118



TERROIR SELECTION : CHAMPAGNE

Lalvin EC-1118

THE ORIGINAL 'PRISE DE MOUSSE'

APPLICATIONS

The EC-1118 yeast has been isolated in Champagne and its use is validated by the Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne (CIVC). Its strong competitive character, its ability to ferment at low temperature, good flocculation and excellent alcohol tolerance, make the EC-1118 an excellent strain to be used in a wide range of applications (such as sparkling wines, fruit wines and ciders).

MICROBIOLOGICAL AND OENOLOGICAL PROPERTIES

Saccharomyces cerevisiae bayanus

Competitive factor

High alcohol tolerance up to 18%

Short lag phase

Fast fermentation rate in a wide pH range

Wide range of temperatures for fermentation including low temperatures (Optimal between 15°C to 25°C)

Low requirement in assimilable nitrogen

Low O₂ requirement (especially at low T°)

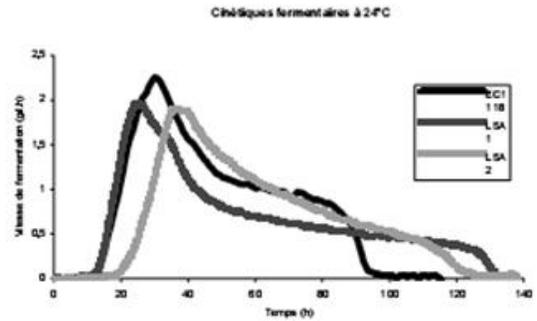
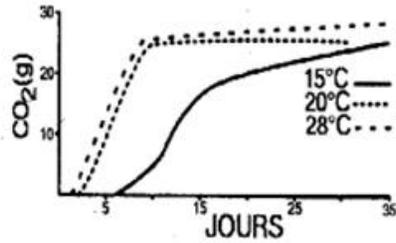
Low to average production of volatile acidity

Average SO₂ production

Low H₂S production

Low foam formation

KINETICS AND FERMENTATION TEMPERATURE



Kinetics of fermentation at different temperatures

Comparison of kinetics of fermentation between 3 different yeasts



TERROIR SELECTION : CHAMPAGNE

Lalvin EC-1118

THE ORIGINAL 'PRISE DE MOUSSE'

DOSAGE

| | |
|---------------------------------|---------------|
| White, red and rosé winemaking: | 25 to 40 g/hl |
| Secondary bottle fermentation | 50g/hl |
| To restart stuck fermentation | 40g/hl |

Note: dosage range is based on the must sugar content and sanitary state of the grapes and winery.

HOW TO USE

Rehydrate EC-1118 in 5 times its weight of potable water at 40°C. Let stand for at least 20 minutes then gently stir occasionally to break up any clumps. Add to the must.

- THE TOTAL REHYDRATION DURATION SHOULD NEVER EXCEED 45 MINUTES
- AVOID COLD SHOCKING THE YEAST. THE TEMPERATURE DROP BETWEEN THE MUST TO BE INOCULATED AND THE REHYDRATION MEDIUM SHOULD NEVER BE >10°C (if any doubt, please contact your supplier or Lallemand)
- IT IS ESSENTIAL TO REHYDRATE THE YEAST IN A CLEAN CONTAINER.
- INITIAL REHYDRATION IN MUST IS NOT ADVISABLE.

Lallemand guarantees the quality of its products sold in their original packaging, used in conformity with the expiration date and the storage conditions.

The information is true and accurate to the best of our knowledge; however, this data sheet is not to be considered as a guarantee expressed or implied, or as a condition of sale of this product.



FOR MORE INFORMATION: www.lalvinwine.com

2.- RX-60

ZYMAFLORE RX60

Yeast for fruity and spicy red wines

SPECIFICATIONS

ZYMAFLORE RX60 is a strain derived from breeding, combining outstanding fermentation capacities and excellent aroma production and revelation. Suitable for all types of red grape varieties for elaborating modern, aromatic red wines which are supple on the palate.

GENOLOGICAL PROPERTIES

Fermentation characteristics :

- Tolerance to alcohol: up to 16.5 % vol.
- Tolerance over a large temperature range: 20 - 30°C.
- Medium-high nitrogen requirements.
- Low production of volatile acidity and H₂S.

Aromatic and organoleptic characteristics :

- Aromatically intense nose and palate profile (fruity, red fruits), while maintaining varietal specificity.
- Particularly optimises the aromatic potential of Syrah grapes, giving a balanced wine with a clean, fruity/spicy profile.
- Produces wines with supple mouthfeel.

Aromatic and organoleptic characteristics :

- Aromatically intense nose and palate profile (fruity, red fruits), while maintaining varietal specificity.
- Particularly optimises the aromatic potential of Syrah grapes, giving a balanced wine with a clean, fruity/spicy profile.
- Produces wines with supple mouthfeel.

EXPERIMENTAL RESULTS

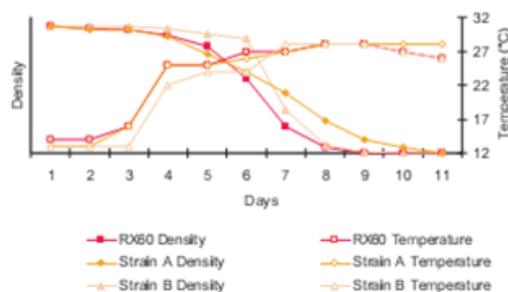
Trial in Australia, 2006 Syrah.

Potential alcohol 14% vol., Sugar 252 g/L, pH 3.45.

Yeasting at tank filling, with 30 g/hL SUPERSTART®/DYNASTART®.

Positive implantation controls (DNA) for RX60 and strain A, contaminated for strain B.

Completed fermentations (9 to 11 days), volatile acidity 0.27 g/L H₂SO₄ on average.

**PROTOCOL FOR USE****ENOLOGICAL CONDITIONS**

- Please refer to the Technical Booklet « good alcoholic fermentation management » for complete information on yeast addition timing and techniques, the key points of fermentation.

DOSAGE

- 20 g/hL

In the case of prefermentative cold maceration (cold soaking), it is recommended to add yeast at 5 g/hL during tank filling, in order to dominate the indigenous flora, then to complete with 15 to 20 g/hL at the end of maceration, before increasing the must temperature.

IMPLEMENTATION

- Carefully follow the yeast rehydration protocol indicated on the packet.
- Avoid temperature differences exceeding 10°C between the must and the yeast during inoculation. Total yeast preparation time must not exceed 45 minutes.
- In the case of harvests with a high alcohol degree potential and in order to minimise volatile acidity formation use SUPERSTART®/DYNASTART® in the rehydration water.

STORAGE

In original, unopened packaging. Use within the specified use by date.

Specific conditions: please refer to the technical data sheet.

PACKAGING

500g vacuum bag, 10kg box

3.- Uvaferm BDX

uvaferm BDX[®]
Saccharomyces cerevisiae cerevisiae

The perfect fermenter



For more than 25 years, Lallemand has been selecting the best winemaking yeasts from nature. The ever-more challenging conditions of fermentation have propelled Lallemand to develop a new production process for these natural yeasts – the YSEO[®] process – which optimizes the reliability of alcoholic fermentation and reduces the risks of fermentation off-flavours. YSEO[®] yeasts are 100% natural and non-GMO.

Applications

The Cabernet-Sauvignon, the Merlot and the Cabernet Franc are widely spread in the world nowadays. According to the soil, the output, the winemaker's personality and the type of winemaking, the wines made from these grape varieties will have different expressions. They however present dominating and specific characters such as pepper hints (pyrazine aromatic family) for the Cabernet Franc and Cabernet-Sauvignon and strawberry jam hints (furanols family) for the Merlot. To this is to be added a stronger tannic presence.

The uvaferm BDX[®] yeast, isolated in France, which qualities are recognized all around the world, respects these essential components of the Bordeaux grape variety, especially at the varietal aromas level.

Besides, the uvaferm BDX[®] yeast preserves the concentration in phenolic compounds in the wines and allows the winemaker to elaborate wines with strong colors and high total polyphenol levels.

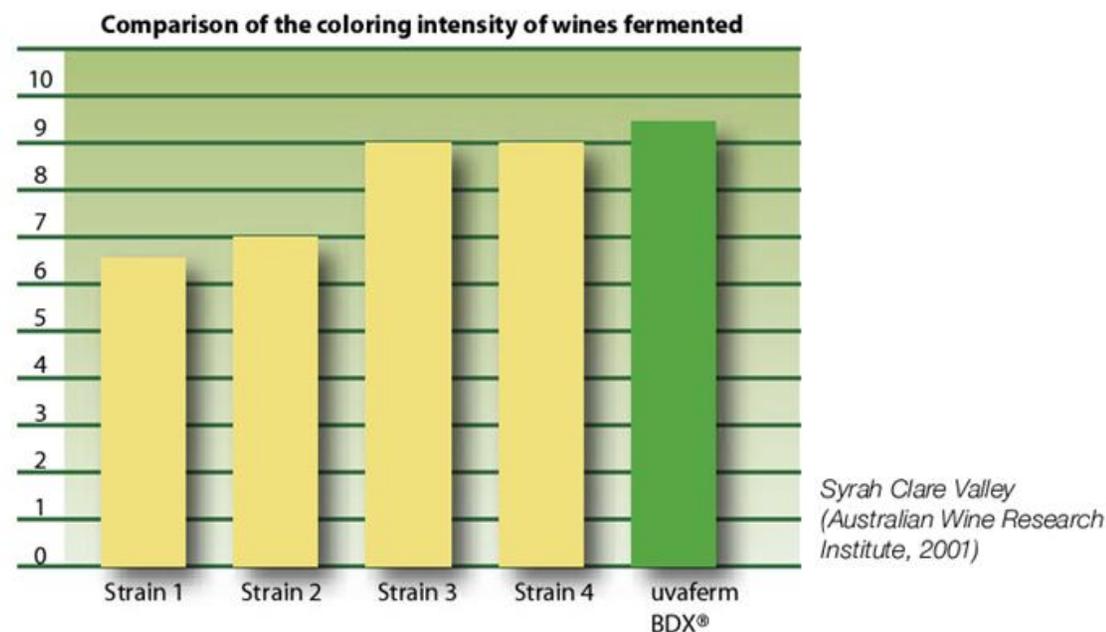
Microbiological and œnological properties

- *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*
- Sensitive to the competitive factor K2
- High tolerance to alcohol : up to 16%
- Average lag phase
- Moderate fermentation rate allowing long macerations
- Optimum temperature range: 18 to 30°C
- Average requirement in assimilable nitrogen
- Low β -glycosidase activity : limits the color losses
- Low production of volatile acidity: 0,20g/L eq (H_2SO_4)
- SO_2 production : between 20 mg and 30 mg/L
- Low foam formation
- Facilitates the malolactic fermentation

Sensory profiles and color

| Varieties | Countries | Sensory profiles |
|--------------------|-----------|-----------------------------------|
| Cabernet-sauvignon | USA | Dry fruits, olives, round tannins |
| Merlot | USA | Ripe fruits, round tannins |
| Malbec | Argentine | Dry fruits, truffles |

Sensory profiles of wines obtained with the uvaferm BDX® yeast in various wine-growing regions



Dosage

Red winemaking: 20 to 40g/hL

Intructions for use

- 1° Rehydrate in 10 times its weight of water (temperature between 35 and 40°C).
- 2° Dissolve carefully by gentle stirring and wait for 20 minutes.
- 3° Add to the must. The temperature difference between the must to be inoculated and the rehydration medium should never be over 10°C (if any doubt, please contact your supplier or Lallemand).
- 4° The total rehydration duration should never exceed 45 minutes.
- 5° It is essential to rehydrate the yeast in a clean container.
- 6° The rehydration in must is not advisable.

*Selected
and
produced by*



Natural solutions that add value to the world of winemaking

Distributor

B.P. 59

31702 Blagnac CEDEX

tel: +33(0)5 62 74 55 55

fax: +33(0)5 62 74 55 00

www.lallemandwine.com

4.- VIN-13

VIN 13

Saccharomyces cerevisiae

A yeast for the production of aromatic white wines

ORIGIN

Strain VIN 13 is a product of the yeast selection program of the Department of Microbiology and Institute for Wine Biotechnology, University of Stellenbosch, South Africa.

APPLICATION

VIN 13 is ideal for the production of aromatic white wines for early release on the market as well as for wines destined for ageing. It enhances tropical fruit and floral flavours and is recommended for vinifying Chardonnay, Sauvignon blanc, Chenin blanc, Colombard, Riesling, Semillon, Gewürztraminer, Muscadelle, Viognier and Ugni blanc.

FERMENTATION KINETICS

Short lag phase

Sugar is vigorously and evenly fermented even at very low temperatures

Conversion factor of sugar (°Brix) to alcohol is dependent on temperature of fermentation and type of fermentation vessel. It can vary from 0.55 - 0.62 (\pm 16.3 g sugar for 1% alcohol)

TECHNICAL CHARACTERISTICS

Optimum temperature range for new world style wines: 50°F - 59°F

Optimum temperature range for European style wines: 59°F - 68°F

Alcohol tolerance: 16.5%

Osmotolerance: 27°Brix

Resistance to free SO₂: 50 mg/l

Low foaming

METABOLIC CHARACTERISTICS

Average glycerol production: 5 - 7 g/l

Very low volatile acidity production, generally lower than 0.25 g/l

Low SO₂ production

Has a low nitrogen requirement at low temperatures

POF (-)

PHENOTYPE

Killer positive

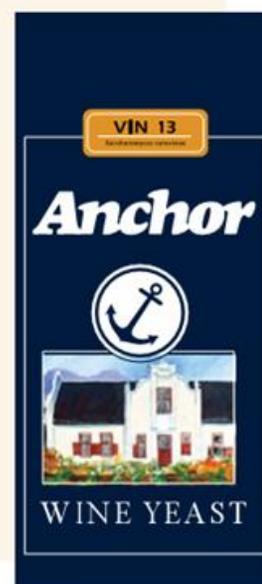
DOSAGE

2 lb/1000 gal

PACKAGING

VIN 13 is vacuum-packed in sachets of 1kg. It must be stored in a dry, cool 41°F - 59°F place, sealed in its original packaging.

www.newworldwinemaker.com



APPLICATIONS AND CHARACTERISTICS OF ANCHOR ACTIVE DRIED WINE YEASTS

| Yeasts | NT 202 | NT 112 | NT 50 | NT 45 | NT 116 | WE 372 | WE 14 | VIN 13 | VIN 7 | N 96 | 228 |
|--|--------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|------|-----|
| <i>Saccharomyces cerevisiae (ceresiae)</i> | | | | | | *** | *** | | | | *** |
| <i>Saccharomyces cerevisiae (bayanus)</i> | | | | | | | | | | *** | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - hybrids | *** | *** | *** | *** | *** | | | *** | *** | | |
| Fruit driven red wines | *** | ** | ** | *** | ** | *** | . | *** | | . | |
| Complex red wines destined for ageing | ** | *** | *** | ** | *** | ** | . | | | . | |
| Aromatic dry white wine | | | | ** | *** | | | *** | *** | . | |
| Dry white wine destined for ageing | | | | *** | | | | *** | ** | | |
| Semi-sweet white wines | | | | | | ** | *** | | | | |
| High sugar tolerance | *** | *** | *** | | *** | | | *** | | *** | |
| Cold tolerance as low as 13°C | | | ** | ** | *** | | | *** | *** | *** | |
| Quality wine for brandy | | | | | | ** | | *** | | | ** |
| High alcohol tolerance | *** | *** | *** | | *** | | | *** | | *** | |
| MLF compatibility | *** | . | *** | *** | *** | *** | *** | *** | | . | |

KEY: *** HIGHLY SUITABLE ** SUITABLE . LESS SUITABLE

THE AVAILABILITY OF THE STRAIN MAY VARY ACCORDING TO THE COUNTRY OF DISTRIBUTION

REHYDRATION PROCEDURE

STEP 1 Put 3 gallons of drinking water at a temperature of 95°F - 100°F into a clean bucket. Avoid using chlorinated water.

STEP 2 Add 1 pound of sugar or 1 gallon of warmed must and stir well. Yeast will rehydrate best and start growing in a 5% sugar solution.

STEP 3 Gradually pour 2 pounds of yeast into the rehydration solution, continuing to stir to maintain the yeast cells in suspension.

STEP 4 Leave the yeast to swell for 20 minutes, stirring frequently. A strong smelling foam will be produced indicating that the yeast has started to re-activate.

DISTRIBUTED BY:



Scott Laboratories Inc.
2220 Pine View Way
Petaluma, CA 94955

Tel: (707) 765-6666
Outside C.A: (800) 821-7254
Fax: (707) 765-6674

Our liability is specifically limited to supplying products that conform to the description on the packaging. Every application must be adapted to the conditions prevailing and the user accepts full responsibility for ensuring this.

ADDITION OF YEAST TO THE MUST

In order to avoid the proliferation of unwanted micro-organisms, the yeast should be incorporated as soon as possible after the rehydrating phase is complete. To avoid temperature shock, gradually lower the rehydrated yeast temperature by adding must in several steps until the temperature of the final must is reached. Add the yeast when filling the must into the tanks. Pumping over (in the case of red wine) will evenly distribute the yeast in the tank.

FERMENTATION MANAGEMENT

- **Daily check:** Decrease in °Brix to ensure a healthy progression of the fermentation.
- **Temperature monitoring:** It is very important to follow the temperature limits provided on the product sheet.
- **At mid-fermentation (16 to 14 °Brix):** Pumping over (in the case of red wine production) with air will provide the yeasts with vital oxygen and prevent fermentation problems. At this stage oxygen doesn't affect wine aroma and there is no risk of oxidation.

The addition of a complete yeast nutrient containing inactive yeast, nitrogen salts and vitamins will aid the yeast with completion of the fermentation.

FOR ALL INFORMATION AS TO SPECIFIC APPLICATION IN YOUR AREA, CONTACT biotech@anchor.co.za

5.- X-5

ZYMAFLORE X5

Yeast for the production of technological white wines with a high aromatic intensity (thiol-type varietal aromas, fermentation aromas).

SPECIFICATIONS

ZYMAFLORE X5 is a strain derived from breeding, combining excellent revelation of thiol-type **varietal aromas** (particularly 4MMP) and high **fermentation aroma** production. Perfectly suited to the production of modern (Popular Premium, Premium), fresh and **complex** white wines, guaranteeing fermentation security even under difficult conditions: low turbidity, low temperature.

GENOLOGICAL PROPERTIES

Fermentation characteristics :

- Tolerance to alcohol: up to 16% vol.
- Medium to high nitrogen requirements.
- Tolerance to low temperature: from 13°C*.
- Tolerance to low turbidity (< 50 NTU).
- Low production of volatile acidity and H₂S.

Aromatic characteristics :

Complex and intense aromatic profile:

- Very high revelation of thiol-type varietal aromas (4MMP, 3MH, 3MHA: boxwood, citrus, tropical fruits).
- Good production of fermentation aromas (AI, APE, PE: fruity, floral).

* It is of course possible to add yeast at 8-10°C after settling; it is essential that the yeast is acclimatised to the temperature by consecutive addition of portions of the juice.

EXPERIMENTAL RESULTS

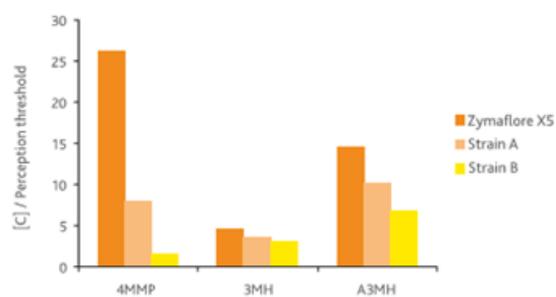
Trial at LAFFORT experimental centre, Bordeaux region.

Sauvignon blanc, 2005.

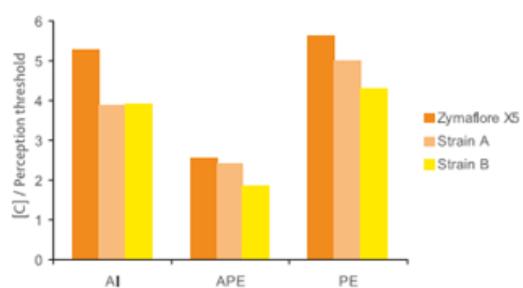
Potential alcohol: 13 %vol, 40 NTU, fermentation temperature 16°C, nitrogen correction to 180mg/L.

Yeast addition at 20g/hL, positive implantation controls.

Fermentation in 10 days, Volatile Acidity 0.19 g/L H₂SO₄ on average.



Revelation of varietal aromas (thiols) by different yeasts.
4MMP: boxwood - 3MH: citrus - 3MHA: tropical fruit



Production of fermentation aromas by different yeasts.
AI: banana - APE: PE: floral

PROTOCOL FOR USE

GENOLOGICAL CONDITIONS

- Please refer to the Technical Booklet « Good alcoholic fermentation management » for complete information on yeast addition timing and techniques, the key points of fermentation.

DOSAGE

- 20 g/hL

IMPLEMENTATION

- Carefully follow the yeast rehydration protocol indicated on the packet.
- Avoid temperature differences exceeding 10°C between the must and the yeast during inoculation. Total yeast preparation time must not exceed 45 minutes.
- In the case of harvests with a high alcohol degree potential and in order to minimise volatile acidity formation use SUPERSTART®/DYNASTART® in the rehydration water.

STORAGE

In original, unopened packaging. Use within the specified use by date.

Specific conditions: please refer to the technical data sheet.

PACKAGING

500g vacuum bag, 10kg box.

10 kg vacuum bag

6.- QA-23

The advertisement is divided into two main visual sections. On the left, a technical label for yeast is shown with the following text: **SACCHAROMYCES CEREVISIAE**, **BAYANUS**, the **LALVIN** logo, **AROMAS INTENSITY AND SECURITY**, **TERROIR SELECTION**, *Vignoble*, **VINHOS VERDES**, and **PORTUGAL**. On the right, a photograph of a yeast packet is shown at an angle. The packet features the **YSEO PROCESS** logo (with 'Yeast Security Optimization' written below it) and a block of text: 'For more than 25 years, Lallemand has been selecting the best winemaking yeasts from nature. The ever-more challenging conditions of fermentation have propelled Lallemand to develop a new production process – which optimizes the reliability of alcoholic fermentation and reduces the risks of fermentation off-flavours. YSEO® yeasts are 100% natural and non-GMO.'

LALVIN QA23[®]



APPLICATIONS

The vinification on clarified or highly clarified white musts at low temperature is a process applied to a large number of wineries around the world on noble types of grape varieties such as the Muscat, the Sauvignon, the Chardonnay and the Viognier and also on neutral types of grapes such as the Colombard and the Trebbiano. This type of winemaking, generally made without aeration can be problematic for most of the yeasts, especially if the deficiencies they cause combine with a low content in assimilable nitrogen.

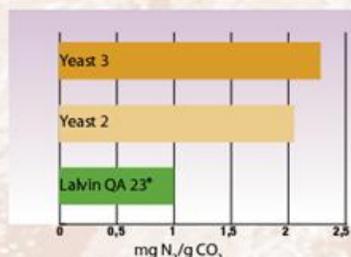
Lalvin QA23[®], selected on soil types from the area of the appellation of Vinhos Verdes in Portugal offers qualities of fermentative security bound to a weak demand in assimilable nitrogen and O₂.

Moreover this yeast combines its essential qualities with abilities to enhance citrus-fruit-type aromas (lime, grapefruit) in the aromatic white grapes.

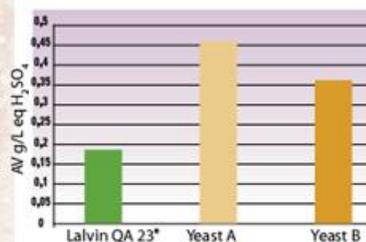
MICROBIOLOGICAL AND OENOLOGICAL PROPERTIES

- *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*
- Competitive factor
- Tolerance to alcohol : up to 16%
- Average lag phase
- Fast fermentation rate
- Fructophylic yeast well completing the fermentations
- Optimum temperature range: 14 to 28°C
- Very low requirement in assimilable nitrogen, at any temperature (18 to 28°C)
- Low requirement in O₂
- Low production of volatile acidity : < to 0.2g/L eqH₂SO₄ as an average
- Low SO₂ production
- Low production of H₂S due to the low requirement in assimilable nitrogen
- Low foam formation

FERMENTATIVE SECURITY AND AROMAS



Comparison of the needs in assimilable N₂ between different yeasts in a synthetic N₂-deficient must (Julien, 2000)



Comparison of the production of volatile acidity between 3 yeasts in the vinification on a highly clarified must of 20 NTU of turbidity.

| Type of vine | Wine-growing region | Aromas |
|--------------------|---------------------|--|
| Chardonnay | Oregon, Chile | Citrus fruits, pineapple |
| Muscadet | Loire Valley | Aromas of white-flesh fruits (young wines), dry fruits (wines after aging) |
| Ugni-blanc | Gers | Fresh citrus fruits, floral aromas (peony and rose) |
| Muscat petit-grain | Roussillon | Citrus fruits, pineapple, white peach |

Table realized with tasting carried out by professionals on winemaking made on vintages 1992 to 1994.

DOSAGE

White winemaking : 25 to 40g/hL

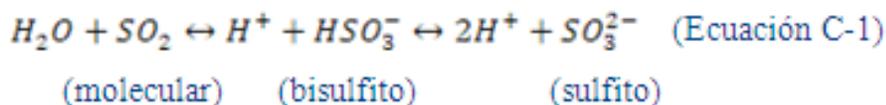
INSTRUCTIONS FOR USE

- 1°/ Rehydrate in 10 times its weight of water (temperature between 35 and 40°C).
- 2°/ Dissolve carefully by gentle stirring and wait for 20 minutes.
- 3°/ Add to the must. The temperature difference between the must to be inoculated and the rehydration medium should never be over 10°C (if any doubt, please contact your supplier or Lallemand).
- 4°/ The total rehydration duration should never exceed 45 minutes.
- 5°/ It is essential to rehydrate the yeast in a clean container.
- 6°/ The rehydration in must is not advisable.

Anexo C: Adición de SO₂

En este trabajo se buscó emular el proceso de sulfitación o adición de SO₂, el cuál es realizado para evitar el crecimiento de microorganismos, en especial levaduras salvajes y bacterias que contiene el mosto después de ser extraído de las bayas de uva. Además ayuda a evitar la oxidación de compuestos fenólicos por la acción de la enzima fenol oxidasa, la que es inhibida por la presencia de SO₂. Para determinar las cantidades a agregar se revisó la literatura: Fermented Beverage Production (Boulton, R., 1995; Ewart, 2003; Lea & Piggott, 2003).

El SO₂ al encontrarse en una solución acuosa puede presentar 3 formas: SO₂ molecular, ión bisulfito HSO₃²⁻, e ión sulfito SO₃²⁻ (Ecuación C-1). Las proporciones en que están presentes estas formas dependen fuertemente del pH del medio acuoso. Además, en medios más complejos, SO₂ puede estar tanto de forma libre o formando enlaces con compuestos presentes en el medio como acetaldehído u otros compuestos con un grupo carbonilo (Navarro-Avino et al.). El SO₂ que se encuentra libre, es él que se encuentra en las 3 formas previamente descritas, y es el SO₂ molecular libre el que realiza la actividad antimicrobiana (Macris & Markakis, 1974).



Luego, la cantidad a agregar en vinos y mostos vinos depende principalmente del pH. En el caso de vinos blancos, la acción es principalmente antimicrobiana. En un mosto blanco, si el pH es menor a 3,3, se recomienda agregar entre 60-80 mg/L de SO₂ libre, y si el pH es mayor a 3,7, se recomienda agregar entre 100-120 mg/L de SO₂ libre. En el caso de mosto tinto, el efecto del SO₂ es antimicrobiano y antioxidante de compuestos fenólicos que otorgan el color tinto. Para mostos tintos, en la referencia (Boulton, R., 1995; Lea & Piggott, 2003) no se da tanta importancia al pH para la adición de SO₂, y solo se recomienda agregar una cantidad en un rango de 25-75 mg/L, con un promedio de 50 mg/L de SO₂ libre.

Para las condiciones experimentales usadas, dado que se usó un mosto sintético, cuya fase de azúcares fue autoclavada previo a la mezcla con las otras fases, y que en la mezcla de los otros elementos se realiza una filtración con tamaño de poro de 0.2 μm, se determinó que la cantidad a agregar debía ser menor a la recomendada por la literatura, dado que la presencia de microorganismos en el mosto sintético debería haber sido muy baja. Así, se determinó agregar una cantidad de 20 mg/L de SO₂ libre.

Para agregar esta cantidad, se utilizó una solución de Metabisulfito de Potasio (K₂S₂O₅), que permite entregar entre 52% a 55% de su peso en SO₂ libre de acuerdo a una ficha técnica obtenida del proveedor Oenofrance (Figura C-1).

Con esta información, se calculó que al agregar 5 ml por litro de mosto de una solución con concentración 0,7558 g/L permitían entregar aproximadamente 20 mg/L de SO₂ libre, el cuál a un pH de 3,5 (figura C-2), entrega una concentración de

4 mg/L de SO_2 molecular libre (aproximadamente 2% de la concentración de SO_2 libre (Macris & Markakis, 1974; Lea & Pigott, 2003).

Figura C-1: Hoja Técnica de Metabisulfito de Potasio



AZ3
OENO

AZ3 Oeno SLL
Polígono Ezilago
Parc. 5 A/A1
Aptdo. 212
20120 Hernani (Gipuzkoa)
Tel. : 943 336332
Fax : 943 336332
az3oeno@az3oeno.com
www.az3oeno.com



Oenofrance
Le Vin pour Culture

Metabisulfito de potasio

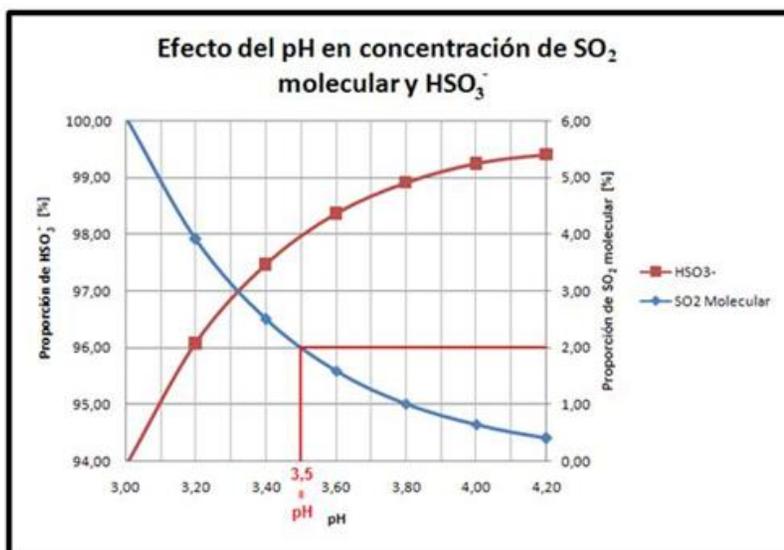
El Metabisulfito de Potasio se utiliza para sulfitar los mostos y los vinos.
Libera 52 a 55 % de su peso en SO_2

Características :

| | | |
|---|----------------------------------|----------------------------------|
| Propiedades antisépticas, antioxidásicas y antioxidantes | Fórmula | $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ |
| | PM | 222,33 |
| | SO_2 | > 56 % |
| | $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ | > 97,2 % |
| | KCl | 10 mg/kg |
| | K_2SO_4 | 1 % |

- Densidad: 1,4 a 1,6 kg/L
- Temperatura de descomposición ≥ 80 °C
- Las soluciones de Metabisulfito de Potasio están formadas por sulfito ácido de potasio.
- El Metabisulfito de Potasio absorbe la humedad del aire y se oxida a sulfato.

Figura C-2: Gráfica que muestra relación entre SO_2 molecular y Bisulfito (HSO_3^-), en rojo se muestra pH 3,5 de un mosto.



Anexo D: Protocolo de Hidratación de Levaduras secas activas

Materiales:

1 frasco Schott.

2 Matraces Erlenmeyer.

1 probeta de 50 ml.

Microscopio.

Cámara de Neubauer.

Campana de Flujo Laminar.

1 tubo Falcon de 50 ml.

Baño Termostatado.

Hielo.

Caja con puntas de Micropipetas de 1000 μ l.

1. Autoclavar:

Una solución de glucosa al 2% p/p (4 gr de glucosa en 200 ml de H₂O).

2 Matraces Erlenmeyer (cada uno tapado con papel de aluminio y papel).

1 probeta de 50 ml.

Caja con puntas de Micropipetas de 1000 μ l.

2. Pesar 0,5 g de levadura de la cepa a rehidratar en un tubo Falcon de 50 ml.

3. Calentar la solución de glucosa en un baño termostatado a 40° C.

4. Agregar en campana de flujo laminar 20 ml de glucosa 2% a 40° C junto con los 0,5 g de levadura en un matraz Erlenmeyer.

5. Tapar el matraz, retirarlo de la campana y mantener por 15-20 minutos a 37° C en el baño termostatado. Utilizar hielo en caso necesario para bajar la temperatura del baño.

6. Retirar el matraz del baño, y agregar en campana de flujo laminar 20 ml de glucosa 2% p/p al matraz Erlenmeyer.

7. Tapar el matraz, retirarlo de la campana, llevarlo al baño y mantener por 15-20 minutos a una temperatura entre 7 a 5° C menor que la anterior en el baño termostatado. Utilizar hielo en caso necesario para bajar la temperatura del baño.
8. Repetir pasos 6 al 7 hasta llegar a la temperatura de inoculación. (15 o 28°C)
9. Tomar una muestra dentro de campana de flujo laminar, usando puntas de micropipeta autoclavadas, y contar células en una cámara de Neubauer, diluir de acuerdo a lo necesario (100 veces recomendado).
10. Calcular el volumen de inóculo a agregar como:

$$\text{Volumen de Inóculo} = \frac{1 \times 10^9}{\text{Número de Células por ml}} \cdot (\text{Ecuación D-1}) \uparrow$$

Agregar (150 o 75 ml) – *Volumen de Inóculo* de agua miliQ autoclavada para completar volumen de reactor. (150 ml para fermentaciones de 2 L, y 75 ml para fermentaciones de 1L). \uparrow

Comentarios:

Se recomienda no demorar más 1 hora en el tiempo total de rehidratación, por lo que se aconseja usar tiempos de 15 minutos en el baño y pasos de temperatura de 7° C en cada etapa para rehidratar levaduras destinadas a fermentaciones a baja temperatura (15° C), y usar tiempos de rehidratación de 20 minutos con pasos de temperatura de 5° C para rehidratar levaduras en fermentaciones a alta temperatura (28° C).

Anexo E: Microoxigenación

La simulación del proceso de disolución de oxígeno dentro del mosto fue abordada de una forma experimental sencilla, dado que una aproximación más rigurosa hubiese requerido un trabajo más profundo que el considerado para esta parte del experimento.

El proceso de microoxigenación del mosto es un elemento utilizado durante los últimos años para simular el proceso de oxigenación que ocurre durante el envejecimiento de un vino en bodega (Kelly & Wollan, 2005). El objetivo es provocar cambios favorables en aroma y textura que al agregar cantidades pequeñas de oxígeno durante la fermentación alcohólica (Parish et al., 2000). La presencia de oxígeno no es un fenómeno único debido al uso de microoxigenación de mostos, sino que procesos como el remontaje de mostos tintos en fermentación, con el objetivo de aumentar la extracción de color del sombrero de hollejos, también aportan a la disolución de oxígeno en el mosto. La presencia de oxígeno, tanto en vinos como en mostos, puede producir diversos efectos donde destacan la oxidación de compuestos fenólicos, influenciar el crecimiento de microorganismos no deseados, y cambios de coloración y astringencia de vinos por la polimerización de

compuestos fenólicos y cambios estructurales en taninos, aunque esto último depende también de la concentración de SO_2 (Tao et al., 2007). Si bien existen diversos trabajos acerca de los efectos del oxígeno en el vino, una completa revisión fue realizada por el grupo de W. du Toit (du Toit et al., 2006), aún no ha sido muy estudiado los efectos en la producción de compuestos aromáticos durante la fermentación alcohólica. Un estudio enfocado en la presencia de oxígeno al comienzo de la fermentación alcohólica, señaló que una mayor cantidad de alcoholes superiores y ésteres fueron encontrados en mosto oxigenado inicialmente, pero una mejor razón entre estos compuestos se obtuvo en mostos sin oxígeno inicial (Valero et al., 2002). La mayoría de los trabajos han sido enfocados al estudio del efecto de la presencia de oxígeno en la biomasa y su tasa fermentativa en fermentaciones normales y con problemas (Fornairon-Bonnefond et al., 2003; Rosenfeld et al., 2003), al consumo de oxígeno durante el envejecimiento en lías de levadura (Fornairon-Bonnefond et al., 2003; Fornairon-Bonnefond & Salmon, 2003), o a vías de ingreso del oxígeno en maduración en botella (Lopes et al., 2007). También la cantidad de oxígeno posible de disolver durante la fermentación alcohólica es desconocida, dado que la cantidad de CO_2 disuelto en el mosto afecta la solubilidad del oxígeno y el flujo de transferencia de masa se reduce (Devatine et al., 2007).

La disolución de oxígeno es un fenómeno de transferencia de masa que depende directamente de variables físicas del equipo, en este caso el fermentador utilizado (Nielsen, J. et al., 2003). Además la cuantificación del oxígeno disuelto no estaba disponible en los fermentadores usados. Además, la cuantificación del oxígeno existente anteriormente era solamente relativa, donde la concentración inicial es considerada como el 100%, con el objetivo de observar en pantalla el consumo de oxígeno hasta llegar a 0%.

Es por estas razones que finalmente se decidió consultar a personas cercanas a la industria, y así se obtuvo una respuesta de Fernando Córdova (Laffort), quien utilizó en un trabajo de microvinificación las condiciones resumidas en la tabla E-1.

Tabla E-1: Tabla sobre flujos de oxígeno para microoxigenación en fermentaciones de microvinificación.

| Tipo de Vino | Flujo de Oxígeno | Volumen | Tiempo |
|--|------------------|---------|-----------|
| Blanco | 140 ml / min | 10l | 1 min |
| | | 20l | 2 min |
| | | 30l | 3 min |
| Rojos: Fermentación Alcohólica en curso Densidad > 993 | 140 ml / min | 50Kg | 1 min 30s |
| | | 10Kg | 20s |
| | | 75kg | 2min 15s |
| Rojos : Fermentación Alcohólica terminada Densidad <993 | 140ml/min | 75kg | 1 min 05s |
| | | 50kg | 45 s |
| | | 10kg | 10s |

A partir de esta tabla, se calculó para ambos mostos tintos y blancos la cantidad de oxígeno a agregar. Para mostos blancos, considerando que se agrega como mínimo un volumen total de 140 ml de oxígeno a 10 litros de mosto, y observándose una tendencia lineal al aumentar el volumen de mosto, se extrapola esta información a un volumen de 1 litro de mosto, donde se debería agregar un volumen de 14 ml de O₂. Con esta suposición, y usando el mínimo flujo de aire permitido por el controlador de flujo másico utilizado (180 ml/min), y asumiendo una concentración de oxígeno de 21% v/v en aire comprimido, se calculó el tiempo en que se entregaría el mismo volumen de oxígeno al mosto utilizando un flujo de aire comprimido a 180 ml/min. Así se determinó que un flujo de 180 ml/min de aire comprimido adicionaba el volumen de 14 ml de oxígeno al mosto en un tiempo aproximado de 22 segundos.

Al usar los datos de mostos tintos, considerando que a 10 Kg de mosto se agrega 20 segundos a un flujo de 140 ml/min de oxígeno, agregándose un volumen de oxígeno de 46,7 ml. Nuevamente se extrapola esta cantidad a un volumen de 1 L de mosto, en este caso se asumió una densidad cercana a 1 g/ml del mosto, obteniéndose así un volumen de oxígeno a agregar 4,7 ml de oxígeno a 1 L de mosto. Luego, usando los mismos supuestos anteriores, se calculó el tiempo necesario para agregar ese mismo volumen de oxígeno utilizando un flujo de aire de 180 ml/min de aire comprimido, que se tradujo en un tiempo de 7,4 segundos.

Así, al observar que los tiempos calculados eran muy distintos para mostos tintos y blancos con la información disponible, se decidió por burbujear un tiempo fijo de 10 segundos por litro con el flujo mínimo de aire permitido por el controlador de masa (180 ml/min) a ambos tipos de fermentación, con el objetivo de mantener las mismas condiciones experimentales para todas las fermentaciones y sólo cambiar la cepa entre ellas. También, dado que para las fermentaciones de 2 litros todas las

concentraciones eran también el doble, se inyectó con el mismo flujo pero el doble de tiempo, i.e. 20 segundos.

Anexo F: Diseño experimental para la comparación de Cepas Industriales de *Saccharomyces cerevisiae* en Producción de Aromas

Temperatura de Fermentación: Se realizarán a ambas temperaturas (15° C y 28° C) con la cepa EC1118, luego con esto se puede determinar que componentes aromáticos son los que predominan un perfil aromático para tinto y blanco, usando la misma levadura. Para cepas de blanco, solamente se realizará a baja temperatura a 15° C (e.g. VIN13) y para las cepas de tinto solamente a alta temperatura a 28° C (e.g. RX60).

Medio de Cultivo: Un mosto artificial, permite definir de manera uniforme el medio. Se utilizará el siguiente medio definido, MS300 modificado.

Fuente de Carbono: Glucosa y Fructosa (120 gr/L c/u).

Fuente de Nitrógeno: Amonio y Aminoácidos presentes en medio MS300 modificado.

Volumen: Fermentadores de 1 L y 2 L.

Cepas: Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo a su capacidad sintetizadora (no liberadora) de aromas fermentativos, tratando de seleccionar un espectro amplio de notas aromáticas entregadas por la levadura. Además se utilizará una cepa neutra de producción aromática que sirve de control.

Tinto: EC1118, RX60 y Uvaferm BDX.

Blanco: EC1118, VIN13, QA23 y X5.

Otros Parámetros de Fermentación:

Agitación: 200 RPM.

Flujo de Nitrógeno: Inicial al comenzar la fermentación para remover oxígeno presente y crear presión positiva en el reactor. Para esto se inyecta un flujo 1 L/min durante 20 minutos, cerrando la entrada de gas después de esto.

pH: Se mantendrá constante a un valor de 3,5. Se controlará el pH mediante la adición de NaOH 5 N.

Adición de Sulfito: De acuerdo a literatura, se sabe que para condiciones industriales se adiciona un promedio de 50 mg/L de SO₂ libre para fermentaciones de vinos tintos y un promedio de 90 mg/L de SO₂ para fermentaciones de vinos

blancos. Como se utilizan condiciones experimentales, se optó por 20 mg/L. Para esto se agrega 5 ml/L solución de $K_2S_2O_5$ con una concentración de 0.7558 g/L que entrega un 52-55% de SO_2 libre equivalente aproximadamente a 20 mg/L, obteniéndose así un 2% de 20 mg/L SO_2 molecular libre.

Oxigenación: Se realizará durante el final de la etapa exponencial y el comienzo de la fase estacionaria. Para fermentaciones de 1 L, durante 10 segundos burbujear un flujo de aire de 180 ml/min. Para fermentaciones de 2 L, se inyecta el doble de tiempo que para fermentaciones de 1 L.

Toma de Muestras:

Para características cinéticas y no-aromáticas se deberá tomar una muestra (10 ml para peso seco, 4 ml para HPLC y 1 ml para conteo de células y medición de DO) del mosto previamente a la inoculación, para fijar los parámetros iniciales, luego se deberá seguir un muestro de los compuestos que interesen cada día, y durante la fase exponencial se deberá realizar un muestro más frecuente.

Al alcanzar sequedad la fermentación, considerada como una concentración de glucosa cercana a 0 g/L y una concentración de fructosa menor a 2 g/L, se tomarán muestras de sobrenadante para análisis sensorial y químico-olfatométrico, para lo cual se centrifugará a 5000 rpm por 10 minutos.

Las muestras finales serán utilizadas para extracción de aromas y su posterior análisis químico-olfatométrico. Una muestra será de 350 ml (mínimo), para realizar una extracción en triplicado de las muestras, las cuales serán sometidas a un análisis de GC-MS y GC-O. Cada 100 ml de muestra se extraerán por medio de extracción líquido-líquido con diclorometano obteniéndose un concentrado de 250 μ l en un vial que será analizado por GC-MS. Luego, a partir de un análisis de los cromatogramas obtenidos por GC-MS, se mezclarán los extractos que se encuentren similares para formar un extracto representativo de cada fermentación, el que será analizado por GC-O.

El resto de cada fermentación será llevado al Centro de Aromas para realizar un análisis sensorial, con mínimo un volumen de 120 ml de muestra.

Extracciones:

La extracción L-L a realizar utilizará diclorometano como solvente para la fase orgánica. Los parámetros de extracción serán los utilizados por el Centro de Aromas de acuerdo al protocolo utilizado por ellos. Esto consiste en una extracción de 2 pasos con un volumen de 25 ml de solvente, utilizando 100 ml de muestra y un tiempo de extracción de 30 minutos. Además, para ayudar a separar las fases, se centrifugan las muestras por 20 minutos a 5.000 rpm después de cada paso de extracción. Una vez realizada la extracción se concentran las muestras en un baño térmico a 40° C y con ayuda de flujo de nitrógeno hasta obtener 250 μ l de extracto final.

Análisis posteriores:

Para los análisis de muestras cinéticas se medirá por HPLC: etanol, ácido cítrico, ácido málico, ácido acético, fructosa, glucosa y glicerol. Además se realizará un seguimiento de biomasa por medio de peso seco, conteo de células y densidad óptica.

De cada extracto obtenido por extracción L-L de la muestra final se realizará un análisis por GC-MS que utilizará como estándar interno 4-nonanol para cuantificar el compuesto por medio de la integración de los cromatogramas.

El análisis de GC-O se realizará a partir una mezcla de extractos obtenidos por extracción L-L, la cuál será analizada por GC-O por el panel.

Cálculos Finales:

En la parte de cinética se calculará los rendimientos de biomasa-nitrógeno, etanol-azúcares totales, y tiempos en alcanzar sequedad de cada cepa.

De las concentraciones obtenidas se realizará una comparación estadística entre las cepas, y se calcularán los OAV de los compuestos que fueron cuantificados.

Perfiles aromáticos de cada fermentación a través del cálculo de las frecuencias modificadas de los aromas percibidos por el panel al realizar GC-O.

Anexo G: Protocolo de extracción líquido-líquido Centro Aromas DICTUC S.A.

MATERIALES:

Placa agitación, para realizar la reacción.

Barra magnética, para agitar la muestra durante la reacción.

Frasco centrífuga de 250 ml con tapa (resistente al diclorometano).

Globo.

Tubo de vidrio con llave de teflón.

Manguera de vacío, para conectar globo al tubo con llave.

Fuente, para introducir frasco con muestra y hielo.

Hielo en escamas, para cubrir paredes del frasco con muestra.

Timer, para controlar el tiempo de reacción.

Centrifuga Sorval con rotor de 5000 rpm.

Pipeta de 10 ml, para medir volumen de muestra a analizar.

Propipeta, para medir volúmenes.

Jeringa Hamilton de 50 μ l, para medir volumen de estándar interno.

Cilindro de N₂, para inflar el globo.

Frasco de vidrio, para recibir las extracciones.

Papel aluminio y tapas para frascos de extracciones.

Freezer, para congelar el agua presente en las muestras.

Baño termoregulado a 40° C - 42° C.

Lana de vidrio.

Pipetas Pasteur.

Viales para GC (HP 2 ml).

Insertos.

Embudos de vidrio chicos.

Sulfato de sodio anhidro p.a. Merck (Na₂SO₄).

SOLVENTE: Diclorometano rectificado.

ESTANDAR: 4-Nonanol (3,5 mg/ml) preparado en etanol absoluto p.a. (Merck).

PROCEDIMIENTO:

0. Encender la centrifuga Sorvall para su acondicionamiento.

1. Medir el volumen requerido a analizar de muestra con una probeta de 100 ml.

2. Completar con H₂O (destilada) hasta obtener un volumen final de 100 ml en caso de ser necesario.

3. Verter la muestra en un frasco de centrífuga de 250 ml.

4. Adicionar estándar interno de Nonanol (100 μ l) al frasco de centrífuga, taparlo y agitar durante 5 minutos sumergido en un baño de hielo de escamas en la fuente.

5. Preparar la muestra en el frasco de centrifuga y mantener en el congelador hasta el momento de la extracción.

6. Una vez que esta todo listo para comenzar la extracción, se adiciona el N₂ gaseoso al globo conectado a la parte superior de un tubo de vidrio que contiene una llave de teflón (dicha conexión se realiza mediante un trozo de manguera para vacío), este tubo atraviesa un tapón de teflón con una rosca con hilo (antes de atornillarse al frasco de centrifuga, se debe proteger el frasco con teflón para evitar dañarlo). La parte inferior de dicho tubo traspasa el tapón quedando unos 2 cm a la vista por donde se adiciona el N₂. Se cierra la llave de teflón para evitar la pérdida de nitrógeno.
7. Adicionar a la muestra 25 ml del solvente a usar para la extracción (diclorometano).
8. Tapar el frasco con el tapón de teflón que contiene el globo con N₂, cerrar bien el frasco y luego abrir la llave para remover el aire y así evitar la oxidación de algún compuesto presente. **ES IMPORTANTE QUE NO HALLA FUGA DE GAS, LO CUAL SE DETECTA SI EL GLOBO SE DESINFLA.** Si el globo se desinfla, rápidamente se cierra la llave, se retira el globo con el trozo de manguera, se rellena de N₂ y se vuelve a conectar, abriendo la llave al ponerlo para continuar con la extracción.
9. Cronometrar los 30 minutos con agitación lo más alta posible. **ES FUNDAMENTAL UNA BUENA AGITACIÓN Y QUE ESTE A BAJA TEMPERATURA.**
10. Al terminar los 30 minutos de extracción, se remueve la tapa de teflón del frasco, y se lleva a la centrífuga Sorvall, donde después de balancearlo los frascos opuestos hasta dejarlos del mismo peso (utilizando diclorometano), se procede a centrifugar los frascos durante 20 minutos a 5000 rpm.
11. Una vez centrifugado, se extrae el solvente (fase orgánica) con una pipeta desde la parte inferior del frasco que es donde se encuentra.
12. Realizar 2 extracciones por muestra (o sea volver al punto 6 y realizar la 2da etapa de extracción). Juntar ambos extractos y congelar para facilitar la eliminación de agua presente.
13. Retirar del congelador la muestra y llevarla a la campana de extracción para realizar la concentración de la muestra.
14. Agregar Na₂SO₄ anhidro a la muestra y filtrar por embudo con lana de vidrio y Na₂SO₄ anhidro en un nuevo frasco. Una vez verificado la ausencia de agua en la muestra, se concentra en baño termoregulado a 40° C-42° C y con la ayuda de flujo de nitrógeno hasta lograr un volumen de inyección (aprox. 200 µl).
15. Traspasar mediante pipeta Pasteur a vial e inyectar en GC-MS. Usar inserto en el caso de inyectar con autosampler.

IMPORTANTE:

En caso de ser vino, usar 100 ml muestra inicial.

El diclorometano tiene problemas al ser concentrado cuando la muestra inicial es destilado y tiene un grado alcohólico muy alto.

Al usar azeótropo como solvente de extracción, este se deposita en la superficie.

Anexo I: Datos y Resultados Fermentativos Extras

Este anexo contiene detalles sobre los datos de las fermentaciones, los archivos donde estan guardados y formatos de las tablas de datos, junto con indicaciones donde pueden ser encontrados. Además tiene resultados no presentados en el cuerpo de la tesis con el objetivo de no alargarla demasiado, pero que si son válidos de mostrar en este anexo. Un resumen de las fermentaciones realizadas es encontrado en el archivo "Resumen Fermentaciones.xls", el que contiene información sobre todas las fermentaciones realizadas: fecha de inicio y termino, duración, fecha de extracción de aromas, estado de análisis HPLC y NOPA, y Comentarios.

Cada réplica de fermentación fue numerada, separada de un punto por la codificación de la fermentación (e.g. F1.2 es la segunda réplica de fermentación con EC-1118 a 15° C).

Tabla I-1: Codificación de fermentaciones realizadas.

| Código | Cepa | Temperatura de Fermentación |
|--------|-------------|-----------------------------|
| F1 | EC-1118 | 28° C |
| F2 | EC-1118 | 15° C |
| F3 | RX-60 | 28° C |
| F4 | Uvaferm BDX | 28° C |
| F5 | VIN-13 | 15° C |
| F6 | X-5 | 15° C |
| F7 | QA-23 | 15° C |

I.1.- Seguimiento de Biomasa, Cinéticas de crecimiento y

NOPA

Los datos de Biomasa se encuentran en los archivos de nombre "Tablas Ferms CEPA TEMPERATURA.xls" donde CEPA puede ser cualquiera de las 6 cepas utilizadas y temperatura es 15°C o 28°C, dependiendo de la temperatura utilizada. Los datos de biomasa de cada Fermentación realizada se encuentran guardados en estos archivos en tablas con las siguientes columnas:

Fecha: Fecha y Hora de toma de muestra.

Horas de Inoculación: Tiempo pasado desde la inoculación hasta la muestra tomada.

Muestra: Codificación de la muestra. (MA: muestra abiótica; M0 Muestra inmediatamente después de comenzar fermentación).

Temp (° C): Temperatura en el instante de toma de muestra.

pH: pH en el instante de toma de muestra.

DO (A): Densidad Óptica medida por Absorbancia a 660 nm.

DF DO: Factor de Dilución de la muestra para medir Densidad Óptica.

Cel/ml (final): Número de células calculado a partir de conteo en una cámara de Neubauer. El término final se refiere a que considera ya el factor de dilución usado para su conteo. El número de células fue calculado como:

$$\frac{\text{Numero de Células}}{\text{ml}} = \frac{\bar{X} \times 10^6 \times DF}{4} \quad (\text{Ecuación I-1})$$

Donde \bar{X} es el promedio de células contadas, y DF es el factor de dilución usado.

Peso Filtro (g): es el peso seco del filtro (tamaño de poro 0,2 μm) previo a su uso para la determinación del peso seco de biomasa.

Peso filtro + cel (g): es el peso seco del filtro después de haber vertido un volumen de muestra determinado y haber lavado las células con el doble del volumen de muestra en agua (volumen de muestra: 10 ml usualmente) .

Vol Peso Seco (ml): es el volumen de muestra con que fue medido el peso seco, el doble de éste volumen de agua destilada fue utilizado para lavar las células en el filtro.

Biomasa Peso Seco: Es el valor del peso seco de la biomasa calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Peso Seco Biomasa} \left(\frac{\text{gr}}{\text{l}} \right) = \frac{(\text{Peso Filtro} + \text{Cel} - \text{Peso Filtro})}{\text{Volumen de Peso Seco}} \times 1000 \left(\frac{\text{gr}}{\text{l}} \right) \quad (\text{Ecuación I-2})$$

DO*Dfdo: Es el valor de Densidad Optica (DO) medido multiplicado por su valor de dilución.

Nomb.: es el nombre de la persona que realizó la toma de muestras (MB: Marcela Besomi; RV: Rodrigo Vilches; CV: Cristián Valenzuela; VG: Víctor Guadalupe).

Observaciones: En caso de ocurrir un inconveniente o realizar un proceso importante, se anotaba. (e.g. adición de pulso de oxígeno al final de fase exponencial o inicio fase estacionaria).

Además en cada hoja de cálculo con datos de fermentación se señala la cepa utilizada, la temperatura, el fermentador utilizado, la fecha de inicio, la fecha de término, el archivo de HPLC con que fue realizada su cuantificación, y el archivo con que fue realizada la calibración para realizar la cuantificación y comentarios sobre ésta. Junto con la hoja, que lleva nombre "Ferm. X.Y CEPA TEMP" se encuentran las gráficas "G1 Ferm. X.Y CEPA TEMP" y "G2 Ferm. X.Y CEPA TEMP" (X.Y es el código de la fermentación Tabla I.1), donde G1 consiste en una gráfica del número de células y la biomasa peso seco respecto al tiempo de la fermentación, y G2 consisten en una gráfica de la DO y la biomasa peso seco respecto al tiempo de la fermentación.

A continuación se muestra el resto de las curvas de cinética no presentadas y un detalle al respecto de los problemas encontrados en la realización de las fermentaciones (codificación de replicas de fermentaciones, ver Materiales y Métodos):

La replica F1.2 de la cepa EC-1118 a 28° C donde por problemas de control de temperatura al inicio de la fermentación, se obtuvo una fase lag mucho mayor que las otras replicas.

La replica F2.3 de la cepa EC-1118 a 15° C donde solamente por tener un disposición diferente de las cuchillas del agitador del reactor, se observó una biomasa mayor a las otras replicas. Se señala también que de acuerdo a datos de fermentaciones anteriores realizadas por alumnos antiguos del grupo, la cepa EC-1118 ha presentado una amplia variabilidad en biomasa a baja temperatura en las condiciones de fermentación utilizadas.

La replica F5.1 de la cepa VIN-13 a 15° C donde por problemas de temperatura se observó un aumento de biomasa al final de la curva.

Las replicas F6.1 y F6.3 de la cepa X-5 a 15° C, donde la replica F6.1 por problemas de cuantificación de azúcares por medio de HPLC, se pensó que la fermentación se había estancado y se mantuvo corriendo por más del tiempo necesario, y la replica F6.3 por problemas de temperatura, presentó un crecimiento al final de su curva.

Figura I-1: Cinéticas de Crecimiento EC-1118 28° C y Uvaferm BDX

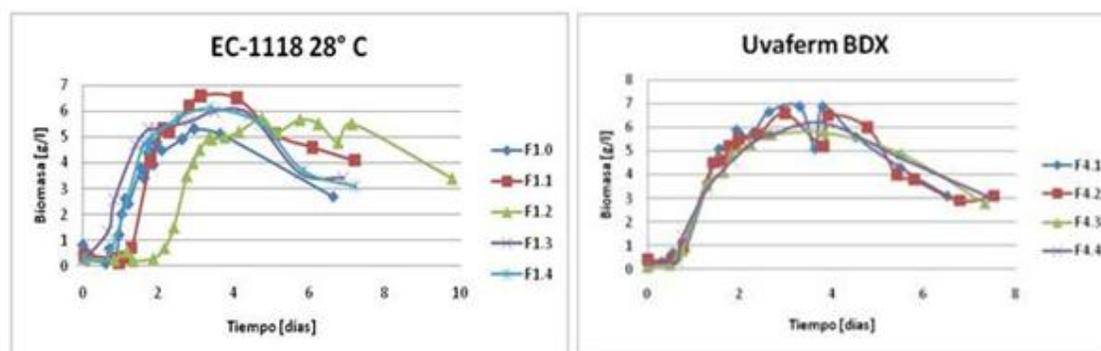
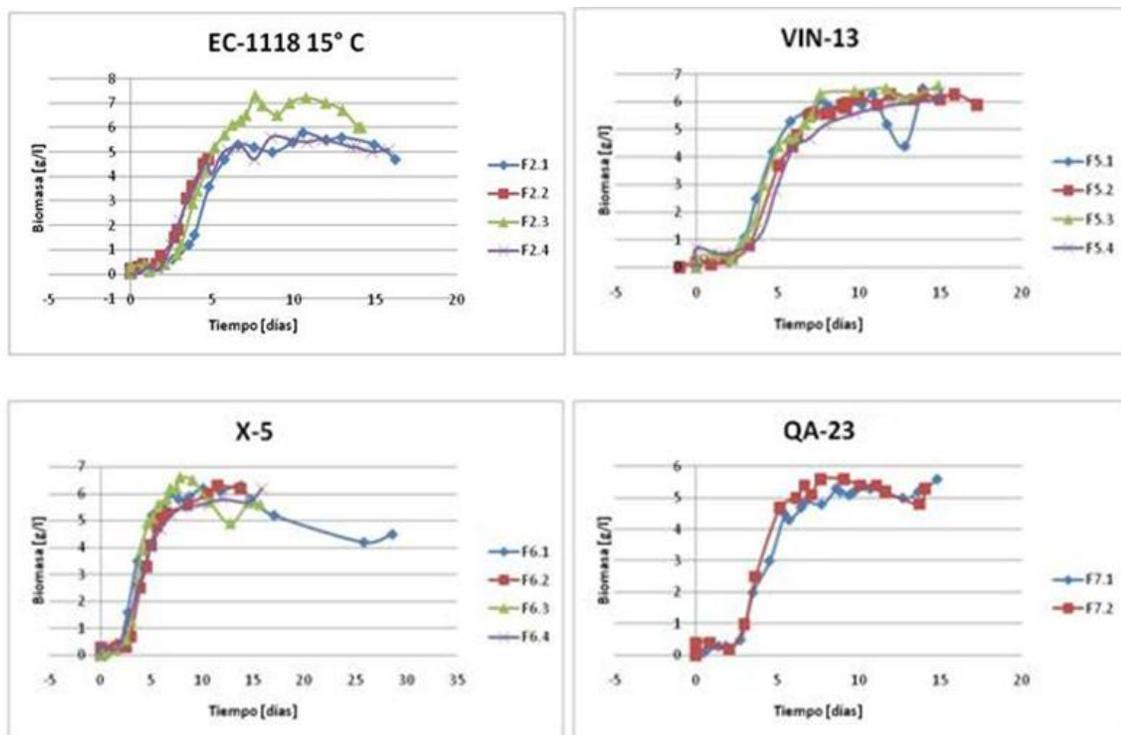


Figura I-2: Cinéticas de Crecimientos EC-1118 a 15° C, VIN-13, X-5, y QA-23.

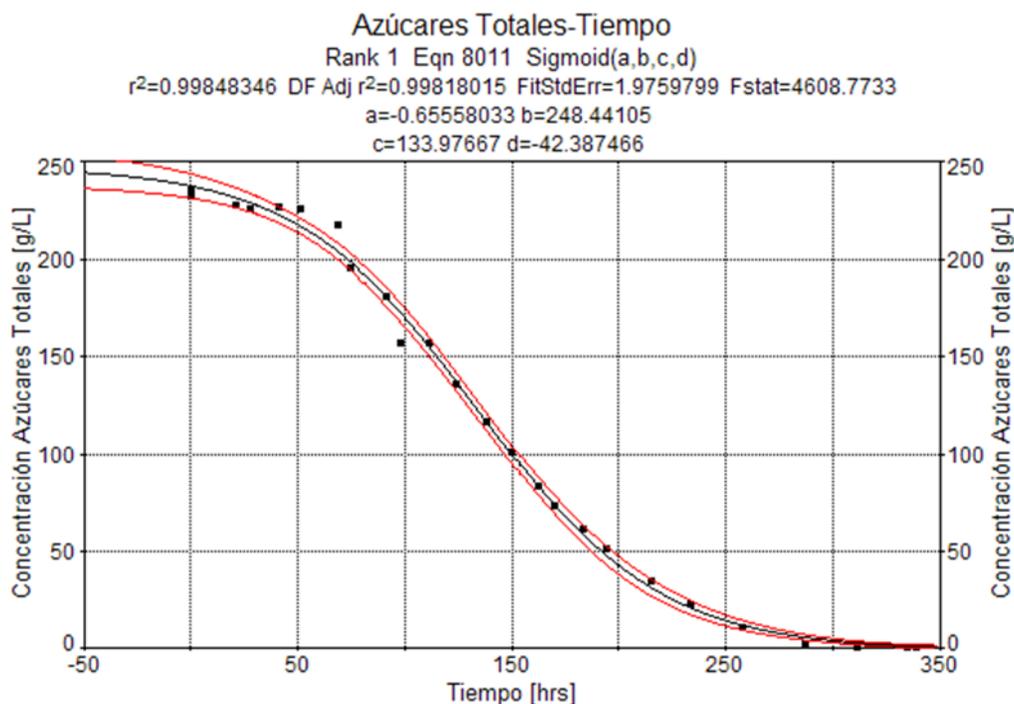


Los archivos del consumo de nitrógeno por medio de NOPA se encuentran en el archivo "Datos Crudos NOPA.xls", mientras que los rendimientos calculados se encuentran en el archivo "Resumen Datos NOPA.xls".

I.2.- Ajuste de curvas utilizando programa TableCurve2D

Como fue mencionado en la sección de Materiales y Métodos, se utilizó el software TableCurve2D para realizar el ajuste de datos de biomasa peso seco, y concentraciones de azúcares (glucosa, fructosa y azúcares totales) y etanol para calcular la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}), las tasas máximas de consumo y producción volumétricas de azúcares y etanol, respectivamente, y además el tiempo de sequedad de cada fermentación. En la figura I-3, se presenta un ejemplo de la curva de ajuste para estimar el tiempo de sequedad, donde los puntos representan concentraciones de azúcares totales respecto al tiempo, la línea negra es el ajuste realizado, y en rojo se presentan los intervalos de confianza para el ajuste.

Figura I-3: Ejemplo de curva de ajuste en TableCurve 2D para fermentaciones con EC-1118 a 28° C.



Línea negra: ajuste a los datos.

Línea roja: Intervalos de confianza.

Para el caso de estimar el tiempo de sequedad, se dio un peso mayor a los datos de concentración de azúcares totales finales, pidiéndole al programa que ajusta mejor esos datos que los del comienzo de la curva. Una vez realizado el ajuste, el programa permite obtener el valor de tiempo en que la concentración de azúcares totales es igual a 2.

En el caso del ajuste para tasas de consumo o producción y tasa de crecimiento máximo, se hizo el mismo procedimiento, con la excepción de asignar un peso mayor a los datos obtenidos en la fase exponencial, donde se presentan las máximas tasas de consumo o producción, y tasa de crecimiento máximo. El programa entrega las pendientes de las curvas, y pueden ser ordenados los valores para obtener el máximo valor.

I.3.- Consumo de Azúcares y Producción de Etanol

Los datos de consumo de sustratos y de producción de etanol y glicerol se encuentran tanto en sus formas procesadas, como los datos crudos obtenidos de los reportes del programa de HPLC. Las muestras eran analizadas diluidas 10 veces, y las últimas 5 a 3 muestras de la fermentación eran también inyectadas sin diluir. Así, para las últimas 5 a 3 muestras la concentración en las gráficas es calculada como el promedio entre estas dos mediciones. Para el cálculo de rendimientos, se usaron como datos de concentraciones al final de la fermentación, los valores

obtenidos sin diluir, ya que éstos deben ser más exactos porque no tienen el error asociado al realizar la dilución de las muestras.

Los datos crudos para cada fermentación realizada se encuentran en el archivo "Datos crudos HPLC.xls" en una hoja de cálculo, donde se encuentran los datos tanto diluidos como los sin diluir, y el promedio de ellos. Además, junto con las hojas de cálculo se encuentran gráficas de consumo de azúcares (glucosa y fructosa), y producción de etanol y glicerol. Los datos procesados, donde se calcularon además las concentraciones en C-mol de cada metabolito, se encuentran en el archivo "Resumen Datos HPLC.xls" y se encuentran agrupados por condición experimental (cepa y temperatura), donde están todas las replicas utilizadas en el cálculo de rendimientos. También, dentro de la hoja se encuentran gráficas de consumo de azúcares, y producción de etanol y glicerol con todas las réplicas para su comparación. Además, un resumen de los rendimientos de etanol-azúcares calculados se encuentra en la hoja "Resumen Rendimientos". A continuación se presentan las gráficas de consumo de glucosa y fructosa, las cuáles permitieron comparar las diferencias de consumo de ambas azúcares.

Figura I-4: Cinéticas de Consumo Glucosa-Fructosa EC-1118, RX-60 y UVAferm BDX alta temperatura.

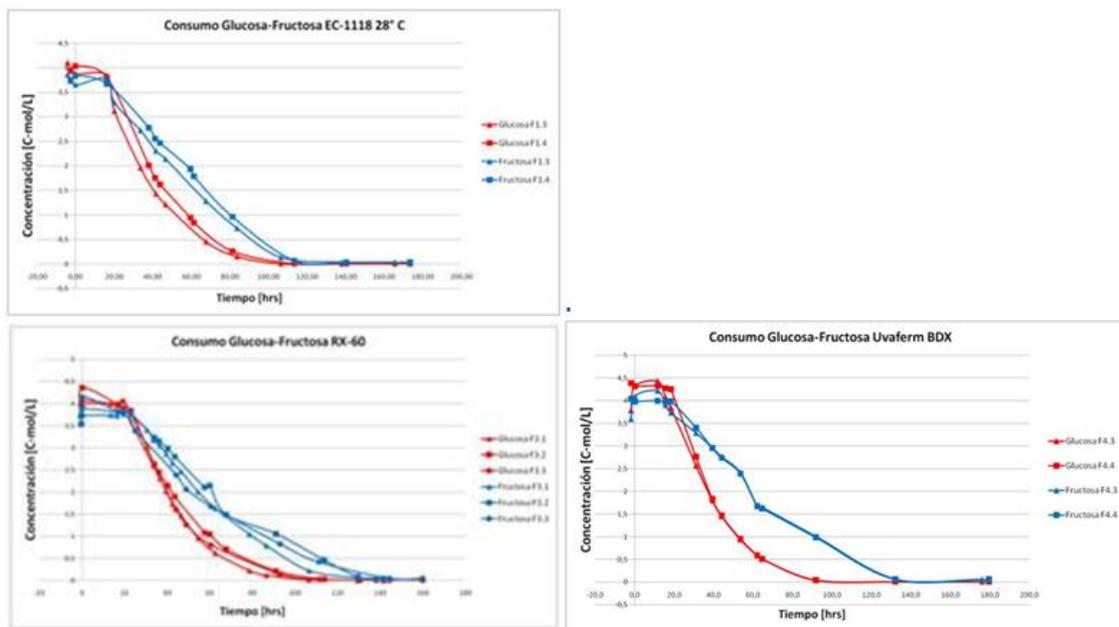
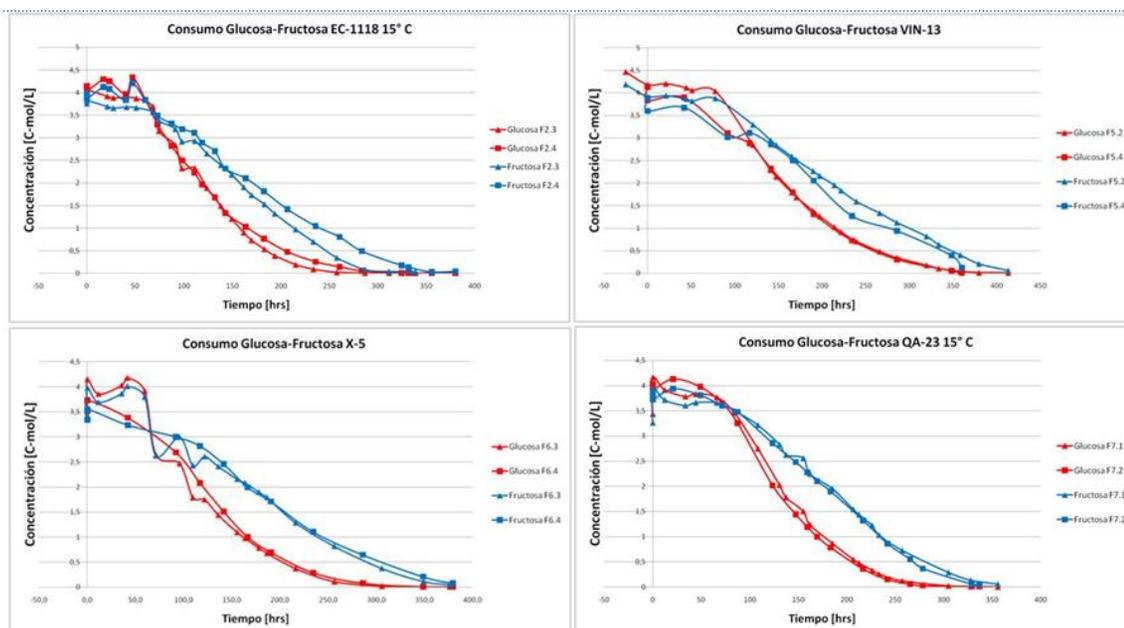


Figura I-5: Cinéticas de Consumo Glucosa-Fructosa EC-1118 baja temperatura



Anexo J: Resultados de Análisis Sensorial

La evaluación sensorial de cada vino fue realizada una vez terminadas todas las fermentaciones planeadas en el experimento. Luego, algunas muestras permanecieron un tiempo mayor almacenadas en las condiciones establecidas (4° C con espacio de cabeza purgado). Las muestras fueron analizadas sensorialmente durante el mes de marzo del año 2008. La siguiente tabla presenta el tiempo aproximado que las muestras estuvieron almacenadas previo a su evaluación sensorial:

Tabla J-1: Tiempos de almacenamiento de muestras utilizadas para los análisis de evaluación sensorial.

| Temperatura | Cepa | Replica* | Tiempo de Almacenaje |
|-------------|-------------|----------|----------------------|
| 28° C | EC-1118 | F1.3 | 7 meses |
| | | F1.4 | 7 meses |
| | RX-60 | F3.2 | 3 meses |
| | | F3.3 | ½ mes |
| | Uvaferm BDX | F4.3 | 2 meses |
| | | F4.4 | 2 meses |
| 15° C | EC-1118 | F2.3 | 3 meses |
| | | F2.4 | 3 meses |
| | VIN-13 | F5.2 | 7 meses |
| | | F5.4 | ½ meses |
| | X-5 | F6.3 | 2 meses |
| | | F6.4 | ½ mes |
| | QA-23 | F7.1 | 3 meses |
| | | F7.2 | 3meses |

*Codificación, ver Materiales y Métodos Tabla I-1.

Los resultados de Análisis Discriminante pueden ser encontrados en el archivo "Resultados Análisis Discriminante.xls"

1.- Resultados de Análisis Descriptivos

Para análisis descriptivo se utilizaron los siguientes descriptores generados por el panel de Evaluación Sensorial del Centro de Aromas:

Los descriptores propuestos fueron los siguientes:

Tabla J-2: Descriptores utilizados por el panel de Evaluación Sensorial del Centro Aromas para la descripción de las muestras por QDA.

| | | | | |
|--------------|-------------------|-----------|----------------------|---------------|
| Plátano | Jugo de durazno | Pan añejo | Rosas | Candy plátano |
| Oxidado | Cola fría | Pasas | Pasto cortado | Leche |
| Manzana roja | Miel | Vinagre | Pomelo | Piña |
| Caramelo | Alcohol irritante | Uva | Mermelada de durazno | |

Los resultados de QDA pueden ser encontrados como datos crudos en los archivos del software SensTools, los que se encuentran en la carpeta "Datos SensTool QDA". Un resumen de los datos, más los valores de p calculados por análisis ANOVA de las sesiones realizadas se encuentra en el archivo "Resumen Datos QDA.xls". Los

perfiles obtenidos para cepa se presentan a continuación (todos estos resultados se encuentran en el archivo "Resultados QDA.xls"):

Figura J-1: Perfil Aromático de cepa EC-1118 fermentada a 28° C.

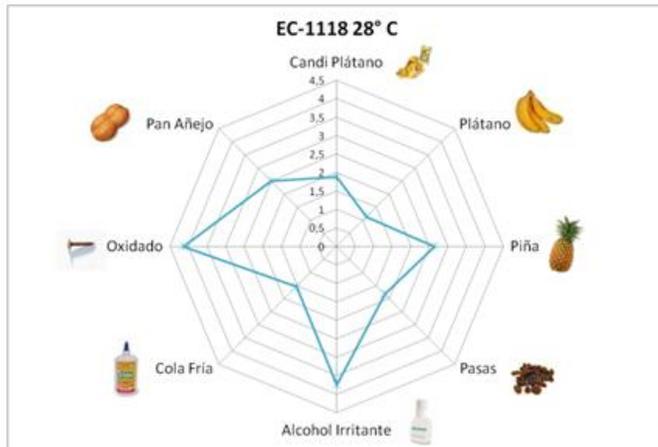


Figura J-2: Perfil Aromático de cepa RX-60 fermentada a 28° C.

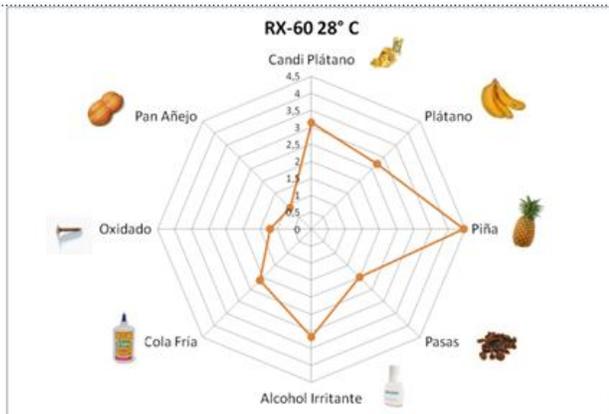


Figura J-3: Perfil Aromático de cepa Uvaferm BDX fermentada a 28° C



Figura J-4: Perfil Aromático de cepa EC-1118 fermentada a 15° C

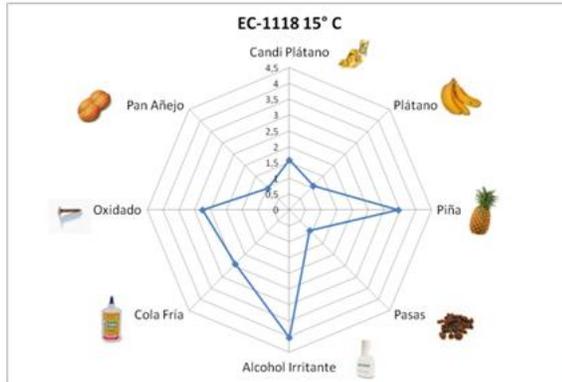


Figura J-5: Perfil Aromático de cepa VIN-13 fermentada a 15° C



Figura J-6: Perfil Aromático de cepa X-5 fermentada a 28° C

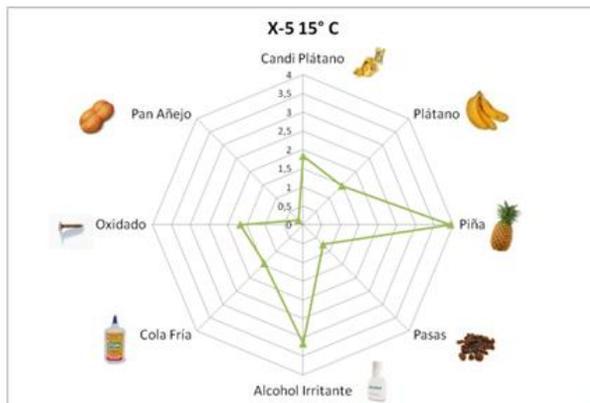
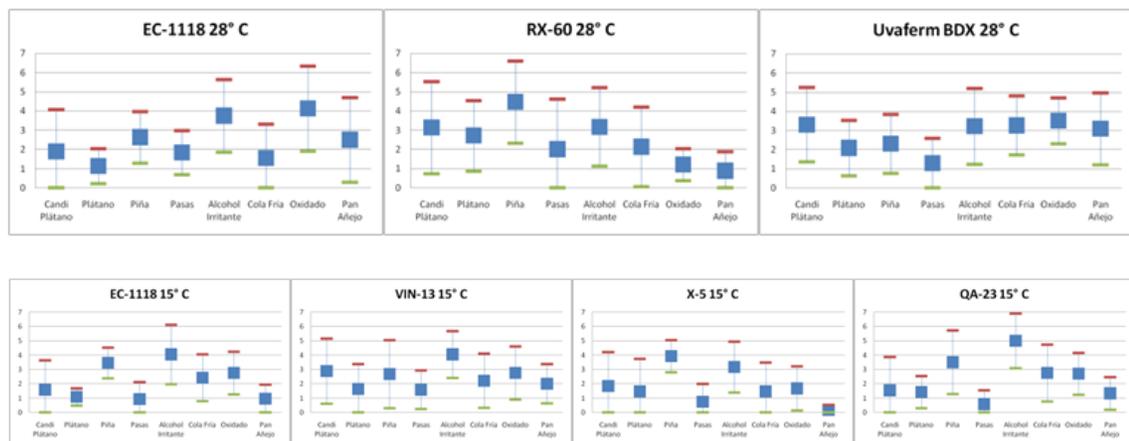


Figura J-7: Perfil Aromático de cepa QA-23 fermentada a 15° C



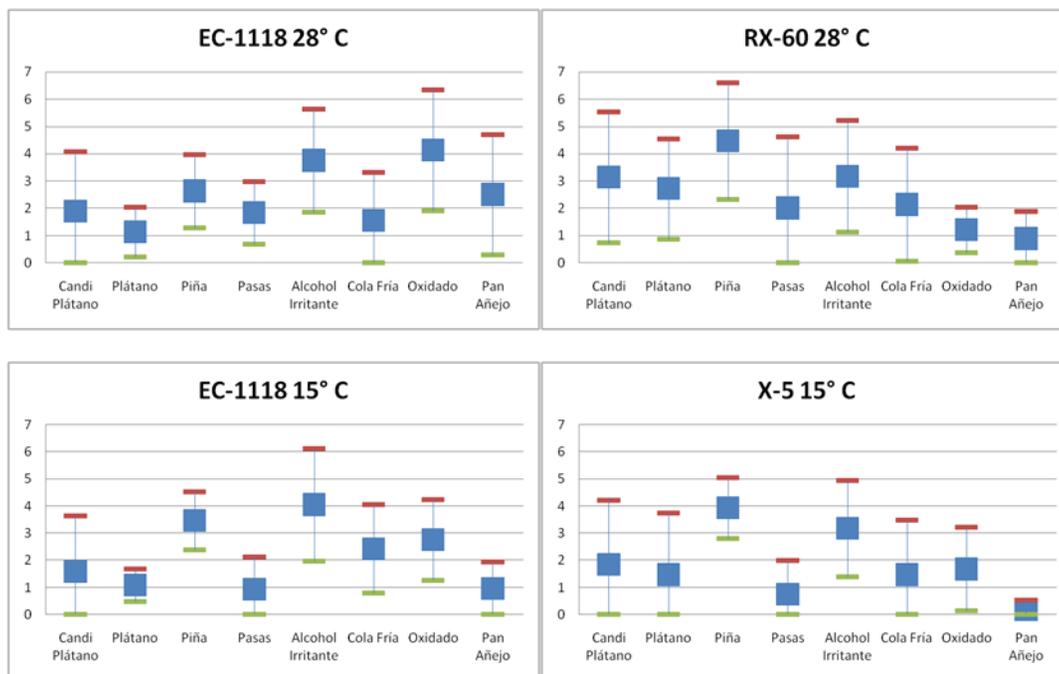
Se graficó los valores entregados en cada perfil, junto con el intervalo dado por la suma y resta de su desviación estándar, con el objetivo de comparar las variabilidades de los descriptores utilizados.

Figura J-8: Comparación de perfiles aromáticos todas las cepas, considerando desviaciones estándares de descriptores.



Con estos gráficos se observa las mismas diferencias y semejanzas mostradas por los diagramas web de cada perfil aromático, pero tiene la ventaja de observar las desviaciones estándares, y su impacto en estas diferencias y semejanzas. A continuación, se muestra un par de figuras para señalar con mayor detalle estas diferencias:

Figura J-9: Comparación de perfiles aromáticos de cepa control con cepa RX-60 y X-5, considerando desviaciones estándares de descriptores.



Al comparar las cepas EC-1118, RX-60 y X5, se observa que las cepas poseen diferencias en la amplitud de los intervalos entregados por QDA. Las cepas que entregan aromas fermentativos (X-5 y RX-60) poseen una varianza mayor en el aroma plátano que EC-1118 (acetato de isoamilo) a ambas temperaturas. Por su parte, EC-1118 a 28° C posee un intervalo mayor en pan añejo al comparar con RX-60. Esto entrega información sobre la variabilidad que el panel percibe un descriptor específico, variabilidad que es distinta según la cepa utilizada para un mismo descriptor.

Con los datos de QDA se realizaron análisis ANOVA One-way para cada temperatura, los cuáles señalaron en que descriptores existían diferencias estadísticas entre las cepas, verificando cuales cepas eran distintas entre sí en aquellos descriptores y el nivel de significancia (α) de esa diferencia. Estos resultados se presentan a continuación en la siguiente tabla:

Tabla J-3: Descriptores con diferencias significativas entre cepas de alta temperatura y nivel de significancia de cada diferencia ($\alpha = 95\%$; 99% ; $99,9\%$).

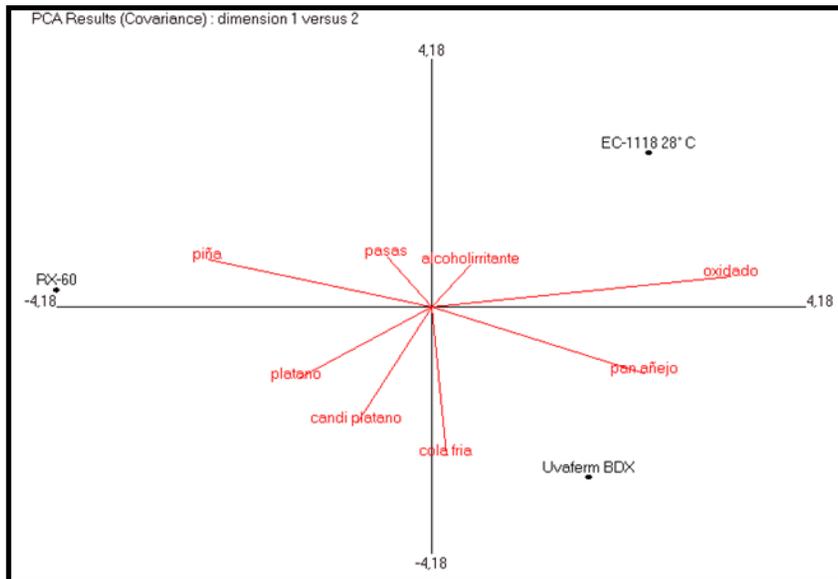
| Relación de Cepas | Plátano | Piña | Cola fría | Oxidado | Pan Añejo |
|------------------------|---------|------|-----------|---------|-----------|
| EC-1118 vs RX-60 | 99% | 95% | - | 99,9% | 95% |
| EC-1118 vs Uvaferm BDX | 95% | - | 99% | - | - |
| RX-60 vs Uvaferm BDX | - | 99% | - | 99% | 99% |

Tabla J-4: Descriptores con diferencias significativas entre cepas de baja temperatura y nivel de significancia de cada diferencia ($\alpha = 95\%$; 99% ; $99,9\%$).

| Relación de Cepas | Caramelo | Alcohol Irritante | Pasas | Cola Fría | Pan Añejo |
|-------------------|----------|-------------------|-------|-----------|-----------|
| EC-1118 vs VIN-13 | 99,9% | - | 95% | - | 95% |
| EC-1118 vs X-5 | - | - | - | - | - |
| EC-1118 vs QA-23 | - | - | - | - | - |
| VIN-13 vs X-5 | 99,9% | - | 99% | - | 99,9% |
| VIN-13 vs QA-23 | 99% | - | 99,9% | - | - |
| X-5 vs QA-23 | - | 99% | - | 95% | 95% |

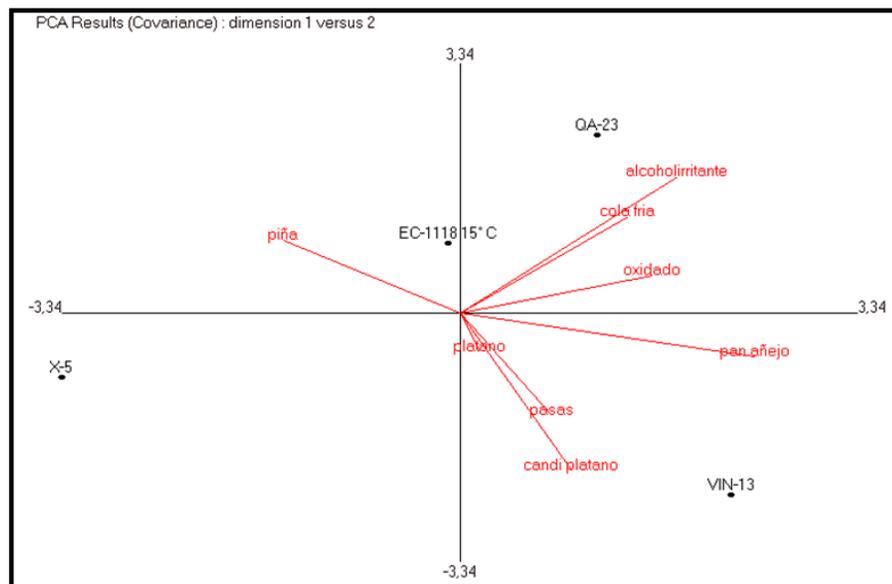
Además, se realizaron análisis de PCA para las cepas separándolas por temperatura, observándose nuevamente un patrón similar de separación al usar todas las cepas (figuras J-10 y J-11).

Figura J-10: PCA de los datos obtenidos por QDA de las cepas que fermentaron a alta temperatura. La primera componente (horizontal) explica el 75% de la varianza, mientras que la segunda componente explica el 25% restante.



A 28° C, se observa que toda la varianza de las muestras es explicada por las 2 componentes principales, siendo piña, plátano, pan añejo y oxidado los descriptores con mayor contribución a la componente 1, que explica un 75% de la varianza.

Figura J-11: PCA de los datos obtenidos por QDA de las cepas fermentadas a 15° C. La primera componente (horizontal) explica el 62% de la varianza, mientras que la segunda componente explica el 35% restante.



A 15° C se observa que existe una diferenciación entre los descriptores en la componente 1 que explica el 62% de la varianza de las muestras. El descriptor piña

se encuentra asociado a valores negativos de la componente 1 y es el único descriptor que entrega éstos valores. El resto de los descriptores se encuentran asociados a valores positivos en la componente. Esto señala el dominio del carácter frutal en las fermentaciones a baja temperatura, sobre el resto de los descriptores utilizados para la descripción. Sin embargo, las varianzas del descriptor piña a 15° C son mayores que las existentes a 28° C, dificultando su discriminación.

2.- Evaluación Sensorial Descriptiva con Panel Experto

Además de los dos análisis realizados y presentados en los resultados, se realizó una evaluación sensorial descriptiva utilizando un panel experto por medio del uso de un Perfil de Libre Elección (FCP Free Choice Profiling). Se les presentó los vinos producidos a un grupo de 4 expertos, integrado por 2 personas que recomendaron las cepas de levaduras de las empresas Lallemand y Laffort, y por 2 enólogos del Consorcio Tecnológico para la Vid y el Vino, VINNOVA S.A. A cada uno se les solicitó que evaluara por separado cada muestra, señalándole que éstas no eran vinos sino aproximaciones a ellos y que su evaluación sólo era orthonasal y no incluía degustación. Se les pidió que evaluaran las muestras y las describieran aromáticamente, dándole a cada descriptor un puntaje en una escala de intensidad de 1 a 9 (donde 1 era la menor intensidad percibida y 9 la mayor).

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la evaluación del Panel experto por medio de Free Choice Profiling, en las cuáles se observaron que los expertos utilizaron descriptores similares a los del panel experto. Se utilizó el siguiente código para evaluarlas:

Tabla J-5: Codificación usada en evaluación sensorial con panel experto.

| | | | | | | | |
|--------|------------------|-------|----------------|-----------------|--------|-----|-------|
| Cepa | EC-1118 28° C | RX-60 | Uvaferm BDX | EC-1118 15°C | VIN-13 | X-5 | QA-23 |
| Código | 265 | 122 | 338 | 755 | 125 | 854 | 379 |

**Generación Vocabulario Descriptivo
Perfil Libre Elección**

Nombre: Pedro Carriles Cobos

Instrucciones: Evaluar sensorialmente las muestras, de izquierda a derecha, y generar atributos que le permitan describir las características aromáticas de cada una de ellas. Adicionalmente utilizar una escala de intensidad de 1 (mínima intensidad percibida) a 10 (máxima intensidad percibida) anotando el score en los espacios asignados.

Código Muestras

| ATRIBUTO | 265 | 396 | 755 | 854 | 122 | 338 | 125 |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Acetaldehído | 8 | 6 | 8 | 8 | 8 | 6 | 8 |
| Papel | 1 | 9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Azufrado | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Petroleo | 1 | 1 | 1 | 6 | 1 | 6 | 1 |
| Aniz | 3 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Clavo de olor | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 | 6 | 1 |
| Citrico | 4 | 1 | 1 | 6 | 1 | 1 | 1 |
| Pasto | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 | 5 | 1 |
| Manzana | 3 | 1 | 1 | 6 | 6 | 1 | 4 |
| Maní | 1 | 1 | 1 | 1 | 6 | 1 | 1 |

Generación Vocabulario Descriptivo
Perfil Libre Elección

Nombre: Jose-Manuel ZABALA

Instrucciones: Evaluar sensorialmente las muestras, de izquierda a derecha, y generar atributos que le permitan describir las características aromáticas de cada una de ellas. Adicionalmente utilizar una escala de intensidad de 1 (mínima intensidad percibida) a 10 (máxima intensidad percibida) anotando el score en los espacios asignados.

Código Muestras

| ATRIBUTO | 265 | 396 | 755 | 854 | 122 | 338 | 125 |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| manzana oxidada | 5 | 3 | 1 | 7 | 2 | 1 | 2 |
| levadura | 5 | 6 | 4 | 1 | 1 | 3 | 2 |
| alcohol | 1 | 3 | 5 | 4 | 5 | 6 | 2 |
| acetona | 4 | 0 | 1 | 1 | 3 | 5 | 6 |
| pegamento uhu | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 |
| parche curita | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| ether | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| vino ventilado | 4 | 5 | 6 | 4 | 5 | 6 | 2 |
| frutilla artificial | 1 | 2 | 2 | 5 | 1 | 0 | 2 |
| leche | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| manzana verde | 3 | 5 | 2 | 4 | 6 | 0 | 5 |
| avellana | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 |

Generación Vocabulario Descriptivo
Perfil Libre Elección

Nombre: Patricio Celedón

Instrucciones: Evaluar sensorialmente las muestras, de izquierda a derecha, y generar atributos que le permitan describir las características aromáticas de cada una de ellas. Adicionalmente utilizar una escala de intensidad de 1 (mínima intensidad percibida) a 10 (máxima intensidad percibida) anotando el score en los espacios asignados.

Código Muestras

| ATRIBUTO | 265 | 396 | 755 | 854 | 122 | 338 | 125 |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Piña | | 4 | 5 | | 4 | | 4 |
| Alcohol | | | | 5 | | 6 | 4 |
| Manjar | 3 | | 4 | 3 | | 3 | 5 |
| vainilla | 5 | | 4 | 3 | | 4 | 4 |
| Membrillo | | 5 | | | | 3 | |
| Pera al jugo | | 8 | 4 | 5 | 7 | | 8 |
| Papaya | | 3 | 3 | | | | 5 |
| chocolate blanco | 6 | | | | 3 | 2 | 4 |
| Flores blancas | | | 5 | 6 | 3 | | |
| Durazno blanquillo | | | 6 | | 4 | | |
| Manzana verde | | | 3 | | | | |
| Manzana oxidada | 5 | 3 | 3 | 4 | | 4 | |
| Platano maduro | | | | | 6 | 3 | 4 |
| cafeo | 7 | | 3 | 4 | | 4 | 5 |
| chirimoya | | 3 | | 4 | 5 | | |
| acetona, barniz | | | | | 3 | 6 | |
| Floral | | 4 | 4 | 8 | 5 | | |
| azucar quemada | 8 | | | | | 3 | |
| Durazno conserv | | | | 7 | | | 3 |

Anexo K: Resultados de Análisis Químico

Los resultados de análisis químico requirieron el uso de múltiples archivos para procesar los datos debido a la extensión del trabajo. Todos estos datos pueden ser encontrados en los archivos que se van a indicar a continuación, y solamente se mostraran los datos más importantes y relevantes para este anexo.

Un total de 15 archivos se utilizaron para la cuantificación e identificación de los cromatogramas de cada réplica. Estos archivos pueden ser encontrados en la carpeta "Resultados Análisis Químicos/Integración/FX.Y/" con el nombre "FX.Y.xls", donde X e Y son números obtenidos de la codificación utilizada en las fermentaciones (X: Cepa y temperatura; Y: replica, Anexo I, tabla I-1). En estos archivos se encuentran una hoja por cada cromatograma, la que contiene una tabla con las siguientes columnas:

Peak: Número de peak.

Compuestos: Compuesto identificado usando el programa AMDIS, se utilizó un código de colores para señalar que base de datos identificó el peak:

La base de datos "Vinos" (color azul), que es una base de datos desarrollada en el Centro de Aromas UC, luego es la que entrega mayor confiabilidad al identificar compuestos.

La base de datos "Aromas" (color verde), base de datos desarrollada en el INRA por parte de Andrea Belancic.

La base de datos "INRAMass" (color blanco), base de datos obtenida del INRA Instituto Nacional de Investigación Agrícola de Francia.

RT: Tiempo de retención del peak.

Ancho del peak.

Área del peak identificado, integrado manualmente de acuerdo a los tiempos de inicio y término de peak entregados por el programa AMDIS.

Tiempo de Comienzo del peak.

Tiempo de Fin del peak.

Concentración: calculada en $\mu\text{g/L}$ de acuerdo a una regla de tres con el área del peak del estándar interno 4-nonanol, agregado para obtener una concentración de $3516 \mu\text{g/L}$ en 100 ml de muestra (a excepción de F5.4 y F6.4, que se agregó una preparación de estándar interno que producía un volumen de $3512 \mu\text{g/L}$).

Además de las hojas de cálculo para cada cromatograma analizado, en el archivo se encuentra una hoja de cálculo con el promedio del tiempo de retención, el promedio de las concentraciones, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada compuesto.

Los datos obtenidos fueron luego puestos en un archivo en común ("Integración Perfiles_Datos_Filtrados.xls", donde se colocaron las concentraciones obtenidas para las réplicas de extracción de cada fermentación en una hoja por cepa. Luego, se eliminaron datos para disminuir la variabilidad de extracción, tratando de reducir el coeficiente de variación a menos que el 10%. Después se hicieron análisis ANOVA One-way para cada compuesto encontrado, chequeando diferencias estadísticas

entre las concentraciones obtenidas por replicado de cada cepa, eliminándose los datos que generaban que las muestras tuvieran desigualdad de varianzas, con el fin de comparar siempre las medias entre replicados. En los casos que no fue posible tener igualdad de varianzas, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de replicados. Así se determinó para cada cepa, el porcentaje de compuestos que tenían diferencias estadísticas entre replicados (Tabla K-1), observándose una gran variabilidad en los datos químicos dados los altos porcentajes obtenidos. Estos resultados se encuentran en el archivo "Chequeo Estadístico Igualdad de Varianza.xls".

Tabla K-1: Porcentajes de Compuestos que fueron identificados y cuantificados para cada cepa que presentaron diferencias significativas entre los replicados.

| Temperatura | Cepa | Porcentaje de Compuestos con Diferencias Significativas entre replicados |
|-------------|-------------|--|
| 28° C | EC-1118 | 68% |
| | RX-60 | 88% |
| | Uvaferm BDX | 56% |
| | | |
| 15° C | EC-1118 | 74% |
| | VIN-13 | 72% |
| | X-5 | 63% |
| | QA-23 | 76% |

Después, a partir de los datos ya filtrados, considerando la varianza microbiológica, se comenzó a comparar entre las cepas para buscar compuestos comunes entre ellas y al mismo tiempo se buscó los umbrales de los compuestos comunes. Esta comparación se encuentra en la hoja "Lista Final de Compuestos" del archivo "Integración Perfiles_Datos_Filtrados.xls". Con los compuestos, se construyó el archivo "Comparación Estadística Fermentaciones.xls" y el archivo "Resumen Concentración OAV.xls". El primer archivo contiene todas las concentraciones filtradas para eliminar varianza en la extracción, con las cuáles se calculó para cada compuesto común un promedio, su desviación estándar y su coeficiente de variación por cepa. En el segundo archivo se calcularon los OAV de los promedios de las concentraciones de los compuestos comunes, cuyos umbrales de olfativos fueron posibles encontrar.

Además, se identificaron los compuestos comunes que fueron también encontrados en el análisis de los cromatogramas del medio MS300. Se determinó que 14 compuestos se eran comunes y se calcularon los porcentajes que la concentración del compuesto en MS300 representaba en el promedio de las concentraciones encontradas en los caldos. Se comprobó que 3 de los compuestos con valor de OAV mayor que 1 estaban entre estos 14 compuestos, pero que las concentraciones iniciales fueron mucho menores que las obtenidas al finalizar la fermentación.

Tabla K-2: Compuestos comunes encontrados también en medio MS300.

| Compuesto | Concentración de MS300 [µg/L] | Concentración Promedio en Caldos [µg/L] | Porcentaje Concentración MS300 en Concentración promedio encontrada en Caldos |
|---|-------------------------------|---|---|
| 5-Hydroxymethylfurfural | 21363,93 | 316,86 | 6742% |
| diethyl o-phthalate | 1068,92 | 2645,82 | 40% |
| Ácido octanoico | 60,08 | 2521,41 | 2% |
| 1-(2-Furanyl)-2-hydroxyethanone furylhydroxymethyl ketone | 8441,90 | 1177,38 | 717% |
| Ácido heptanoico | 161,79 | 107,10 | 151% |
| Ácido hexanoico | 128,96 | 1226,34 | 11% |
| furfuryl alcohol | 111,79 | 690,26 | 16% |
| 3,6,9-trioxo undecane (C8 H18 O3) | 29,58 | 62,17 | 48% |
| 2-acetylfuran | 77,18 | 42,90 | 180% |
| Ácido acético | 75,14 | 6096,47 | 1% |
| 3 Octanol | 39,28 | 16,54 | 238% |
| Hexanol + 1-Butanol | 19,25 | 35,55 | 54% |
| 2-methyltetrahydrofuranone | 56,95 | 52,72 | 108% |
| Alcohol isoamilico | 13,66 | 57142,80 | 0% |

En negrilla se presentan los compuestos que con OAV mayor que 1.

Con los datos del archivo "Comparación Estadística Fermentaciones.xls", se escribió un documento analizando el coeficiente de variación, que tan definido estaba el peak en el cromatograma, el valor de su OAV, y su importancia según literatura. Así se determinó compuestos importantes, los cuáles fueron clasificados de acuerdo a 4 categorías: Ésteres, Alcoholes Superiores, Ácidos y Otros. Las concentraciones promedio de los compuestos en cada categoría fueron sumados para cada replica de fermentación, y a partir de esos valores se obtuvo una concentración promedio y su desviación estándar de cada categoría para cada cepa. Estos valores fueron comparados en las figuras 4-8, 4-9,4-10. Luego, utilizando los compuestos con valores de OAV mayores que 1, se realizaron análisis de ANOVA One-way para las concentraciones (o valores de OAV, dado que el resultados es el mismo), resultados presentados en la tabla 4-7 y 4-8. Además se hizo lo mismo con los valores de Log(OAV), obteniéndose los mismos resultados en diferencias estadísticas.

Después, a partir de los promedios de concentraciones y los valores de OAV promedio para cada replicado de compuestos comunes se realizaron análisis de PCA con el objetivo de explorar los datos, las siguientes figuras y tablas muestran los resultados obtenidos.

Figura K-1: PCA de las concentraciones de los compuestos comunes encontrados en el análisis químico para todos los replicados de fermentaciones realizadas a 28° C. La primera componente (horizontal) explica el 80% de la varianza, mientras que la segunda componente explica el 17%.

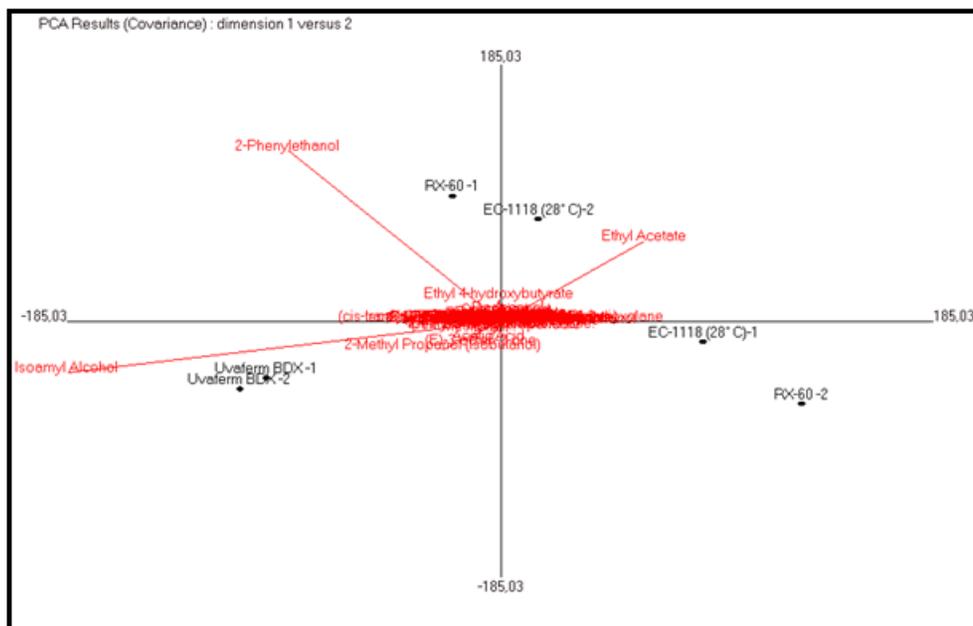


Figura K-2: PCA de las concentraciones de los compuestos comunes encontrados en el análisis químico para todos los replicados de fermentaciones realizadas a 15° C. La

primera componente (horizontal) explica el 72% de la varianza, mientras que la segunda componente explica un 15% de la varianza.

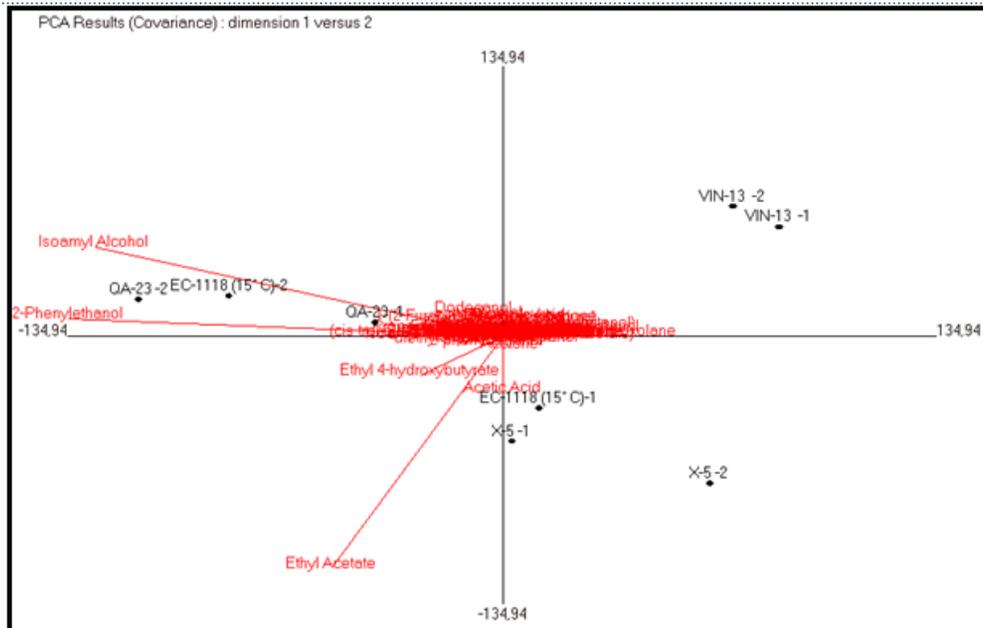


Figura K-3: PCA de los OAV de los compuestos comunes encontrados en el análisis químico, y que se encontró su umbral de detección, para todos los replicados de fermentaciones realizadas a 28° C. La primera componente (horizontal) explica el 70% de la varianza, mientras que la segunda componente explica el 25% de la varianza.

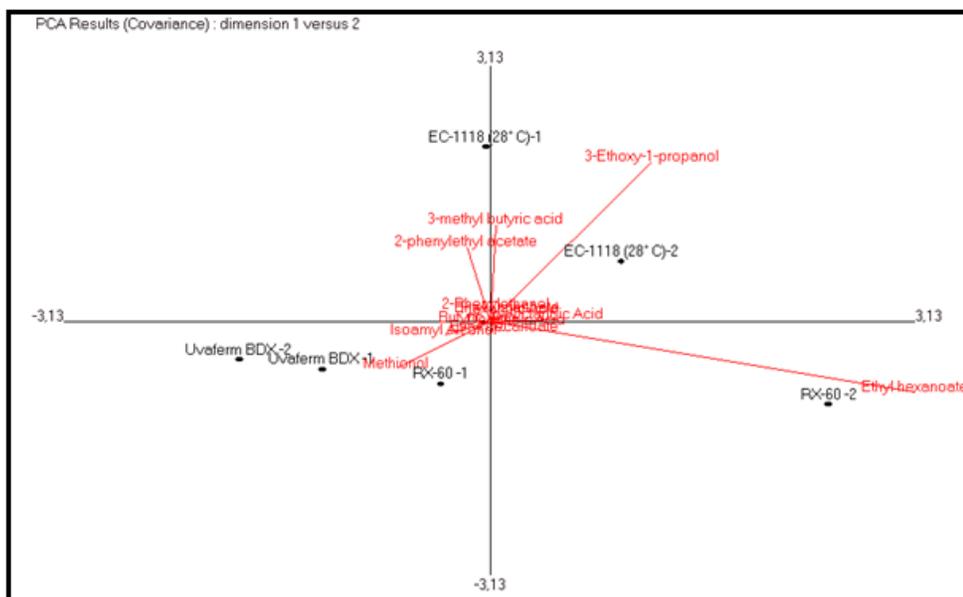
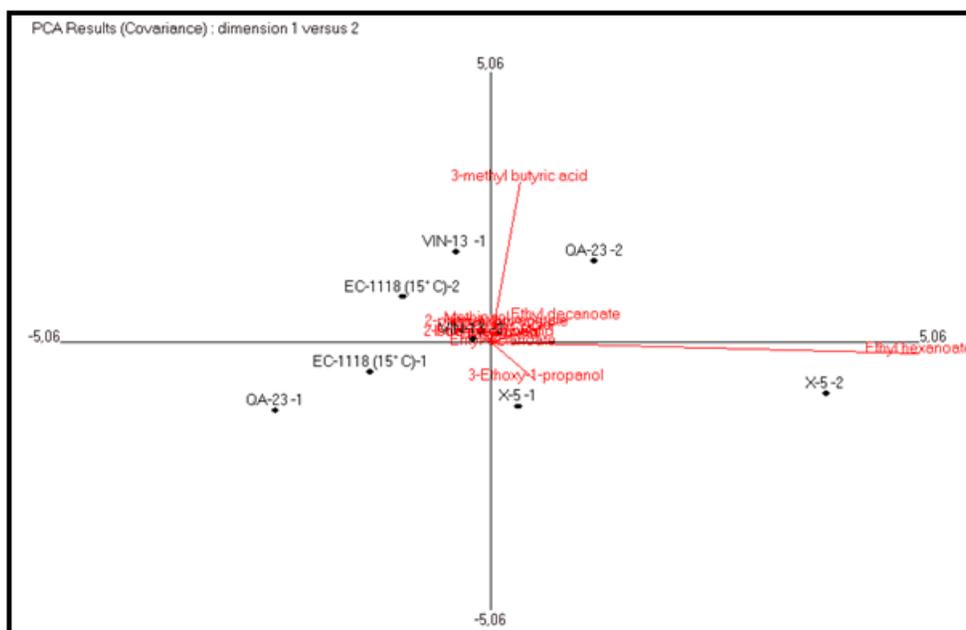


Figura K-4: PCA de los OAV de los compuestos comunes encontrados en el análisis químico, y que se encontró su umbral de detección, para todos los replicados de fermentaciones realizadas a 15 ° C. La primera componente (horizontal) explica el 81% de la varianza, mientras que la segunda componente explica el 12% de la varianza.



Anexo L: Resultados de Análisis Olfatométrico

Los datos de GC-O, nuevamente por tener varias etapas de procesamiento, se generaron archivos para cada una de éstas, y en este anexo se referirá a ellos en caso de su consulta a futuro, y se extenderán algunos resultados.

Los datos crudos obtenidos para cada corrida fueron ordenados y revisados para cada pareja desde los archivos generados por el programa Nose to Text o por archivos de audio generados por el programa Audacity. A partir de estos archivos, para cada replica de fermentación se creó un archivo Excel con una hoja de cálculo por pareja, en el cual se señala el nombre de las personas que realizaron la corrida de GC-O y los descriptores con sus respectivos tiempos e intensidades dichos por cada una. Estos archivos, llamados "FX.Y_Parejas.xls", pueden ser encontrados en la carpeta "Resultados Análisis Olfatométricos/GC-O Datos Crudos/FX.Y", donde nuevamente X e Y son el código utilizado para las fermentaciones (Anexo I, Tabla I-1).

Luego, a partir de estos archivos, juntando los descriptores por persona, y asignando un color a cada una, se ordenaron los descriptores respecto al tiempo. Al realizarse esto, se observó que existían diferencias en los tiempos en que salían los compuestos en distintas corridas para una misma muestra (hecho que fue observado al sobreponer los cromatogramas obtenidos por FID), por lo que los

tiempos fueron corregidos previamente a ser ordenados respecto a él. A continuación se presenta un detalle con el tiempo "estándar" utilizado para cada réplica y los ajustes de tiempo realizados:

F1.3 EC-1118 28° C: Se usa el tiempo de las corridas realizadas en marzo (10-13 marzo), se les suma 3,6 min a las corridas: P1.1 Víctor-Jeannette; P2.2 Rosa-Víctor; P4.2 Anita-JuanPa; P2.1 JuanPa-Rosa. A las corridas: P1.3 Isa-Marcial; Marcial-Nadie, se les resta 1,55 min.

F1.4 EC-1118 28° C: Se usa el tiempo de las corridas realizadas a fines de febrero (25-2-2008 al 5-3-2008). Se le resta 1,08 min a la corrida Rosa-JuanPa.

F3.2 RX-60 28° C: Se usa como tiempo de referencia el de las corridas realizadas en febrero (18 al 20), luego se les resta 1,47 min a las corridas: JuanPa-Anita. Y se les resta 3,07 min a las corridas Lenka-JuanPa, Gladys-Víctor.

F5.2 VIN-13 15° C: se usó como referencia el tiempo de las corridas realizadas en febrero (14 y 15), luego se ajustó las siguientes corridas: P1.2 Jeannette-Gladys se resto 0,68 min; P3.2 Víctor-Lenka se resto 1,1 min; P4.2 JuanPa Anita se restó 1,27; Gladys-Jeannette se resto 3 min.

F5.4 VIN-13 15° C: se usó como referencia el tiempo de las corridas realizadas en marzo (17 y 18), se ajustó la corrida: JuanPa-Nadie se sumo 3,48 min.

F6.3 X-5 15° C: se usó como referencia el tiempo de las corridas realizadas en marzo (26 y 27), luego se ajustó las corridas: Anita-Víctor y Marcial-JuanPa se les sumó 3,17 min.

F7.1 QA-23 15°C: todos los cromatogramas están desfasados en un intervalo de 1,3 min, sólo se ajusta la corrida Isa-Yoly sumándole 2 min para ajuste con el resto.

F7.2 QA-23 15° C: Se usa como referencia el tiempo de las corridas realizadas en marzo (12 y 14), luego se ajustan las siguientes corridas: Lenka-Anita se les suma 3,88 min; JuanPa-Rosa, Anita-Lenka, Yoly-Yenny, Yenny-Yoly se les resta 1,27 min.

MS300, se ajusta la corrida sólo la corrida Nadie-Víctor, se le resta 5,2 min.

Una vez que se ajustaron los tiempos de todas las corridas, en el archivo "Aromagramas.xls", cada uno en una hoja de calculo fueron ordenados los tiempos, y se procedió a clasificar los aromas y generar los aromagramas, utilizando el procedimiento mencionado en Materiales y Métodos. Cada uno de los aromagramas obtenidos se graficaron en archivos "FX.Y.xls" (ver Anexo I, tabla I-1), y los aromagramas filtrados de acuerdo al valor de frecuencia modificada (FM) mayor que 50 se encuentran en los archivos "FX.Y+50.xls". Estos archivos se encuentran en la carpeta "Resultados Análisis Olfatométricos/Aromagramas Gráficos/Aromagramas Replicados". A continuación se presentan todos los cromatogramas obtenidos para cada replicado, considerando todos los aromas y solo aquellos sobre 50 de FM.

Figura L-1: Aromagrama replicado F1.3 EC-1118 28° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

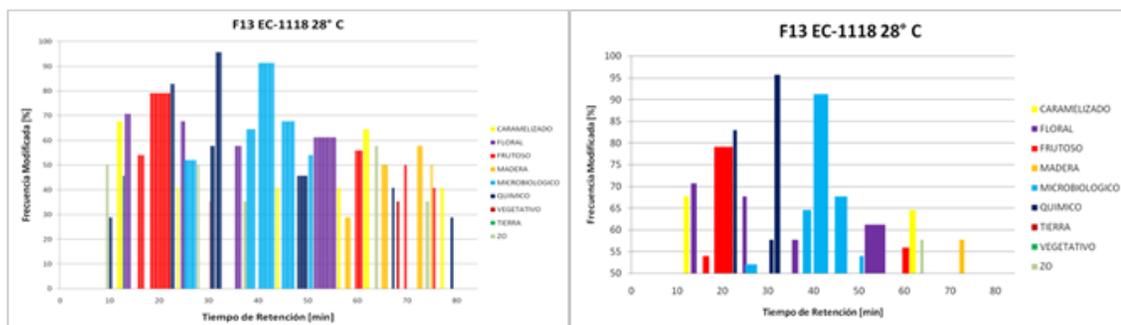


Figura L-2: Aromagrama replicado F1.4 EC-1118 28° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

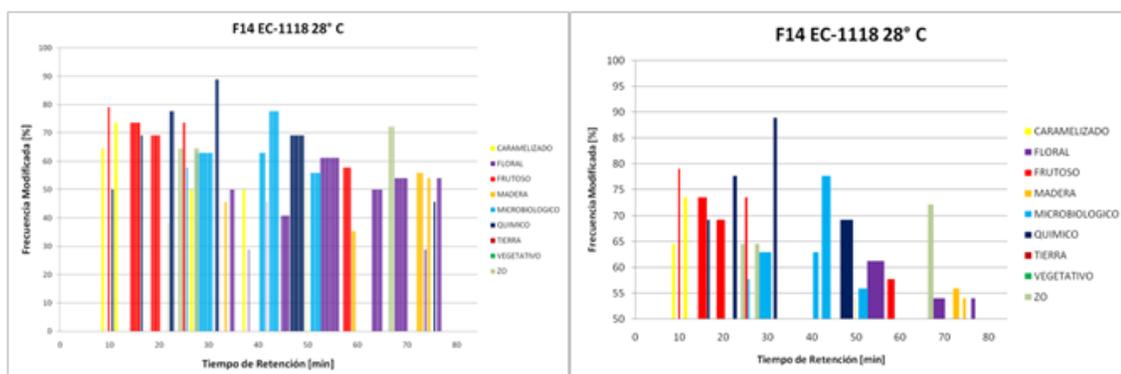


Figura L-3: Aromagrama replicado F2.3 EC-1118 15° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

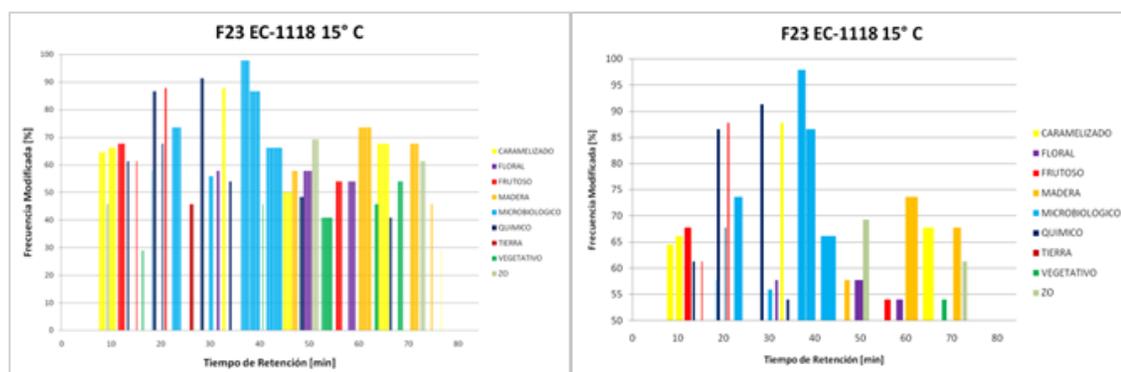


Figura L-4: Aromagrama replicado F2.4 EC-1118 15° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

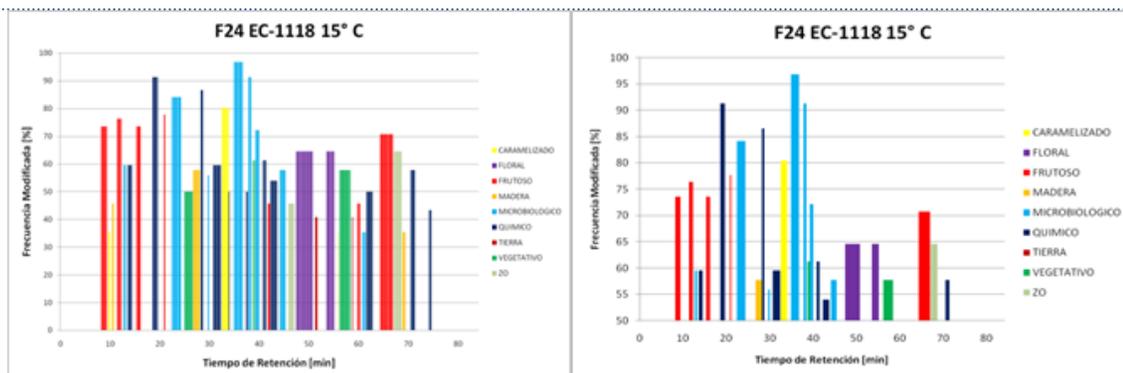


Figura L-5: Aromagrama replicado F3.2 RX-60 28° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

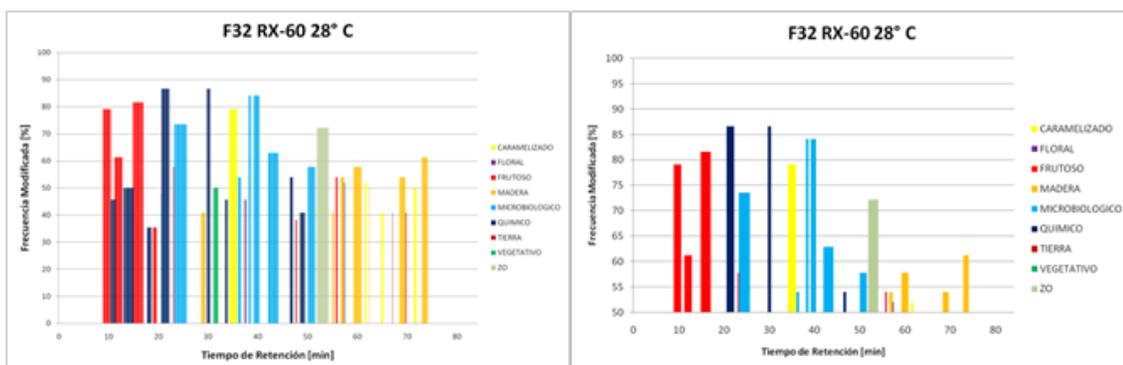


Figura L-6: Aromagrama replicado F3.3 RX-60 28° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

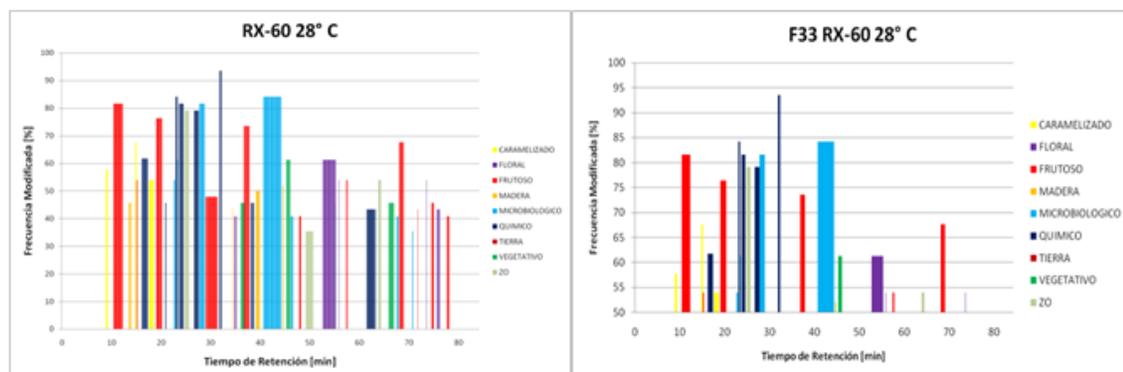


Figura L-7: Aromagrama replicado F4.3 Uvaferm BDX28° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

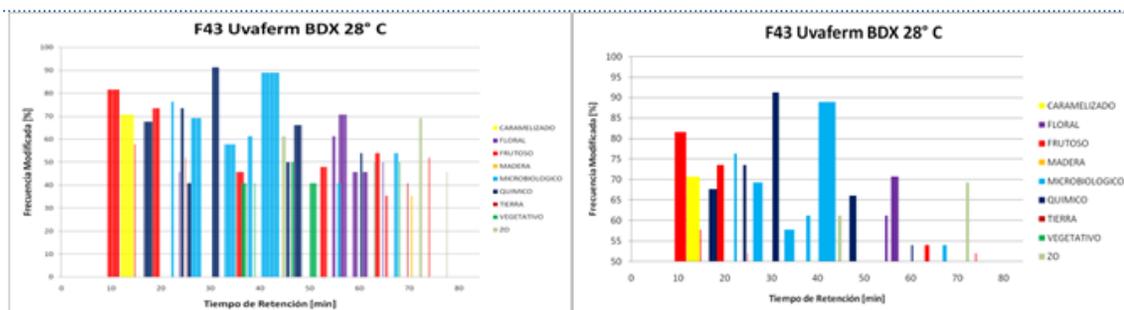


Figura L-8: Aromagrama replicado F4.4 Uvaferm BDX 28° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

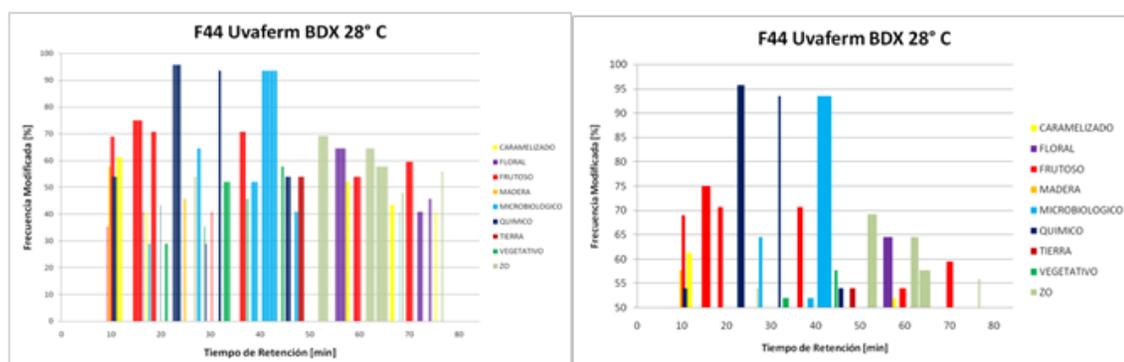


Figura L-9: Aromagrama replicado F5.2 VIN-13 15° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

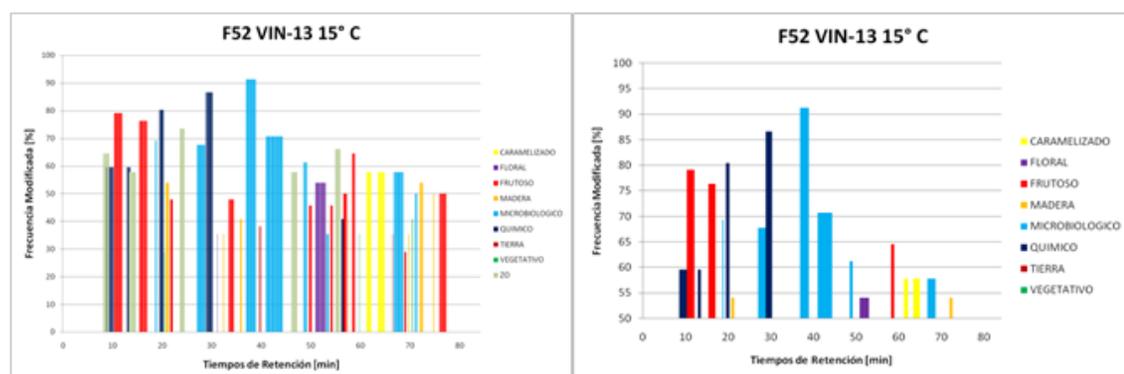


Figura L-10: Aromagrama replicado F5.4 VIN-13 15° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

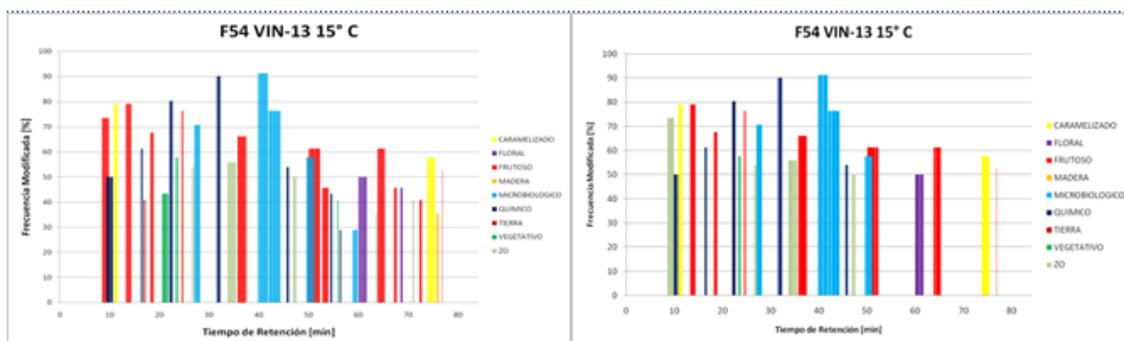


Figura L-11: Aromagrama replicado F6.3 X-5 15° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

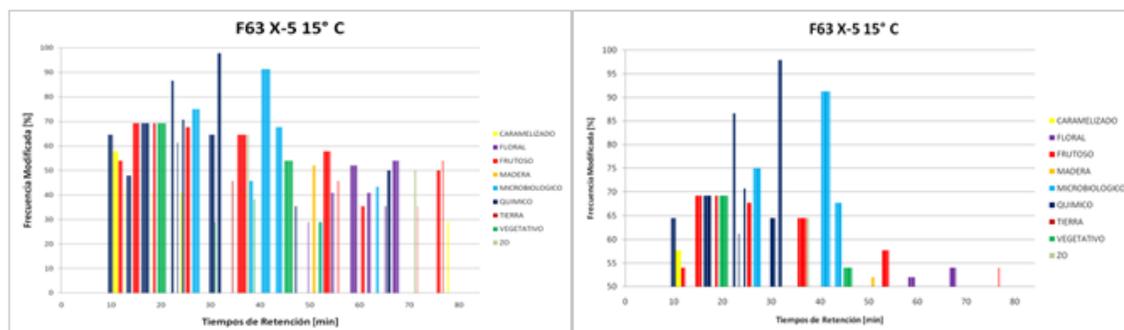


Figura L-12: Aromagrama replicado F6.4 X-5 15° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

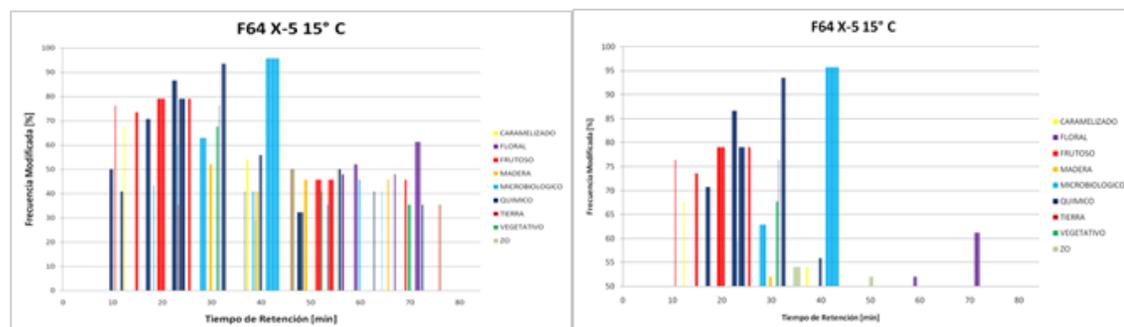


Figura L-13: Aromagrama replicado F7.1 QA-23 15° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

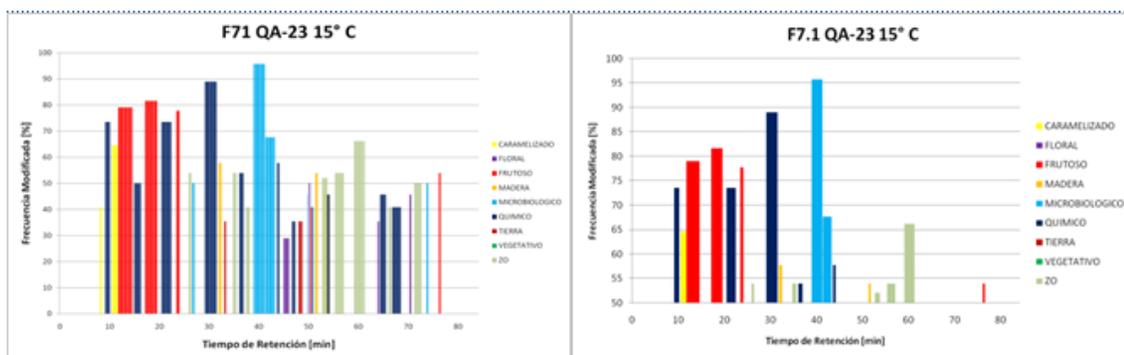


Figura L-14: Aromagrama replicado F7.2 QA-23 15° C, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).

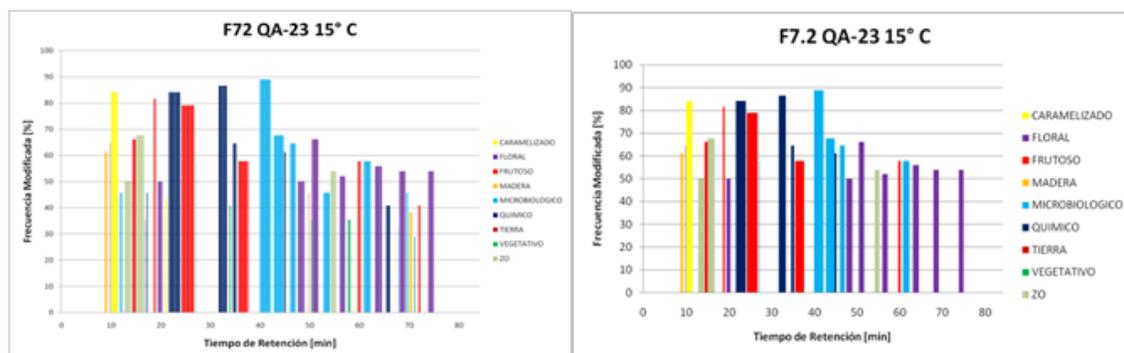
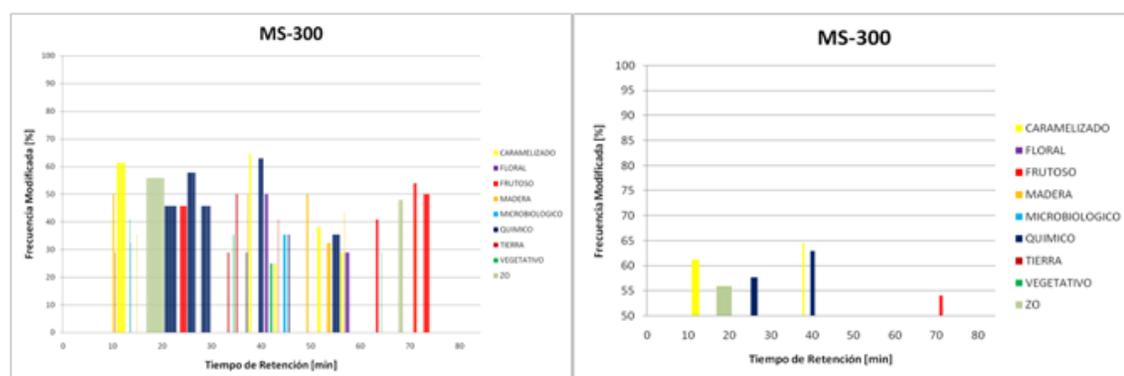


Figura L-15: Aromagrama MS-300, considerando todos los aromas (izquierda) y solo los aromas con FM > 50 (derecha).



Con estos archivos se buscaron compuestos odorantes comunes entre los replicados con el objetivo de generar un aromagrama por cepa. Para esto, se ajustó nuevamente el tiempo, ahora entre replicados, sumando o restando tiempo a uno de ellos de acuerdo a lo necesario, eliminando los aromas que solo estaban en un solo replicado, y dejando los aromas que se encontraron en tiempos similares. Estos archivos se encuentran en la carpeta "Resultados Análisis

Olfatométricos/Aromagramas Gráficos/Aromagramas Cepa/" con el nombre "FX_+50.xls". Luego, se eliminaron los aromas comunes con el aromagrama del medio MS300, y se identificaron algunos compuestos aromáticos (los que pudieron ser asociados fácilmente a un compuesto del cromatograma MS). Finalmente, se eliminaron los compuestos aromáticos con valor de OAV cercano a 0,01. Así se obtuvo aromagramas filtrados, una serie sin aromas comunes del medio MS300, ubicados en archivos con nombre "FX_+50_sin_MS300.xls" y una serie sin aromas comunes del medio MS300 y sin los compuestos aromáticos con OAV bajo, ubicados en archivos con nombre "FX_+50_sin_MS300-OAVbajos.xls".

Figura L-16: Ejemplo de construcción de aromagramas para la cepa EC-1118 a 28° C a partir de 2 replicados.

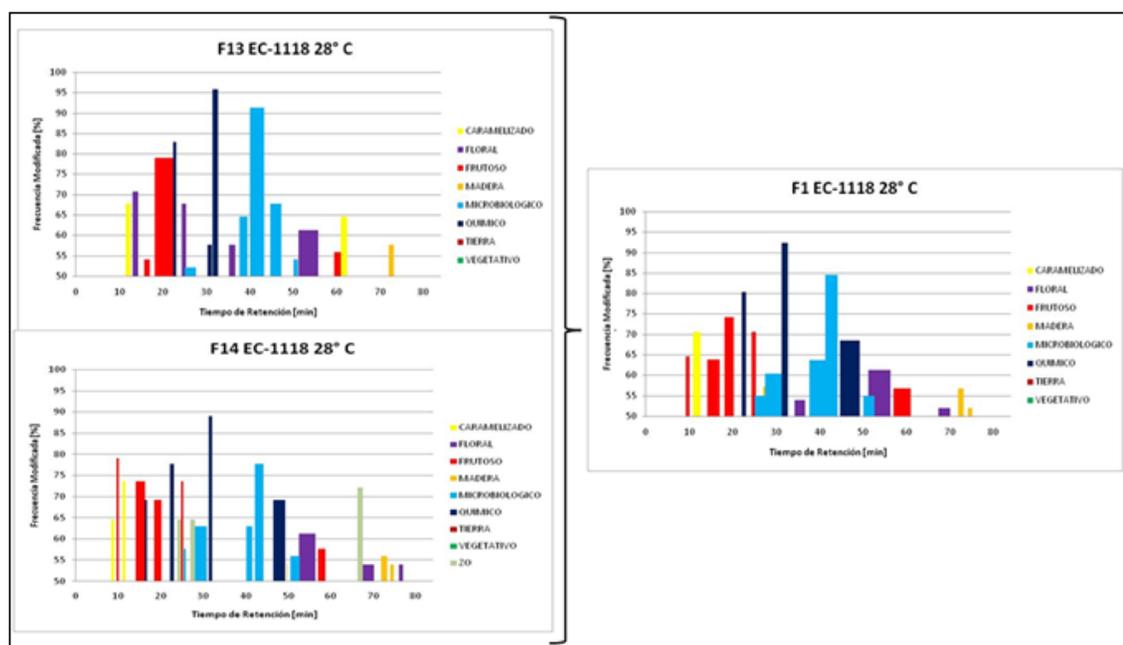


Figura L-17: Aromagrama cepa EC-1118 a 28° C (izquierda), eliminando aromas de MS300 (medio), y eliminando compuestos aromáticos con bajo OAV (derecha).

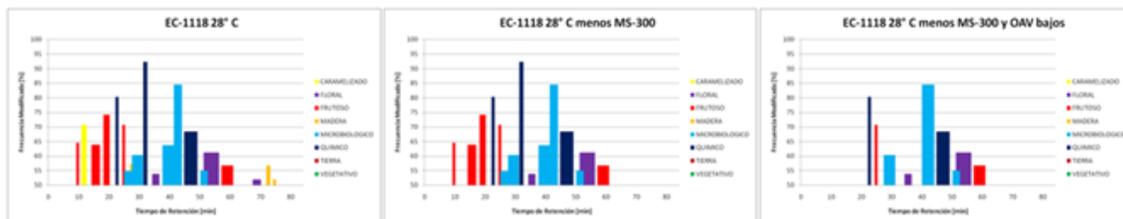


Figura L-18: Aromagrama cepa EC-1118 a 15° C (izquierda), eliminando aromas de MS300 (medio), y eliminando compuestos aromáticos con bajo OAV (derecha).

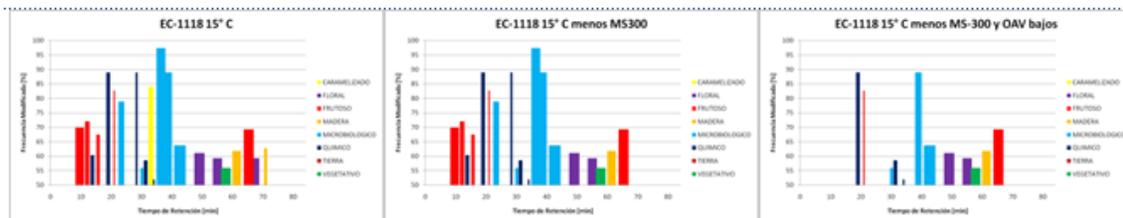


Figura L-19: Aromagrama cepa RX-60 a 28° C (izquierda), eliminando aromas de MS300 (medio), y eliminando compuestos aromáticos con bajo OAV (derecha).

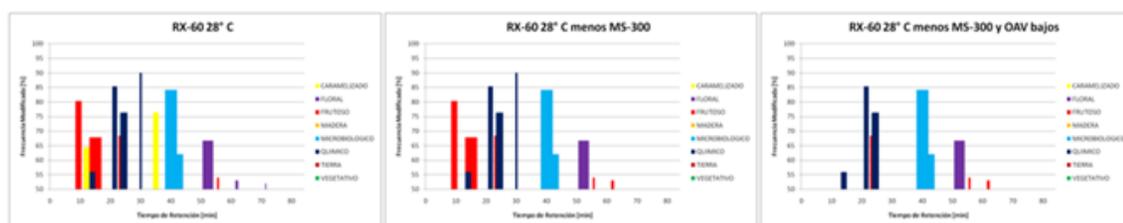


Figura L-20: Aromagrama cepa Uvaferm BDX a 28° C (izquierda), eliminando aromas de MS300 (medio), y eliminando compuestos aromáticos con bajo OAV (derecha).

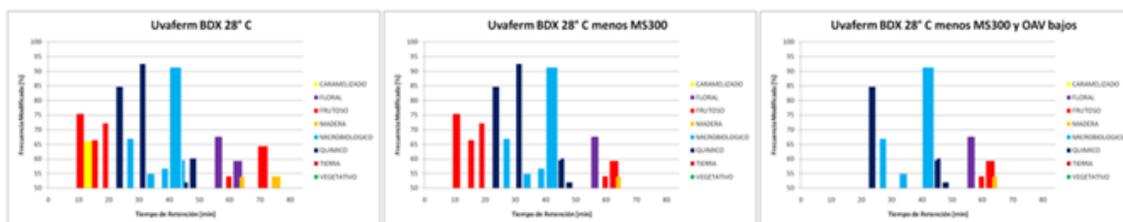


Figura L-21: Aromagrama cepa VIN-13 a 15° C (izquierda), eliminando aromas de MS300 (medio), y eliminando compuestos aromáticos con bajo OAV (derecha).

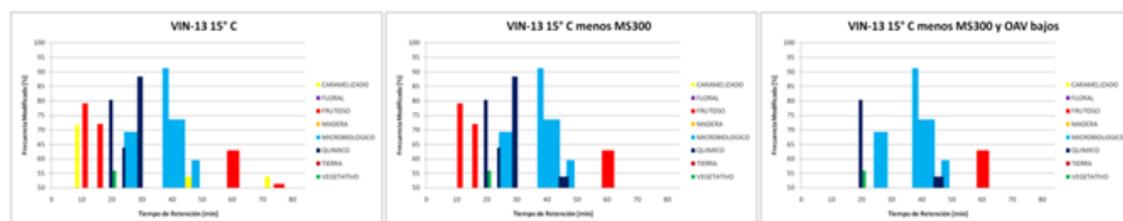


Figura L-22: Aromagrama cepa X-5 a 15° C (izquierda), eliminando aromas de MS300 (medio), y eliminando compuestos aromáticos con bajo OAV (derecha).

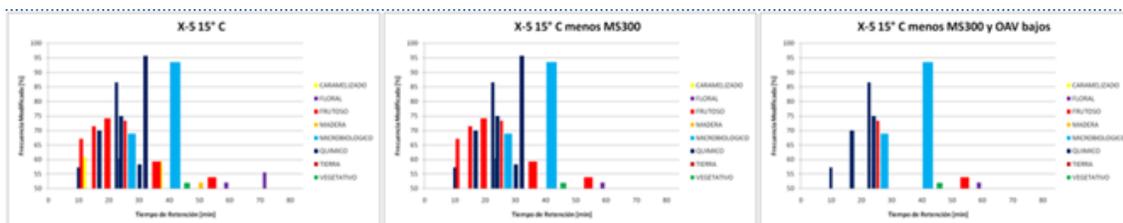
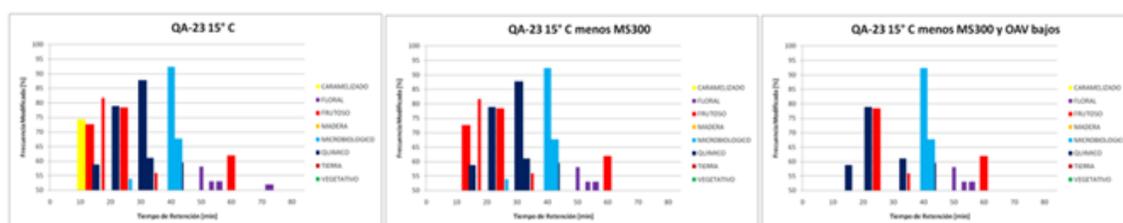


Figura L-23: Aromagrama cepa QA-23 a 15° C (izquierda), eliminando aromas de MS300 (medio), y eliminando compuestos aromáticos con bajo OAV (derecha).



Finalmente, con estos aromagramas graficaron en conjunto para realizar comparaciones, las cuáles pueden ser encontradas en los siguientes archivos:

“Comparacion_Ranking.xls”, este archivo contiene las gráficas de comparaciones entre los aromas ordenados de acuerdo a su valor de FM, generando un ranking con ellos. Este orden puede ser estricto por valor de FM o por categoría junto con el valor de FM.

“Comparación_Aromagramas_sinMS300.xls”, contiene los aromagramas de cada cepa sin los aromas de MS300, junto con una descomposición de los aromagramas por categorías de aromas.

“Comparación_Aromagramas_sinMS300-OAVbajos.xls” contiene los aromagramas de cada cepa sin los aromas de MS300 y sin los compuestos aromáticos identificados a compuestos con OAV cercano a 0,01. Además tiene un descomposición de los aromagramas por categoría.

“Comparacion_Aromagramas_Promedios.xls” contiene la identificación de los compuestos aromáticos, junto con la comparación de los aromagramas por contribuciones, entregadas en las figuras 4-17 y 4-18.

Figura L-24: Comparación de la contribución aromática relativa entre cepas sin considerar compuestos con bajo OAV y aromas de MS300.

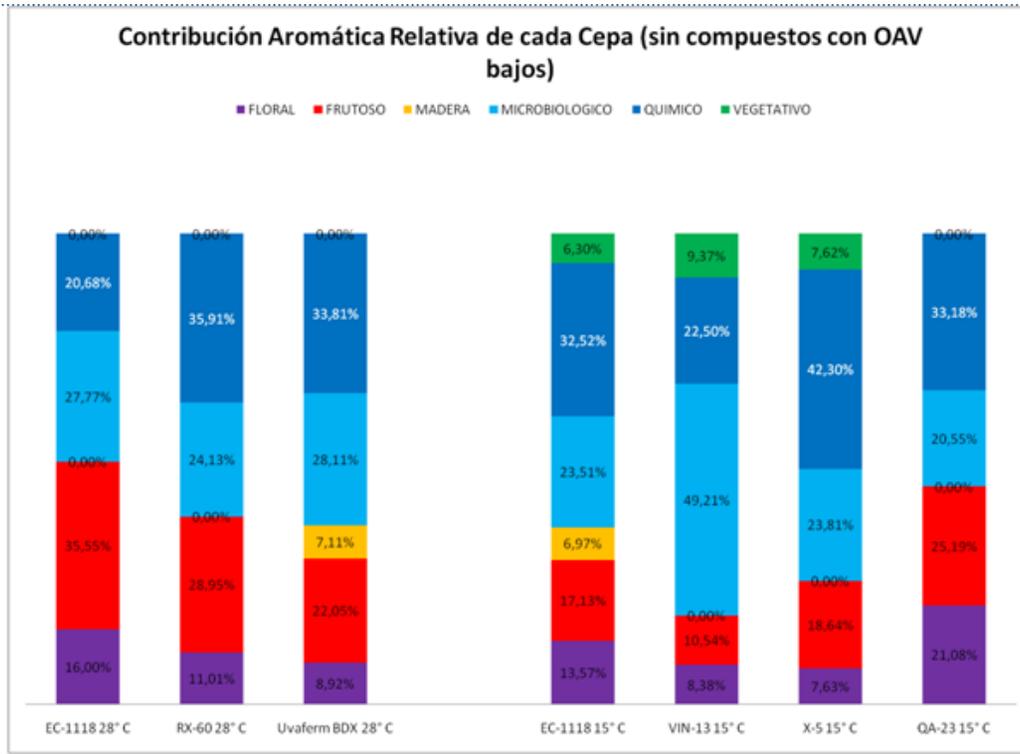


Figura L-25: Comparación de la contribución aromática total entre cepas sin considerar compuestos con bajo OAV y compuestos aromáticos de MS300.

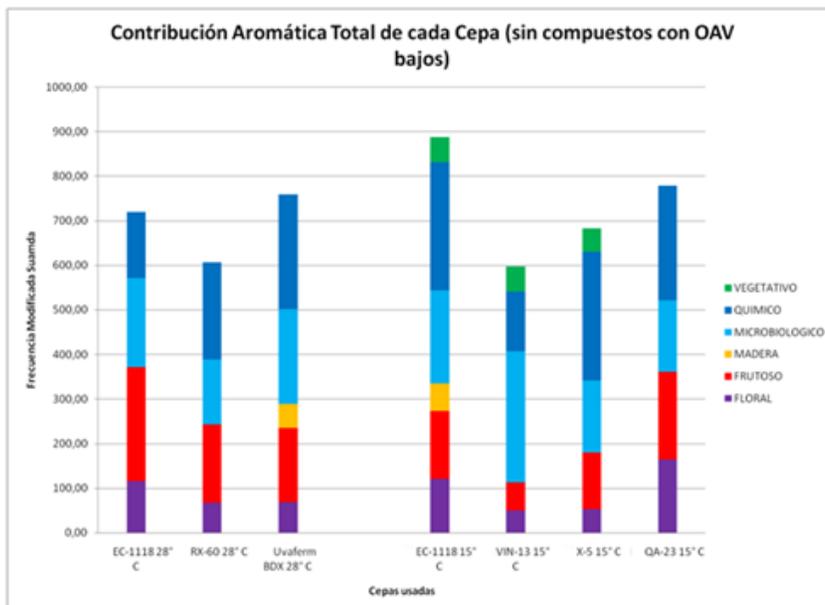


Figura L-26: Ranking de Aromas de acuerdo a FM, sin considerar compuestos aromáticos de MS300.

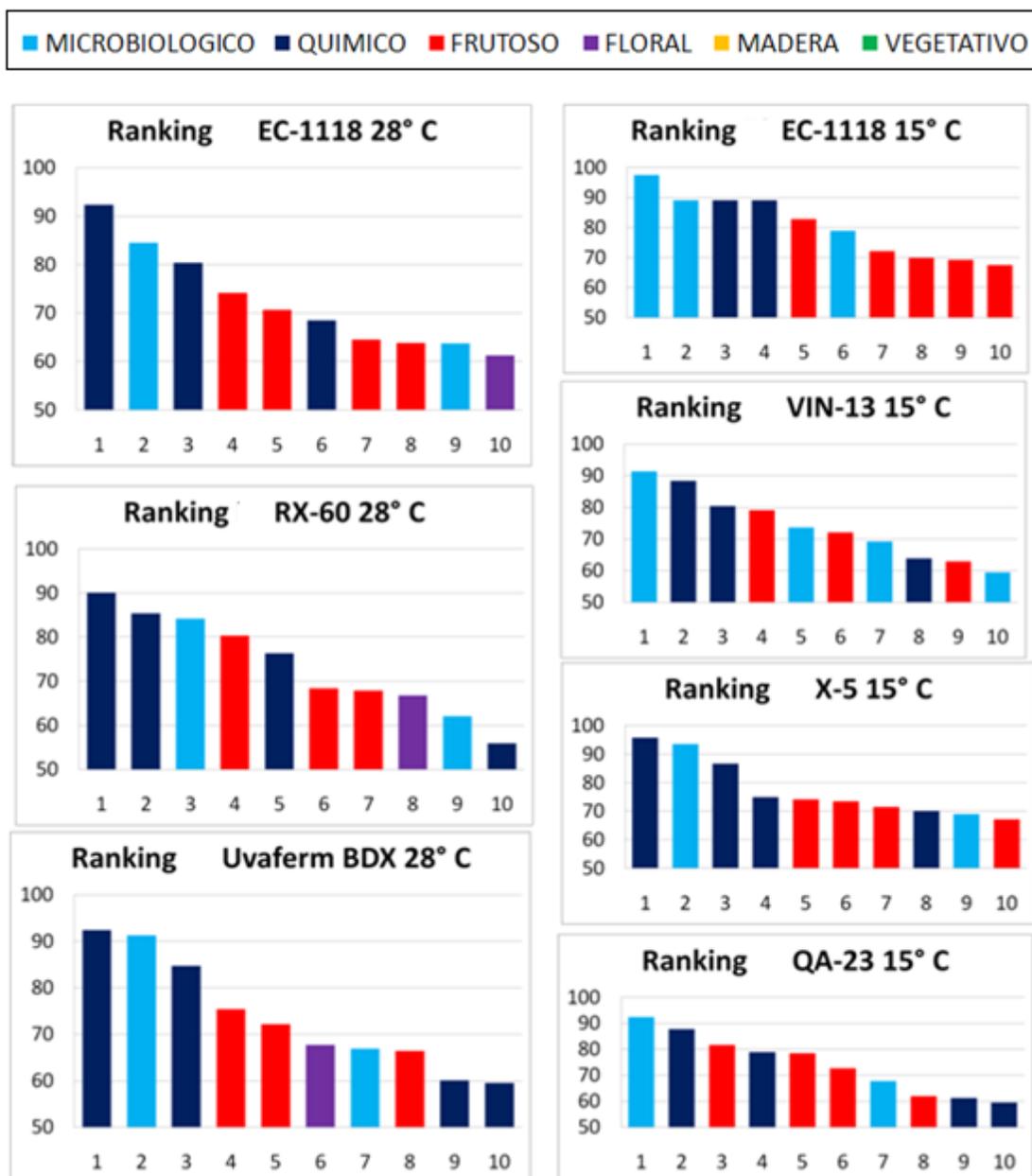


Figura L-27: Comparación ranking entre categorías de aromas, sin considerar aromas de MS300 y compuestos con bajo OAV.

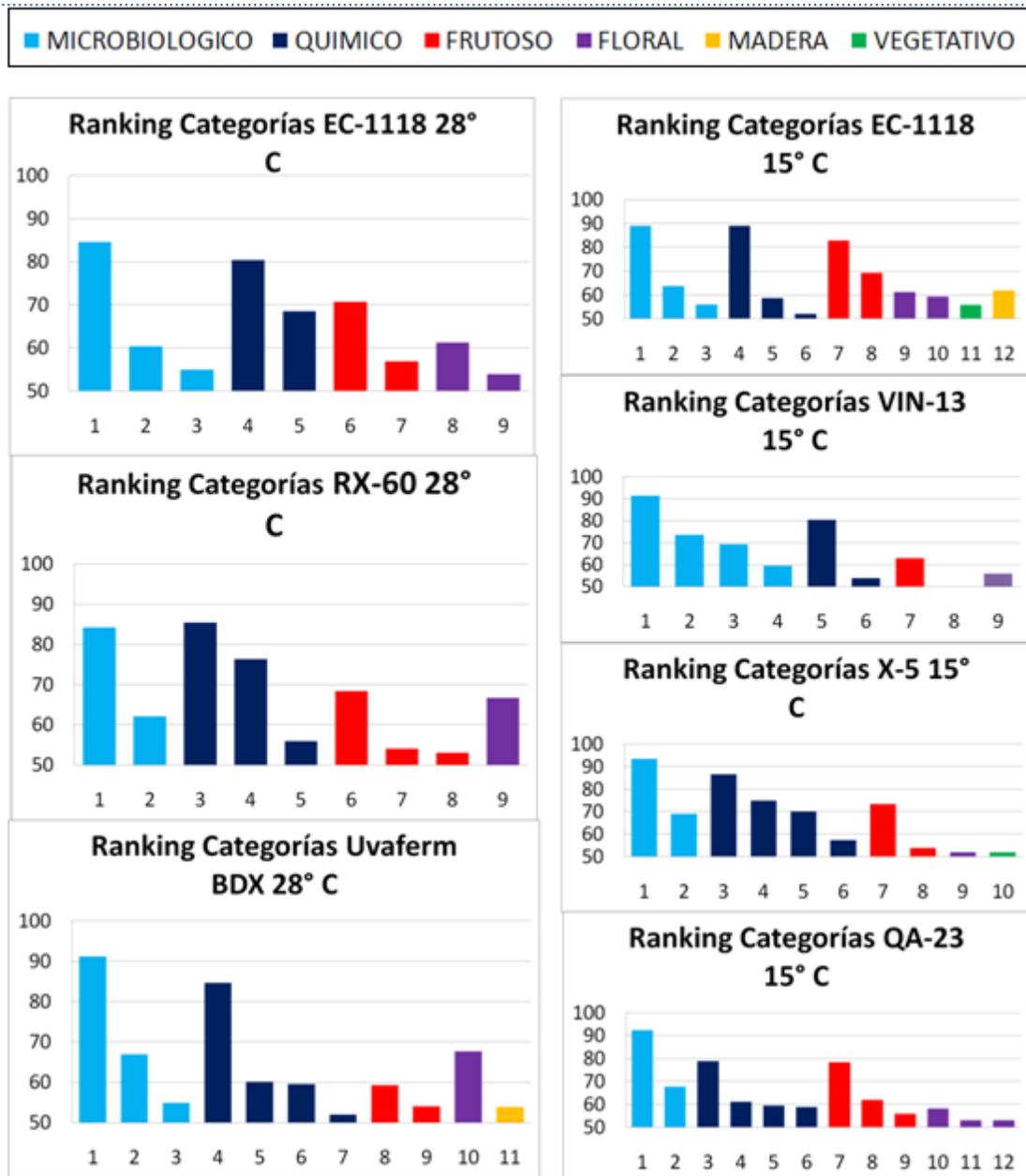


Figura L-28: Comparación ranking entre categorías de aromas, sin considerar aromas de MS300.

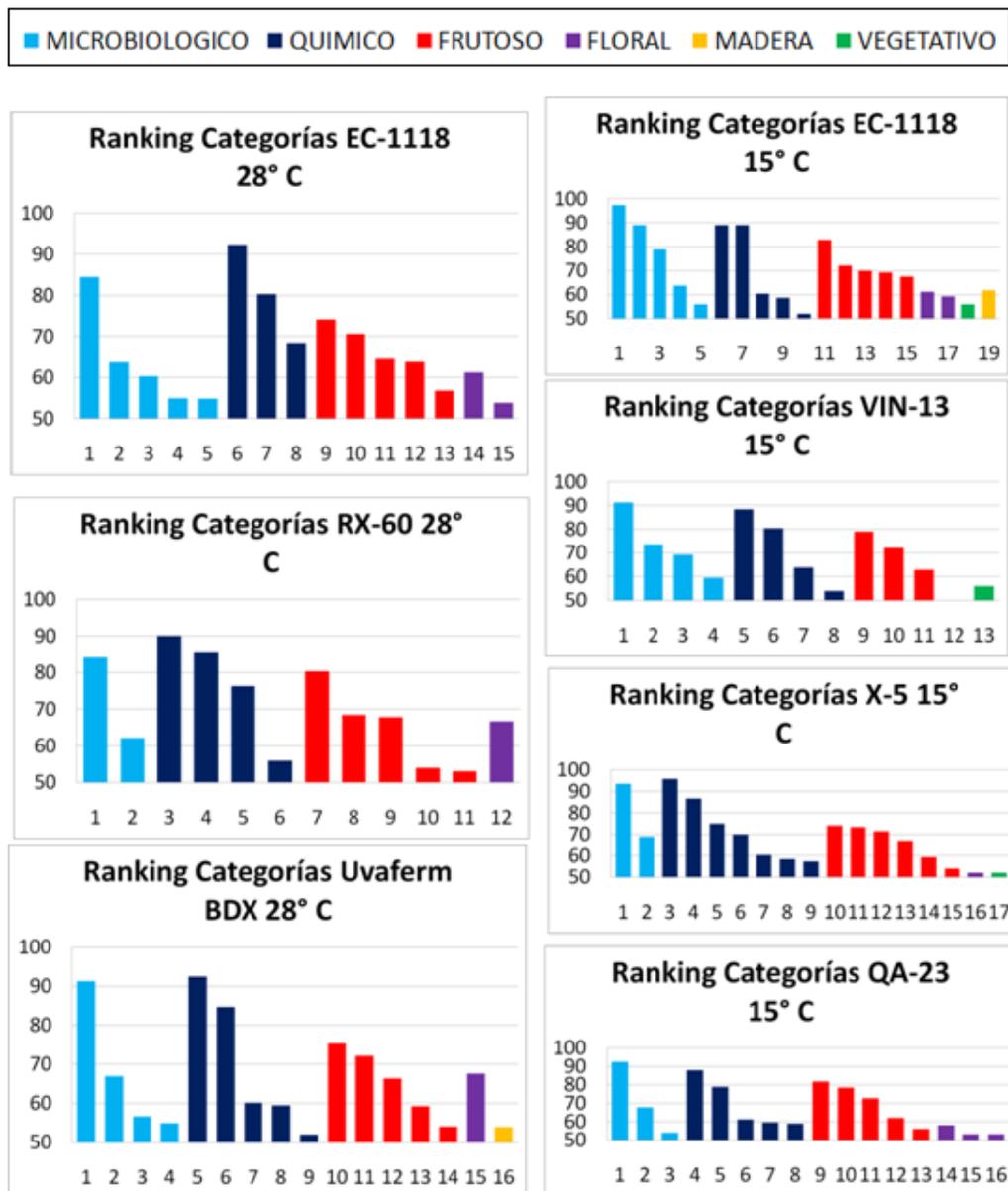


Tabla L-1: Identificación de compuestos aromáticos en aromagramas sin considerar MS300 para las cepas fermentadas a 28° C.

| Tiempo | EC-1118 28°C | FM | OAV | Tiempo | RX-60 | FM | OAV | Tiempo | Uvaferm BDX | FM | OAV |
|--------|---------------------------------|------|-------|--------|--|------|--------|--------|---------------------------------------|------|--------|
| 9,58 | Etil Acetato - Butil Acetato | 64,5 | 0,06 | 9,38 | Etil Propanoato - Butil Acetato | 80,4 | 0,05 | 10,48 | Etil Propanoato - Butil Acetato | 75,3 | 0,09 |
| 15,56 | Etil Butanoato | 63,8 | MIX | 13,97 | Isobutanol | 55,9 | 0,15 | 15,28 | Etil Butanoato | 66,4 | MIX |
| 19,11 | Acetato de Isoamilo | 74,1 | 0,04 | 15,04 | Acetato de Isoamilo - Etil Butanoato | 67,8 | 0,06 | 18,92 | Acetato de Isoamilo | 72,2 | 0,06 |
| 22,56 | Alcohol Isoamílico | 80,3 | 1,65 | 21,38 | Alcohol Isoamílico | 85,4 | 1,663 | 23,45 | Alcohol Isoamílico | 84,7 | 2,7008 |
| 24,81 | Etil Hexanoato | 70,6 | 16,87 | 22,93 | Etil Hexanoato | 68,4 | 19,508 | 27,04 | MICROBIOLO GICO | 66,9 | NR |
| 26,21 | Acetoína | 54,9 | 0,01 | 24,36 | QUIMICO | 76,3 | NR | 31,19 | Ácido Acético | 92,4 | 0,04 |
| 29,18 | Microbiológico | 60,3 | NR | 29,97 | Ácido Acético | 90,1 | 0,03 | 33,77 | MICROBIOLO GICO | 54,9 | NR |
| 31,90 | Ácido Acético | 92,4 | 0,03 | 40,13 | Ácido Butírico | 84,2 | 0,9357 | 38,45 | Ácido Isobutírico | 56,6 | 0,08 |
| 35,44 | ethyl hexanol- acetyl furan | 53,9 | SU | 43,00 | Ácido Isovalérico | 62,1 | 7,4257 | 41,96 | Ácido Butírico | 91,3 | 1,2965 |
| 39,43 | Ácido Isobutírico | 63,7 | 0,09 | 52,29 | Fenil Etanol* | 66,7 | 3,0227 | 44,60 | Methionol | 59,5 | 4,6792 |
| 41,99 | Ácido Butírico | 84,5 | 1,00 | 55,62 | FRUTOSO | 54 | NR | 45,54 | QUIMICO | 52 | NR |
| 46,94 | QUIMICO | 68,5 | NR | 61,82 | FRUTOSO | 53 | NR | 47,80 | QUIMICO | 60,1 | NR |
| 51,30 | Ácido hexanoico | 55 | 2,61 | | | | | 56,24 | 2-Fenil Etanol * | 67,6 | 3,3694 |
| 53,69 | Fenil Etanol* | 61,2 | 6,72 | | | | | 59,62 | FRUTOSO | 54 | NR |
| 59,02 | FRUTOSO | 56,8 | NR | | | | | 62,57 | frutoso | 59,3 | NR |
| | | | | | | | | 63,96 | madera | 53,9 | NR |

Tabla L-2: Identificación de compuestos aromáticos en aromagramas sin considerar MS300 para las cepas fermentadas a 15° C.

| Tiempo | EC-1118 15°C | FM | OAV | Tiempo | QA-23 | FM | OAV | Tiempo | VIIN-13 | FM | OAV | Tiempo | X-5 | FM | OAV |
|--------|---------------------------------------|------|-------|--------|---------------------------------------|------|-------|--------|---------------------------------------|------|-------|--------|--------------------------------------|-------|--------|
| 9,53 | Etil Acetato- Butil Acetato | 69,9 | 0,02 | 13,10 | Etil Propanoato - Butil Acetato | 72,6 | 0,03 | 11,065 | Etil Propanoato - Butil Acetato | 79,1 | 0,12 | 9,76 | 2,2-dimethyl propanol | 57,27 | SU |
| 12,05 | Etil Butanoato | 72 | MIX | 15,11 | Isobutanol | 68,9 | 0,10 | 16,055 | Acetato de Isoamilo | 72 | 0,03 | 10,85 | Etil Propanoato- Butil Acetato | 57,06 | 0,12 |
| 13,73 | Propanol - Isobutanol | 60,4 | 0,03 | 17,49 | Acetato de Isoamilo | 61,6 | 0,03 | 19,595 | Alcohol Isoamílico | 60,4 | 1,61 | 14,99 | Etil Butanoato | 71,41 | MIX |
| 15,60 | Acetato de Isoamilo | 67,4 | 0,03 | 21,59 | Alcohol Isoamílico | 78,9 | 2,25 | 20,835 | VEGETATIVO | 65,9 | NR | 16,80 | Isobutanol | 69,97 | 0,13 |
| 18,55 | Alcohol Isoamílico | 68,9 | 1,90 | 24,41 | Etil Hexanoato | 78,4 | 31,52 | 23,965 | Acetolna | 63,8 | 0,00 | 19,50 | Acetato de Isoamilo | 74,14 | 0,04 |
| 20,94 | Etil Hexanoato | 62,8 | 27,49 | 26,53 | Acetolna | 53,9 | 0,00 | 26,35 | MICROBIOLO GICO | 69,2 | NR | 22,43 | Alcohol Isoamílico | 66,6 | 1,6367 |
| 23,25 | Acetolna | 78,9 | 0,00 | 30,67 | Ácido Acético | 67,8 | 0,02 | 29,295 | Ácido Acético | 68,4 | 0,02 | 23,24 | Acetolna | 60,37 | 0,00 |
| 28,31 | Ácido Acético | 68,9 | 0,02 | 33,03 | Nonanol | 61,1 | SU | 37,78 | Ácido Butírico | 61,3 | 1,60 | 24,00 | QUIMICO | 74,88 | NR |
| 30,08 | Nonanol | 55,9 | | 35,04 | Etil Octanoato | 55,9 | 1,69 | 41,56 | Ácido Isovalérico | 73,5 | 23,51 | 25,39 | Etil Hexanoato | 73,38 | 44,263 |
| 31,30 | ethyl hexanol - acetyl furan | 66,6 | SU | 40,04 | Ácido Butírico | 60,4 | 1,69 | 45,44 | Methionol | 53,9 | 1,84 | 27,33 | MICROBIOLO GICO | 66,96 | NR |
| 34,05 | QUIMICO | 52 | NR | 42,48 | Ácido Isovalérico | 67,7 | 20,57 | 47,84 | Ácido Hexanoico | 59,5 | 3,63 | 30,13 | 1-Hexanol | 58,3 | 0,01 |
| 36,38 | Ácido Isobutírico | 67,4 | 0,11 | 43,80 | Methionol | 69,5 | 1,89 | 57,555 | Fenil Etanol * | 50 | 1,52 | 32,04 | Ácido Acético | 65,72 | 0,04 |
| 38,90 | Ácido Butírico | 68,9 | 1,55 | 49,96 | Fenil Etanol * | 58,1 | 2,95 | 60,3 | FRUTOSO | 62,9 | NR | 35,74 | Ethyl 3- Hydroxybuty rate | 59,28 | 0,01 |
| 42,60 | Methionol | 63,7 | 2,00 | 53,36 | floral | 53 | NR | | | | | 41,85 | Ácido Butírico | 69,51 | 1,7828 |
| 49,10 | Fenil Etanol | 61,1 | 2,81 | 55,97 | FLORAL | 53 | NR | | | | | 45,69 | Methionol | 52 | 1,0323 |
| 53,05 | FLORAL | 59,3 | NR | 59,85 | Etil Hexadecanoa to | 61,9 | 0,91 | | | | | 54,08 | FRUTOSO | 53,87 | NR |
| 57,70 | VEGETATIV O | 55,9 | NR | | | | | | | | | 58,75 | Fenil Etanol * | 52,04 | 1,8674 |
| 61,35 | MADERA | 61,8 | NR | | | | | | | | | | | | |
| 65,30 | FRUTOSO | 69,2 | NR | | | | | | | | | | | | |

Figura L-29: Comparación de compuestos aromáticos frutuosos en aromagramas sin considerar MS300 y compuestos con OAV bajos.

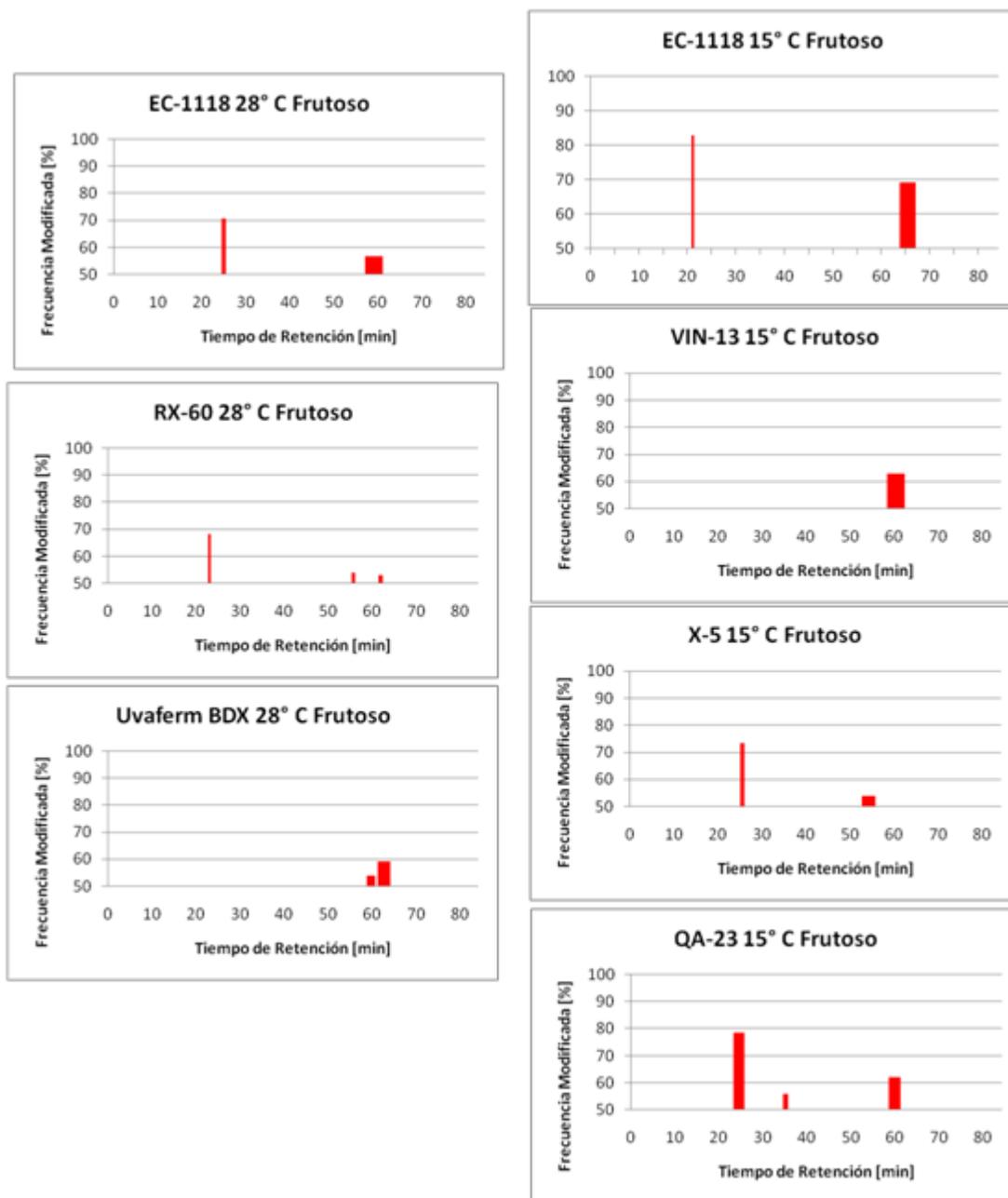


Figura L-30: Comparación de compuestos aromáticos florales en aromagramas sin considerar MS300 y compuestos con OAV bajos.

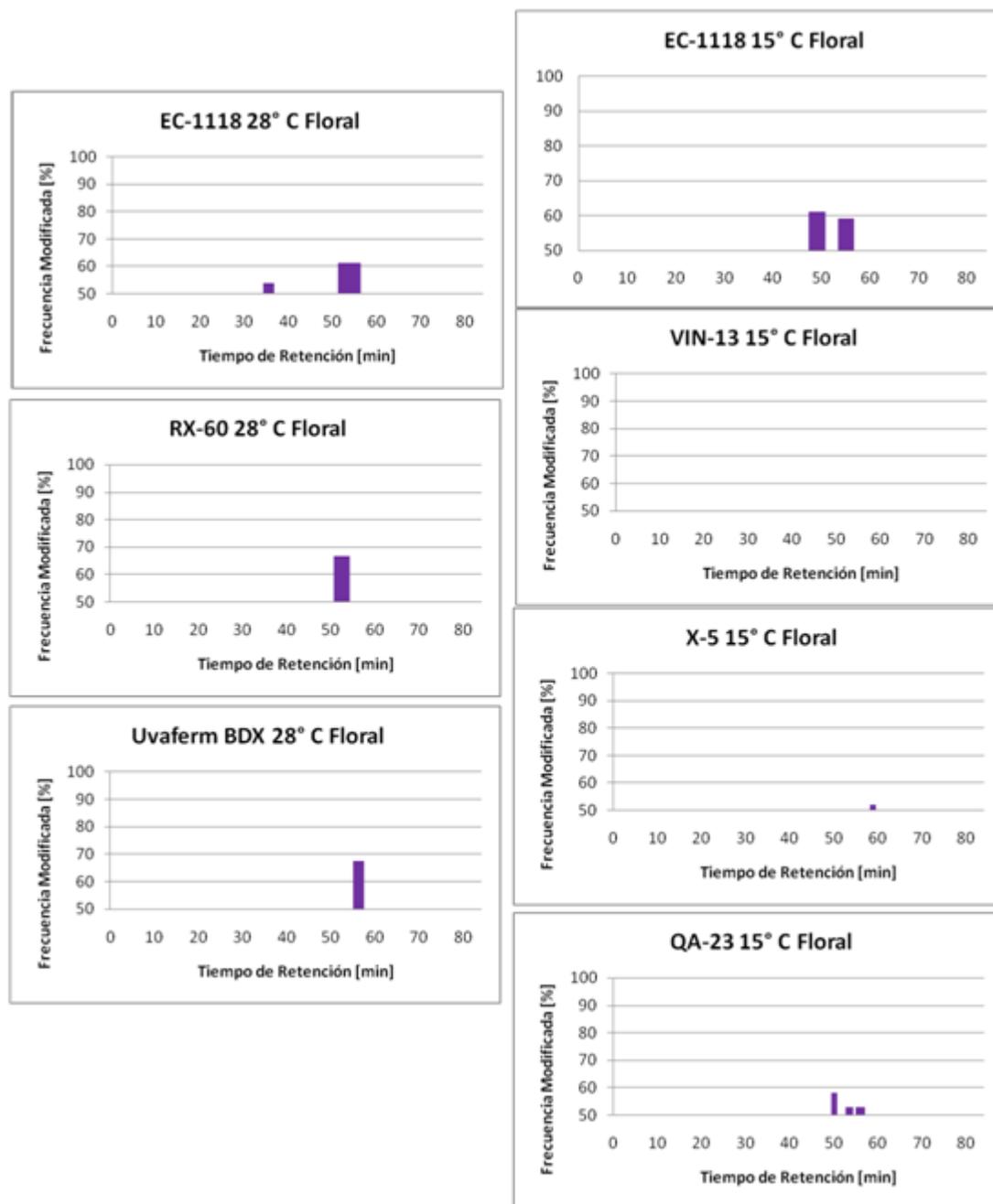


Figura L-31: Comparación de compuestos aromáticos químicos en aromagramas sin considerar MS300 y compuestos con OAV bajos.

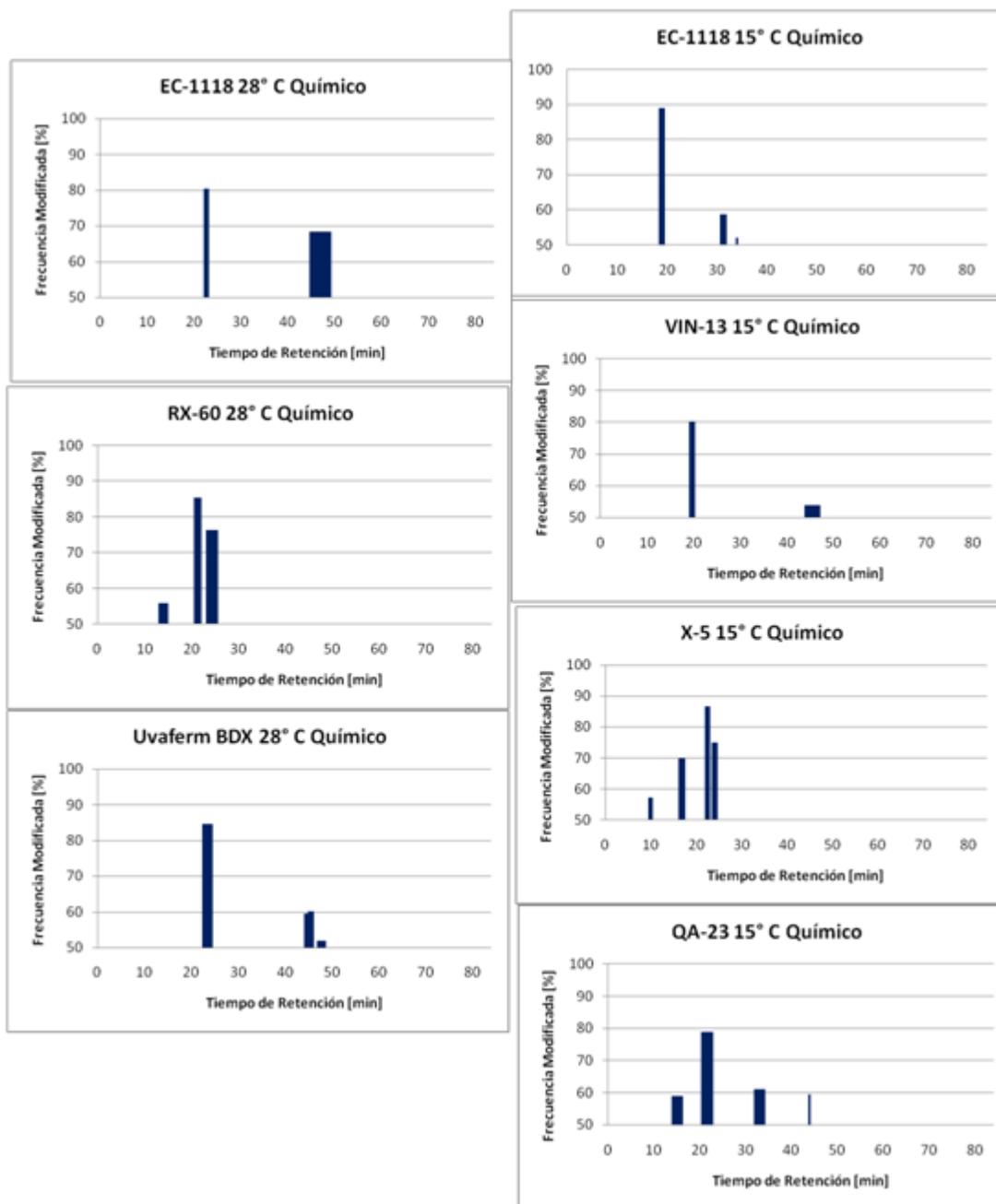


Figura L-32: Comparación de compuestos aromáticos microbiológicos en aromagramas sin considerar MS300 y compuestos con OAV bajos.

