



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
FACULTAD DE AGRONOMÍA E INGENIERÍA FORESTAL  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN  
MAGISTER EN FISIOLOGÍA Y PRODUCCIÓN VEGETAL

ENCAPSULACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CEPA DE *Pichia kluyveri*  
YCPUC83 EN CO-FERMENTACIONES CON *S. cerevisiae* EC1118 EN  
MOSTO SINTÉTICO

Tesis presentada como requisito para optar al grado de

Magíster en Fisiología y Producción Vegetal

Por:

Francisca Andrea Riquelme Toledo

Comité de Tesis

Profesor guía: Dr. Liliana Godoy Olivares

Profesores informantes:

Edmundo Bordeu S.

Consuelo Ceppi De Lecco I.

Enero, 2023

Santiago de Chile

## Agradecimientos

El presente trabajo ha sido posible gracias a la Pontificia Universidad Católica de Chile y a la facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, institución que fue mi segundo hogar por largo tiempo, en donde mi formación ha sido completa tanto en valores académicos como humanos y le agradezco por darme la oportunidad de conocer amigos y profesores que me ayudaron en mi crecimiento profesional y personal.

El comienzo de esta investigación coincidió con mi inserción en el mundo de la enología en distintas viñas que me han dado la oportunidad de fortalecer mis conocimientos y entrar al mundo laboral. Dentro de todo este tiempo, siempre tuve el apoyo de mi profesora guía Liliana Godoy Olivares, quien ha estado muy presente en mi formación como profesional e investigador en el mundo enológico, mostrándome el enorme mundo de la microbiología enológica. Sin duda ella ha sido un pilar fundamental para culminar esta etapa de mi carrera, siempre creyendo en mis capacidades y habilidades. Querida Lily, muchas gracias por tu paciencia, consejos y cariño.

Gracias al Laboratorio de Microbiología y Genética de Levaduras de la Pontificia Universidad Católica de Chile que permitió llevar esta investigación a cabo, así como también agradezco el apoyo, la alegría y colaboración del gran equipo que lo compone, para todos ellos un abrazo grande.

A mi familia por darme siempre su apoyo permanente, entrega y amor, por estar conmigo y ser mi soporte, lo más fundamental.

Dedicado a mi esfuerzo de tantos años, gracias a mis padres Ximena y Juan

a mi hermana Loreto

Y a toda persona que sienta pasión por la enología y microbiología

## ÍNDICE

1.1	Abstract
	5
2. Antecedentes	6
<i>Pichia kluyveri</i>	7
Encapsulación de levaduras como una vía de protección	9
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
3.1 Hipótesis	10
3.2 Objetivo general	10
3.3 Objetivos específicos	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	11
4.2 Recuento celular	11
4.3 Encapsulación	11
4.4 Fermentaciones	12
4.5 Caracterización de mosto y vino	13
4.6 Viabilidad de <i>P. kluyveri</i> YCPUC83	13
4.7 Perfil Aromático	13
4.8 Análisis estadístico	14
5. Resultados y Discusiones	14
5.1 Encapsulación de <i>Pichia kluyveri</i>	14
5.2 Cinética de fermentación y parámetros fermentativos	16
5.3 Caracterización química	20
5.4 Viabilidad de <i>P. kluyveri</i> YCPUC83	22
5.5 Análisis del perfil sensorial de los vinos.	23
5.5.1 Análisis de Componentes Principales	26
5.5.2 Nivel de aceptación de los vinos	27
6. Conclusión	29
7. Resumen	30
8. Referencias	31
9. Anexos	38

# ENCAPSULACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CEPA DE *Pichia kluyveri* YCPUC83 PARA SU USO EN CO-FERMENTACIONES EN MOSTO SINTÉTICO

Francisca Andrea Riquelme Toledo

Pontificia Universidad Católica de Chile

## 1.1 Abstract

**Francisca Riquelme Toledo. Encapsulación y evaluación de la cepa de *Pichia kluyveri* YCPUC83 para su uso en co-fermentaciones en mosto sintético.** Tesis, Magister en Fisiología y Producción Vegetal, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

*Pichia kluyveri* is a Non-Saccharomyces yeast that is characterized by its contribution to the aromatic potential of wines. However, it only survives in the first stage of fermentation before *Saccharomyces cerevisiae* completely dominates the medium. The main objective of this study was to evaluate the potential organoleptic contribution that *Pichia kluyveri* YCPUC83 has on the aromatic profile of wines obtained in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. A sodium alginate-based medium that allows *P. kluyveri* to be encapsulated was evaluated in order to ensure its viability until the end of fermentation. Then, fermentations with encapsulated and non-encapsulated *P. kluyveri* were carried out in co-fermentation with *S. cerevisiae* EC1118 and oenological parameters and sensory profile of the wines were evaluated. The results of this study suggest that the encapsulation technique in *P. kluyveri* YCPUC83 turns out to be an interesting and innovative alternative for the oenological industry, since it is capable of improving fermentation performance, ensuring viability at the end of fermentation without affecting oenological parameters. On the other hand, co-fermenting with yeast improves the sensory profile of wines, as it demonstrates a clear trend in obtaining floral, fruity and tropical aromas compared to wines obtained by fermentation with *S. cerevisiae* EC1118.

**Key words: Wine Aroma, *Pichia kluyveri*, Sodium alginate, Encapsulation, co-inoculation**

## 2. Antecedentes

La creciente demanda de consumo del vino junto con el aumento en la competencia y globalización del sector, han hecho necesario que los productores de vino se enfrenten a la necesidad de lograr mejores características organolépticas para poder satisfacer las necesidades del mercado ofreciendo productos distintivos y con alto valor agregado. Para esto, existen alternativas focalizadas en el área de investigación microbiológica en torno a la selección de levaduras de tipo no-*Saccharomyces*, ya que se ha demostrado que su uso mejora la fermentación vínica y potencia la formación de compuestos volátiles que ayudan a la extracción de aromas provenientes de la piel de la uva, tales como terpenos y tioles (Padilla *et al.*, 2016). Esto otorga la posibilidad de crear productos vínicos más complejos, aportando a la variabilidad y tipicidad, resultando ser una alternativa interesante y atractiva para el consumidor, al combinar la innovación enológica manteniendo el respeto a la tradición y el terroir (Tronchoni, *et al.*, 2017). El desafío que enfrentan los enólogos gira en torno a mejorar los procesos fermentativos en la elaboración del vino que apunten a obtener una mayor complejidad organoléptica en especial aromática, para lo cual es necesario entender que existe en la actualidad una demanda en la búsqueda de nuevas cepas de levaduras que deben ser capaces de innovar y adaptarse a diferentes estilos de vinos y condiciones hostiles propias del mosto.

Las levaduras, además de transformar el azúcar en etanol, también generan compuestos aromáticos volátiles que dependen de la cepa y del metabolismo del microorganismo teniendo un papel esencial en las características organolépticas del vino (Jolly *et al.*, 2006). En las fermentaciones, la utilización de levaduras del tipo no-*Saccharomyces* es cada vez más frecuente al tener un alto potencial en la producción de metabolitos secundarios y enzimas como  $\beta$ -glucosidasas, que permiten expresar aromas, que en principio son no-volátiles, en volátiles contribuyendo a la formación de aromas primarios y secundarios, lo cual es una característica que no posee la levadura fermentativa por excelencia *Saccharomyces cerevisiae* (Padilla *et al.*, 2016).

Si bien, el mosto de vino contiene levaduras no-*Saccharomyces* de forma natural proveniente del campo o bodega, éstas están mayor en cantidad durante los primeros 2-3 días de la fermentación alcohólica y luego son rápidamente reemplazadas por

levaduras que tengan una mayor capacidad fermentativa, ya que a partir de la producción de un 4% de etanol, estas levaduras descienden en número debido a su alta sensibilidad frente al etanol y a las condiciones anaeróbicas del medio, pudiendo así *S. cerevisiae* imponerse durante el proceso fermentativo (Luyt, 2015; Hu *et al.*, 2018).

En la actualidad, la estrategia habitual para la elaboración del vino implica la inoculación de cepas seleccionadas de *S. cerevisiae*, en forma de levaduras secas activas (LSA), presentando ventajas como la reducción de la fase de latencia, la fermentación rápida y completa del mosto, asegurando una gran reproducibilidad en el producto final (Krieger-Weber, 2009). Sin embargo, la práctica del monocultivo con *S. cerevisiae* también provoca una estandarización de los vinos obtenidos producto de la reducción en la diversidad de otras poblaciones microbianas involucradas en la fermentación alcohólica (Romano, *et al.*, 2003). Es por esto que en las últimas décadas, estudios sobre las levaduras no-*Saccharomyces* han demostrado su gran potencial en la mejora de la calidad de los vinos, desde un punto de vista tecnológico como sensorial y se han desarrollado estrategias de co-inoculación (simultánea o secuencial) con *S. cerevisiae*, con resultados favorables en cuanto a su aportación al vino y su influyente aporte a nivel ecológico (afectando la dominancia de *S. cerevisiae*) y a nivel organoléptico a través de la producción de metabolitos específicos según tipo de levadura (Belda *et al.*, 2017; Benito *et al.*, 2019).

### *Pichia kluyveri*

*P. kluyveri* es una levadura dentro del grupo de las no-*Saccharomyces* que puede mejorar las propiedades organolépticas de productos fermentados. En la actualidad, se han descrito diferentes especies de *Pichia* como *P. fermentans*, *P. membranifaciens*, *P. occidentalis*, *P. terricola*, *P. manshurica*, *P. kudriavzevii*, y *P. kluyveri* (Vicente, *et al.*, 2021).

En particular, *P. kluyveri* posee un metabolismo que permite incrementar la concentración de moléculas volátiles como los ésteres afrutados y florales, terpenos y tioles, los cuales son compuestos aromáticos que mejoran significativamente la calidad de vinos varietales y se potencian en mayor medida en presencia de las enzimas  $\beta$ -lialasa y  $\beta$ -glucosidasa, las cuales enriquecen aromas varietales en variedades terpénicas como

Moscatel y variedades tiólicas como Sauvignon blanc, Riesling y Verdejo (Ruiz, *et al.*, 2019). Otros reportes indican que el uso de *P. kluyveri* en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae* promueve la acumulación de alcoholes complejos, terpenos totales y en tioles totales, aumentando incluso en 6 veces la producción de 3-MH (3-Mercaptohexan-1-ol) y 3-MHA (3-Mercaptohexilo) que otorgan aromas tropicales a maracuyá, pomelo y hierbas en el Sauvignon Blanc, en comparación a fermentaciones puras con *S. cerevisiae* (Benito, A., *et al.*, 2019; Anfang *et al.*, 2009).

*P. kluyveri* es considerada una levadura de bajo poder fermentativo ya que sólo puede fermentar hasta un 4–5% (v/v) de etanol, lo que se traduce en una capacidad insuficiente de fermentación para la producción de vinos regulares o vinos espumosos, haciendo imprescindible su combinación con una levadura fermentativa como lo es *S. cerevisiae* para la vinificación (Contreras, *et al.*, 2014; Gutiérrez, *et al.*, 2018). Aunque si bien, las cepas del género *Pichia* son sensibles al etanol y acetato (Passoth, *et al.*, 2006), muestran tolerancia a alta presión osmótica, y son eficientes en sus mecanismos de adaptación a factores de estrés (Walker, 2011).

Sin embargo, existen estudios que avalan que *P. kluyveri* tiene el poder fermentativo suficiente para producir otras bebidas como sidra y cerveza de 3,2% (v/v) sin ayuda de una *S. cerevisiae* (Vicente, *et al.*, 2021). Por otro lado, Mewa-Ngongang *et al.* (2019), describen que *P. kluyveri* tiene la capacidad de ser un agente biocontrolador, pudieron secretar compuestos extracelulares crudos con actividad de inhibición del crecimiento contra *Dekkera bruxellensis* y *Zygosaccharomyces bailii*, levaduras conocidas de deterioro en bebidas derivadas de frutas, promoviendo la muerte de agentes indeseados en bebidas fermentadas, siendo ventajosa su utilización. Otros estudios también avalan el uso de *P. kluyveri* como antagonista para aplicaciones de control biológico como alternativa a los conservantes químicos, debido a su actividad antimicrobiana incluso contra *Botrytis cinerea*. (Crafack, *et al.*, 2013; Bruto, *et al.*, 2018).

Respecto al mercado, en la actualidad existen cultivos iniciadores comerciales a base de *P. kluyveri*, destacando WLP605 (Vintner's Harvest®, Yakima, WA, EE. UU.), que actúa aumentando aromas florales y de pétalos de rosa en la fermentación, mejorando el aroma de los vinos. FROOTZEN® (Hansen®, Hoersholm, Dinamarca), ayuda a conseguir vinos blancos y rosados más afrutados y tropicales, además de vinos tintos que resultan ser elegantes y frescos, aumentando la producción de aromas

varietales (ésteres, ácido láctico y tioles volátiles como mercaptohexanol (3-MH) y acetato de mercaptohexilo (3-MHA) (Petruzzi *et al.*, 2017; Roudil *et al.*, 2019, Chr.Hansen, s.f).

### Encapsulación de levaduras como una vía de protección

La encapsulación es un sistema de protección usado como estrategia para mejorar la viabilidad de microorganismos que se desempeñan en ambientes adversos, proporcionándole una alta estabilidad fisicoquímica y un mínimo impacto en las propiedades organolépticas (Bueno, *et al.*, 2013). La microencapsulación es definida como la tecnología de empaquetamiento de sólidos, líquidos y gaseosos con materiales de recubrimiento de distinta naturaleza, para dar lugar a cápsulas de tamaño micrométrico denominadas microesferas, que pueden liberar su contenido de manera controlada bajo la influencia de condiciones específicas (Champagne, *et al.*, 2007). En los últimos años, se ha investigado en la industria enológica tecnologías de inmovilización para las levaduras y se han descrito que los sistemas de inmovilización aumentan la productividad, reducen los costes de proceso y también influyen en el metabolismo de las levaduras y, en consecuencia, en las características organolépticas del producto final (Puig, *et al.*, 2010). En el sector vínico, el sistema de inmovilización más utilizado ha sido la encapsulación de levaduras de tipo *Saccharomyces* en alginato cálcico, compuesto orgánico que se obtiene de algas marinas y que se usa tanto en el sector alimentario como en el farmacéutico (Puig, *et al.*, 2010). En este sentido, el alginato de sodio se ha estudiado como material encapsulante y de recubrimiento efectivo comúnmente usado en probióticos, debido a que es un polímero de fácil acceso, baja viscosidad y alta reactividad con los iones calcio (Ortiz, *et al.*, 2021).

La utilización de levaduras encapsuladas en esferas de alginato se ha aplicado sobre todo en el proceso de elaboración de vino espumoso ya que presenta grandes ventajas en la etapa de clarificación y degüelle de las botellas, por la rapidez con que sedimentan las levaduras en el cuello de éstas (Fumi *et al.*, 1988). En cuanto a producto comercial de levadura inmovilizada en alginato, existe de *S. cerevisiae* PRORESTART (AEB Spa, Italia) y de *Schizosaccharomyces* PROMALIC (AEB Spa, Italia).

## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1 Hipótesis

El uso de la cepa *Pichia kluyveri* YCPUC83 encapsulada en alginato de sodio es capaz de mejorar el perfil sensorial de vinos sintéticos cuando se usa en esquemas de co-fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* EC1118.

### 3.2 Objetivo general

Evaluar la potencial contribución organoléptica que *Pichia kluyveri* YCPUC83 tiene sobre el perfil aromático de los vinos sintéticos obtenidos en co-fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* EC1118.

### 3.3 Objetivos específicos

1. Crear y validar un protocolo de encapsulación en base a alginato de sodio que recubre superficialmente a la levadura *P. kluyveri* YCPUC83.
2. Determinar la viabilidad de *P. kluyveri* YCPUC83 en ensayos de co-fermentación con *S. cerevisiae* EC1118.
3. Analizar y comparar el perfil sensorial de los vinos sintéticos obtenidos en co-fermentación de *S. cerevisiae* EC1118 y *P. kluyveri* YCPUC83 y fermentaciones puras con *S. cerevisiae* EC1118.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas corresponden a *Pichia kluyveri* YCPUC83 y *Saccharomyces cerevisiae* EC1118™ (Lalvin, Lallemand Inc.). Ambas fueron obtenidas del cepario de levaduras YCPUC (*Yeast Collection Pontificia Universidad Católica de Chile*) del Laboratorio de Microbiología y Genética de Levaduras del departamento de Fruticultura y Enología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las cepas de levaduras seleccionadas se cultivaron en medio líquido de extracto de levadura peptona dextrosa (YPD) (Yeast extract-Peptide-Dextrose) compuesto de 2% glucosa, peptona al 0,5% y extracto de levadura al 0,5%). Ambas cepas se mantuvieron en agitación a 150 rpm durante 24 horas a 28°C. Posterior a ello, las cepas fueron sembradas en agar YPD a 4 °C hasta su uso.

### 4.2 Recuento celular

Para la cuantificación de células correspondientes a las cepas seleccionadas se utilizó una cámara de Neubauer (Cámara de Neubauer Improve; Precicolor, HBG, Alemania).

### 4.3 Encapsulación

Un cultivo de *P. kluyveri* YCPUC83 fue centrifugado en volumen de 1 mL a 2000 g durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se obtuvo un *pellet* de la levadura, repitiendo este proceso 4 veces. Luego, el *pellet* se llevó a un tubo con YPD fresco y se mezcló con una solución de alginato de sodio 2,27% y se dejó homogeneizando por 12 horas a temperatura ambiente.

Para la obtención de microesferas, 20 mL de la solución de alginato con la levadura fueron depositados sobre 40 mL de solución estéril de  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{-H}_2\text{O}$  0,1 M usando una boquilla de jeringa, generando gotas, las que en contacto con la solución forman la cápsula de gel (Ramírez, 2017). El tamaño de las microesferas obtenidas depende proporcionalmente del diámetro de salida de la jeringa (De Vos, *et al.*, 2010).

Una vez formadas las microesferas, se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloruro de calcio y a continuación se masaron en una balanza digital para conocer el peso en gramos que se obtuvo

#### 4.4 Fermentaciones

Para obtener el mosto y posteriormente realizar la fermentación alcohólica, se prepararon 500 mL de mosto sintético siguiendo la metodología propuesta por Novo, *et al.* (2014), el cual contiene un alto contenido de azúcar ( $120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucosa,  $120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  fructosa,  $1,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  YNB sin sulfato de amonio ni aminoácidos,  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ácido cítrico,  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ácido málico,  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  clorhidrato de amonio y  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de disulfito de potasio), La preparación fue pasteurizada a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos previo a su utilización. La unidad experimental corresponde a los 500 mL de mosto sintético y la unidad muestral a los 45 mL de este mosto que serán dispensados en cada tubo de fermentación para realizar los ensayos de esta investigación.

Los ensayos de fermentación se llevaron a cabo en 45 mL de mosto sintético contenidos en tubos falcón los cuales en sus tapas contenían una perforación la cual conecta con una manguera de silicona estéril dirigida hacia un recipiente con agua para permitir la liberación del  $\text{CO}_2$ . Las fermentaciones se realizaron en duplicado y se almacenaron en una caja cerrada en condiciones estáticas a  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  durante el proceso. Se siguió el progreso de la fermentación de forma diaria mediante la cuantificación de la pérdida de peso por liberación de  $\text{CO}_2$ , las fermentaciones se consideraron terminadas cuando la pérdida de peso en el transcurso del tiempo se hizo un valor constante.

En este estudio, la relación del inóculo de *S. cerevisiae* EC1118 y *P. kluyveri* YCPUC83 para todas las fermentaciones fue de 1:1, ambos con una población inicial de  $1 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Los ensayos de fermentación fueron denominados por sus siglas FSc para *S. cerevisiae* EC1118; FSc/*Pk*<sub>1</sub> para *P. kluyveri* encapsulada (microesferas) en co-fermentación con *S. cerevisiae* EC1118 y FSc/*Pk*<sub>2</sub> para *P. kluyveri* en co-fermentación con *S. cerevisiae* EC1118.

#### 4.5 Caracterización de mosto y vino sintético

Con el fin de caracterizar los mostos antes de iniciar la fermentación alcohólica del vino, se realizaron análisis químicos tales como medición de pH mediante un pHmetro Orion 5 Star (Singapore), el cual fue previamente calibrado mediante el empleo de soluciones estándar recomendadas por el fabricante. Para la determinación de grados Brix se utilizó un refractómetro, el cual fue calibrado previamente con agua destilada a temperatura ambiente. En cuanto a la densidad, se determinó usando un picnómetro y para la cuantificación de glucosa, amonio y nitrógeno amino primario (PAN) se utilizó el “Mega Kit Enzimático” (MEGAZYME, Irlanda).

El mosto utilizado fue preparado según la metodología propuesta por Novo, *et al.* (2014) y se realizaron análisis químicos previo a la inoculación de levaduras. La cantidad de sólidos solubles fue de 21,6 °Brix, pH= 3.5, densidad  $1.086 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , glucosa-fructosa  $220 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , amonio  $479.3 (\pm 0.01) \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y nitrógeno amino primario  $46.2 (\pm 0.003) \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 4.6 Viabilidad de *P. kluyveri* YCPUC83

Se determinó la viabilidad de *P. kluyveri* YCPUC83 encapsulada y no encapsulada mediante recuento de colonias en agar lisina. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 27 °C. El resultado se expresó en unidades formadoras de colonias (UFC).

#### 4.7 Perfil Aromático

Al finalizar el proceso fermentativo, 15 mL de cada ensayo de fermentación y co-fermentación fueron almacenaron a 4 °C hasta su análisis. Se realizó una cata sensorial olfativa con las muestras de vino, la cual fue llevada a cabo por un panel sensorial compuesto por evaluadores consumidores habituales de vino y estudiantes de enología de último año pertenecientes al Departamento de Fruticultura y Enología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los vinos fueron presentados a los evaluadores en copas negras aleatorizadas con códigos numéricos en serie de 3 dígitos a una temperatura fresca, y en cada tanda de degustación se les hizo degustar una repetición con sus respectivos tratamientos. Cada degustador realizó su evaluación en una cámara

estándar de análisis sensorial, en la cual ingresaban a un cubículo de cata en forma individual y sin un tiempo límite de degustación.

Se realizó una prueba aromática (Anexo 9.1) en la cual se asignaron puntajes de 0 (sin carácter percibido), 5 (carácter medianamente percibido) y 10 (carácter altamente percibido) para los siguientes atributos: Vegetal, Fruta cítrica, Fruta tropical, Levadura, Floral y Especias. También se asignaron valores para la aceptación general del vino en la cual el panel debía evaluar con puntajes que iban del 0 al 10 (Anexo 9.2). Por último, se hizo una prueba de ordenamiento (Anexo 9.3), en la cual el evaluador debía ordenar de mayor a menor su preferencia en cuanto a los 3 diferentes vinos, siendo 1 el vino de mayor preferencia, 2 el medianamente preferido y 3 el menor.

#### 4.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los análisis de laboratorio y catas sensoriales se analizaron mediante el programa Statgraphics Centurion versión XVI.I (Statpoint Technologies, Estados Unidos) a través de un análisis de varianza (ANOVA), aplicando una prueba estadística comparativa de múltiples rangos. Los tratamientos de fermentación se consideraron significativos cuando los valores de  $p < 0,05$

## 5. Resultados y Discusiones

### 5.1 Encapsulación de *Pichia kluyveri*

Las levaduras no-*Saccharomyces* tienen un papel importante en las fermentaciones espontáneas hasta que el nivel de etanol alcanza el 4% (v/v), pues a partir de ese nivel, la mayoría de las especies de este grupo no toleran el contenido de etanol presente en el medio (Benito, A., *et al.*, 2019; Calderón *et al.*, 2019; Hierro *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2016). En general, los géneros de levaduras con una baja resistencia al etanol predominan en la primera etapa de arranque de la fermentación tales como *Hanseniaspora*, *Candida*, *Rodotorula* y *Pichia* y aquellos géneros con resistencia moderada al etanol persisten más tiempo (*Lachancea*, *Torulaspota*), siendo el género *Saccharomyces* el que domina el medio fermentativo hasta que se metabolizan por completo en etanol todos los azúcares fermentables (Röcker *et al.*, 2016; Manzanares *et al.*, 2011; Benito, S., *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2016). Autores como Hu *et al.*, (2018) han

indicado que la levadura *P. kluyveri* es altamente sensible a las concentraciones de etanol en el medio, por lo que, a medida que avanza la fermentación ésta va perdiendo viabilidad en gran medida, sobreviviendo hasta los 3-4% v/v de etanol en el medio.

En este estudio, se evaluó un método de recubrimiento para la encapsulación de la levadura *P. kluyveri* YCPUC83 en base a alginato de sodio con el fin de mejorar su viabilidad durante la fermentación. De acuerdo con lo descrito en la sección 4.3, se obtuvieron microesferas de 2 mm de diámetros aproximadamente (Figura 1) las cuales fueron almacenadas en una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M para ser utilizadas en las fermentaciones.



**Figura 1.** Levadura *P. kluyveri* YCPUC83 encapsulada en alginato de sodio.

La microencapsulación de levaduras tiene el fin de mejorar los procesos actuales de producción de vino y se presenta como una alternativa novedosa para mitigar algunos problemas actuales de la industria. En la actualidad se ha puesto énfasis en las técnicas de inmovilización de la levadura fermentativa *S. cerevisiae* para la producción de bebidas alcohólicas, presentando ventajas clave como estabilidad y supervivencia celular, la mejora en la productividad de fermentación y los costos bajos de recuperación y procesamiento posterior (Kourkatous *et al.*, 2004). Del mismo modo, se ha reportado la utilización de levaduras *S. cerevisiae* encapsuladas en esferas de alginato de calcio en la elaboración de vino espumoso, ya que, de esta forma, se ha logrado aumentar la productividad de la fermentación y la clarificación de los vinos, presentando ventajas en sobre todo en el degüelle al permitir sedimentar con mayor rapidez las levaduras hacia el cuello de la botella (Tsakiris *et al.*, 2004; Fumi *et al.*, 1988).

## 5.2 Cinética de fermentación y parámetros fermentativos

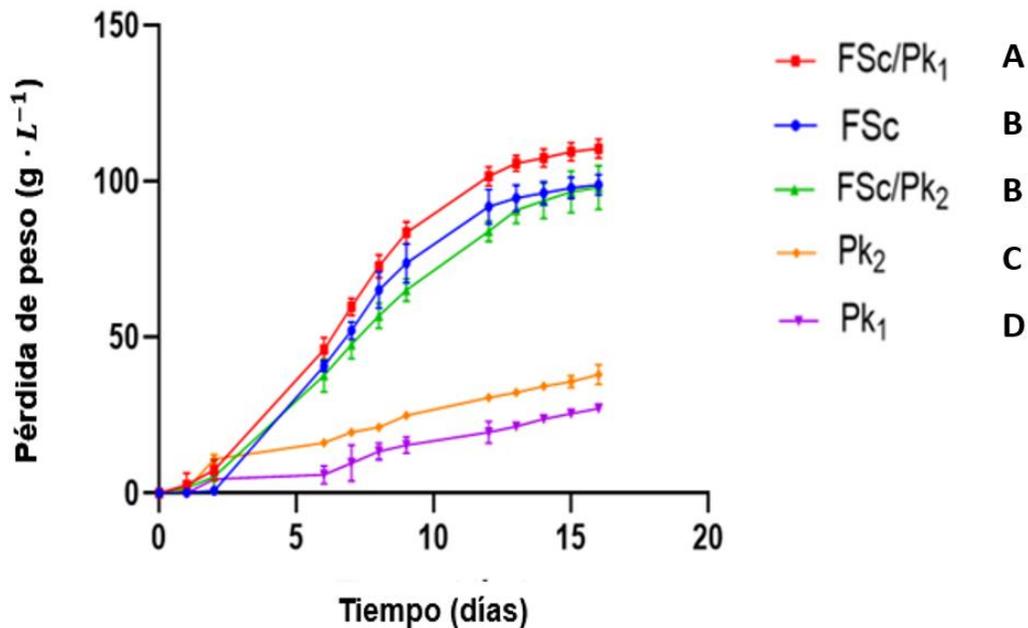
Una vez realizada la inmovilización, se evaluó la capacidad fermentativa de *P. kluyveri* YCPUC83 encapsulada ( $Pk_1$ ), sin encapsular ( $Pk_2$ ) y en co-fermentaciones con *S. cerevisiae* EC1118 ( $FSc/Pk_1$  y  $FSc/Pk_2$ ). En la tabla 1 se detallan los ensayos realizados en este estudio en condiciones de laboratorio.

**Tabla 1.** Experimentos realizados con levadura *S. cerevisiae* EC1118 y *P. kluyveri* YCPUC83.

Simbología	Fermentaciones
$FSc$	<i>S. cerevisiae</i> EC1118
$FSc/Pk_1$	<i>S. cerevisiae</i> EC1118 + <i>P. kluyveri</i> YCPUC83 (encapsulada)
$FSc/Pk_2$	<i>S. cerevisiae</i> EC1118 + <i>P. kluyveri</i> YCPUC83
$Pk_1$	<i>P. kluyveri</i> YCPUC83 (encapsulada)
$Pk_2$	<i>P. kluyveri</i> YCPUC83

Para las fermentaciones, se utilizó la cepa comercial de la levadura *S. cerevisiae* LALVIN EC1118™ (Lallemand Inc, Chile) la cual se encuentra ampliamente descrita, caracterizada y secuenciada. A nivel enológico ha demostrado ser eficiente y rápida en el consumo de azúcares durante la fermentación alcohólica.

El seguimiento de la cinética de fermentación se monitoreó mediante la pérdida de peso realizando mediciones diarias durante 16 días. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.



**Figura 2.** Curvas de pérdida de peso ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) en función del tiempo (días) de las fermentaciones con cepas de levadura *S. cerevisiae* EC1118 y *P. kluyveri* YCPUC83. Las curvas fueron construidas con los valores promedio de las repeticiones por tratamientos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El método de diferencia mínima significativa (LSD) fue utilizado para encontrar diferencias entre medias. Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas al nivel de confianza del 95%.

La fermentación tuvo una duración de 16 días, determinando el final de ésta cuando el valor de la pérdida de peso se volvió constante para cada ensayo. La fermentación FSc/Pk<sub>1</sub> fue la que obtuvo la mayor pérdida de peso con una media de  $110,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . En lo que respecta a FSc y FSc/Pk<sub>2</sub> no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, lo que podría sugerir que *S. cerevisiae* EC1118 se impuso en la fermentación que contenía a *P. kluyveri* YCPUC83 no encapsulada durante la fermentación.

Por otro lado, los resultados de la figura 2 sugieren que los ensayos de fermentación mono-inoculados con *P. kluyveri* YCPUC83 encapsulada y sin encapsular (Pk<sub>1</sub> y Pk<sub>2</sub>) no tuvieron la capacidad suficiente de fermentar la totalidad de los azúcares

presentes en el mosto. Sin embargo, si presentaron diferencias significativas en estas fermentaciones, por lo que el método de recubrimiento en *P. kluyveri* YCPUC83 (*Pk*<sub>1</sub>) limitó la pérdida de peso en comparación a *Pk*<sub>2</sub>.

Es comúnmente aceptado que la utilización de una levadura no-*Saccharomyces* en monocultivo no permite un acabado correcto y seguro de la fermentación (azúcares residuales < 2 g/L) (Raynal, *et al.*, 2010)

El efecto Crabtree en las células de levadura se describe como la fermentación preferencial de altos niveles de glucosa incluso en condiciones totalmente aeróbica, las levaduras que muestran un efecto Crabtree son Crabtree positivas, como *S. cerevisiae* (De Deken, 1966). Contrariamente, *P. kluyveri* es de tipo Crabtree negativa, lo que significa que su metabolismo fermentativo en presencia de oxígeno es muy limitado y caracteriza por ser una levadura más bien aeróbica de bajo poder fermentativo con la capacidad de metabolizar solo glucosa (y no otros azúcares), por lo que se hace esencial su combinación con *S. cerevisiae* para completar la fermentación alcohólica (Contreras, *et al.*, 2014; Gutiérrez, *et al.*, 2018; Benito, S. *et al.*, 2011). En este sentido, la utilización de inóculos seleccionados de *Saccharomyces* permite asegurar un buen desarrollo de la fermentación alcohólica, lo cual se traduce en una mejora de la calidad general de los vinos y a responder a las exigencias actuales de la industria.

Del mismo modo, para aprovechar las características sensoriales de las levaduras no-*Saccharomyces*, se han establecido herramientas de inoculación secuencial que permiten efectuar fermentaciones alcohólicas seguras garantizando el consumo total de los azúcares. La alternancia de poblaciones de levaduras no-*Saccharomyces* y a continuación de levaduras del género *Saccharomyces*, contribuye a la intensidad y complejidad aromática de los vinos (Raynal, *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha sugerido el uso de levaduras enológicas no-*Saccharomyces* en co-cultivo con cepas *Saccharomyces* para aumentar el contenido de glicerol (Soden *et al.*, 2000), para desacidificar el jugo de uva o el vino y reducir el contenido de ácido acético (Bely *et al.*, 2008; Rantsiou *et al.*, 2012), para potenciar la acidez total de los vinos (Mora *et al.*, 1990; Kapsopoulou *et al.*, 2007) e incluso para producir vinos con un contenido de alcohol más bajo (Hranilovic, *et al.*, 2020).

En este estudio se utilizó la estrategia de co-inoculación o co-fermentación para los ensayos de fermentación. Los resultados de la figura 2 muestran que la fermentación FSc/Pk<sub>1</sub> tuvo una mayor pérdida de peso (110,5 g·L<sup>-1</sup>) durante los 16 días, la que es significativa en comparación con los otros tratamientos y los análisis cinéticos de las fermentaciones (Tabla 2) muestran que esta fermentación presentó el mayor rendimiento fermentativo, medido como área bajo la curva (997) con diferencia estadísticamente significativa respecto a FSc y FSc/Pk<sub>2</sub>. sin paralizaciones o retrasos importantes en la culminación del proceso, tal como se esperaría que pasara en una fermentación secuencial, siendo la co-inoculación de *P. kluyveri* YCPUC83 con *S. cerevisiae* EC1118 una alternativa interesante de seguir investigando en micro vinificación.

Mientras que FSc y FSc/Pk<sub>2</sub> no mostraron diferencias entre tratamientos, siendo FSc/Pk<sub>2</sub> el con menor rendimiento fermentativo de los 3 tratamientos. Estos resultados sugieren que la encapsulación de *P. kluyveri* YCPUC83 permite obtener un mayor rendimiento fermentativo cuando se co-inocula con *S. cerevisiae* EC1118, lo que podría estar relacionado con su viabilidad. Las levaduras del tipo No-*Saccharomyces*, poseen un metabolismo fermentativo que se ve afectado por el alza del contenido del etanol (% v/v) en el transcurso de la fermentación debido a la competencia que se genera por *S. cerevisiae*, quien termina dominando la fermentación como han descrito autores citados anteriormente.

Adicionalmente, y basado en los reportado por Peltier, *et al.*, (2018), se analizaron los parámetros fermentativos de velocidad máxima fermentativa  $\mu_{max}$  (h<sup>-1</sup>), duración de la fase *lag* (h) y tiempo generacional (h).

**Tabla 2:** Valores de parámetros enológicos en los 3 vinos con las cepas *P. kluyveri* YCPUC83 y *S. cerevisiae* EC1118 mediante los 3 formatos del estudio (FSc: *S. cerevisiae* EC1118; FSc/Pk<sub>1</sub>: *S. cerevisiae* EC1118/*P. kluyveri* YCPUC83 encapsulada; FSc/Pk<sub>2</sub>: *S. cerevisiae* EC1118/*P. kluyveri* YCPUC83).

	<b>Rendimiento (ABC)</b>	<b>Tasa específica de crecimiento <math>\mu_{\max}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tiempo generacional (h)</b>	<b>Fase lag (h)</b>
FSc	877,6 ± 42 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,3 <sup>a</sup>	79,19 ± 11,4 <sup>a</sup>
<i>FSc/Pk<sub>1</sub></i>	997 ± 50 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,007 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	75,3 ± 22 <sup>a</sup>
<i>FSc/Pk<sub>2</sub></i>	819 ± 12 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,61 ± 0,1 <sup>a</sup>	63,9 ± 6,2 <sup>a</sup>

Los ensayos de cada fermentación fueron realizados en duplicado y los resultados corresponden al promedio con su respectiva desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante análisis de ANDEVA y se realizó una prueba de múltiples rangos. El método de diferencia mínima significativa (LSD) fue utilizado para encontrar diferencias entre medias. Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas al nivel de confianza del 95%.

En cuanto a velocidad máxima de fermentación  $\mu_{\max}$  (h<sup>-1</sup>), tiempo generacional y fase lag, no existen diferencias significativas entre los 3 tratamientos. Esto es positivo, ya que sugiere que, la presencia de la cepa de *P. kluyveri* YCPUC83 no afectó el comienzo de la fermentación, ni el transcurso y finalización de ésta, pudiendo ser compatible para ser co-fermentada con *S. cerevisiae* EC1118.

### 5.3 Caracterización química

Se realizaron análisis químicos del vino modelo resultante, los cuales se detallan en la tabla 3. La densidad en este estudio se calculó como la masa volumétrica del vino o del mosto a una determinada temperatura mediante un picnómetro de vidrio y los valores adecuados para un vino terminado oscilan entre 0,983-1,003 g·mL<sup>-1</sup> según Panreac, (2000) por lo que, según los valores de densidad obtenidos, estos estarían dentro del rango.

En cuanto a valores de densidad no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En cambio, los valores de azúcares residuales (g·L<sup>-1</sup>) si presentan diferencias, siendo el vino modelo resultante de la fermentación

FSc/Pk<sub>1</sub> el que dejó una menor cantidad de azúcares residuales (0,85 (g·L<sup>-1</sup>) de Glucosa-Fructosa respecto a los tratamientos,

**Tabla 3:** Composición química de los vinos (g·L<sup>-1</sup> y mg·L<sup>-1</sup>)

	<b>Densidad</b> <b>(g·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Azúcar</b> <b>Residual (g·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nitrógeno Total</b> <b>(mg·L<sup>-1</sup>)</b>
<b>FSc</b>	988,5 ± 3,5 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,3 <sup>ab</sup>	148,37 ± 8,2 <sup>a</sup>
<b>FSc/Pk<sub>1</sub></b>	983 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,03 <sup>a</sup>	154 ± 0,3 <sup>a</sup>
<b>FSc/Pk<sub>2</sub></b>	986,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	6,98 ± 0,65 <sup>b</sup>	202,9 ± 2,5 <sup>b</sup>

Los experimentos fueron realizados en duplicado y los resultados corresponden al promedio. Letras diferentes dentro de una columna muestran diferencias significativas entre vinos, de acuerdo con el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) con un nivel del 95% de confianza.

En cuanto a fuentes de carbono residuales (Glucosa-Fructosa), según la Organización Internacional del Vino (OIV) un vino se considera seco cuando contiene menos de 2 g·L<sup>-1</sup> de azúcares residuales y se considera semiseco cuando no supera los 12 g·L<sup>-1</sup> (OIV, 2016). En este estudio, existen diferencias significativas en los azúcares residuales que dejó cada tratamiento que involucra a *P. kluveri* YCPUC83, observándose que FSc/Pk<sub>1</sub> fue el tratamiento que dejó una menor cantidad de azúcares residuales, inclusive menor a 2 g·L<sup>-1</sup> dejando completamente seco el vino y diferenciándose significativamente del vino resultante de la fermentación de FSc/Pk<sub>2</sub>, el cual quedó semiseco según la OIV.

En el análisis de la tabla 2, se comentó que FSc/Pk<sub>1</sub> obtuvo el mejor rendimiento fermentativo, y los resultados de la tabla 3, muestran que FSc/Pk<sub>1</sub> deja la menor cantidad de azúcares residuales en el tiempo, con 0.85 g·L<sup>-1</sup>, mientras que FSc/Pk<sub>2</sub> deja 6,9 g·L<sup>-1</sup> y FSc 4.8 g·L<sup>-1</sup>. Estos resultados sugieren que la inmovilización en la cepa *P. kluveri* YCPUC83 permite obtener vinos secos (2 g·L<sup>-1</sup> de azúcar residual) cuando se

combina con *S. cerevisiae* EC1118 en menos tiempo de fermentación, optimizando el proceso.

Por otro lado, en cuanto a concentraciones de amonio, la fermentación FSc/Pk<sub>2</sub> dejó 160 mg·L<sup>-1</sup> de amonio residual, siendo significativamente mayor respecto a los otros tratamientos. Esto sugiere que la cepa de *P. kluyveri* YCPUC83 en forma libre y en co-fermentación con *S. cerevisiae* EC1118 no metaboliza el amonio en su totalidad, lo que se relaciona con el alto nivel de azúcar residual que dejó la misma fermentación.

Los compuestos nitrogenados presentes en mosto y vino desempeñan una función importante en la fermentación de las levaduras y por eso su control es imprescindible. La cantidad de estos compuestos oscila entre 60-2400 mg·L<sup>-1</sup> y lo forman una gran variedad de moléculas: aminoácidos, amonio, proteínas, péptidos y polipéptidos y en menor medida aminas, amidas, urea, pirimidinas, purinas, nitratos y nitritos (Zoecklein *et al.*, 2001, Dukes and Butzke, 1998). El Nitrógeno Amino Primario (PAN) está dentro del conjunto del Nitrógeno fácilmente asimilable por la levadura, y es aportado por los aminoácidos. En este estudio, no se presentaron diferencias en los tratamientos respecto al consumo de PAN por parte de las levaduras.

#### 5.4 Viabilidad de *P. kluyveri* YCPUC83

La viabilidad de las levaduras es importante para ejercer una presión ecológica sobre las levaduras indígenas y permitir la implantación (Raynal, *et al.*, 2010). Se considera que una célula de levadura es viable cuando es capaz de reproducirse y existen métodos como tinción con azul de metileno para tinción de componentes celulares, sin embargo, esta técnica no establece de forma directa la capacidad de división celular, pero sí evalúa otros aspectos de importancia para el funcionamiento y vitalidad celular por lo que también se emplea para obtener medidas de viabilidad (Jenkins *et al.*, 2011).

En cuanto a microencapsulación de levaduras, Shi *et al.*, (2013) han reportado que la carga de células encapsuladas es afectada en el tiempo por varios factores, como el tamaño de la boquilla al momento de crear la cápsula, la concentración de polímero, el tiempo de endurecimiento en cloruro de calcio, la concentración celular inicial y las condiciones del medio en el que se encuentra. Cualquier condición o situación que

represente un estrés para la levadura (hiperosmolaridad, falta de nutrientes, contenido de etanol, etc.) puede afectar la viabilidad celular de ésta (Pardo, *et al.*, 2009).

Se determinó la viabilidad de *P. kluyveri* YCPUC83 encapsulada mediante la metodología descrita en el apartado 4.5. El resultado obtenido indicó que la viabilidad de la cepa *P. kluyveri* YCPUC83 encapsulada fue de un 86,26% al final de la fermentación. Por su parte, el recuento celular de la cepa *P. kluyveri* YCPUC83 sin encapsular resultó ser 10 veces mayor, observándose crecimiento en un orden de magnitud. La diferencia observada en la viabilidad de la levadura encapsulada y no encapsulada sugiere que la inmovilización de la levadura afecta negativamente la viabilidad. Sin embargo, observamos que en la fermentación FSc/Pk<sub>1</sub> células de *P. kluyveri* se liberaron de la cápsula de alginato al mosto/vino, y no fueron consideradas en el recuento. En consiguiente, determinar el factor de viabilidad en una fermentación alcohólica, puede ser considerado como un buen indicador de la "calidad" de la levadura usada y de la efectividad del método de recubrimiento propuesto en este estudio, pudiendo considerarse como una posible ventaja para su implementación en otros escenarios fermentativos.

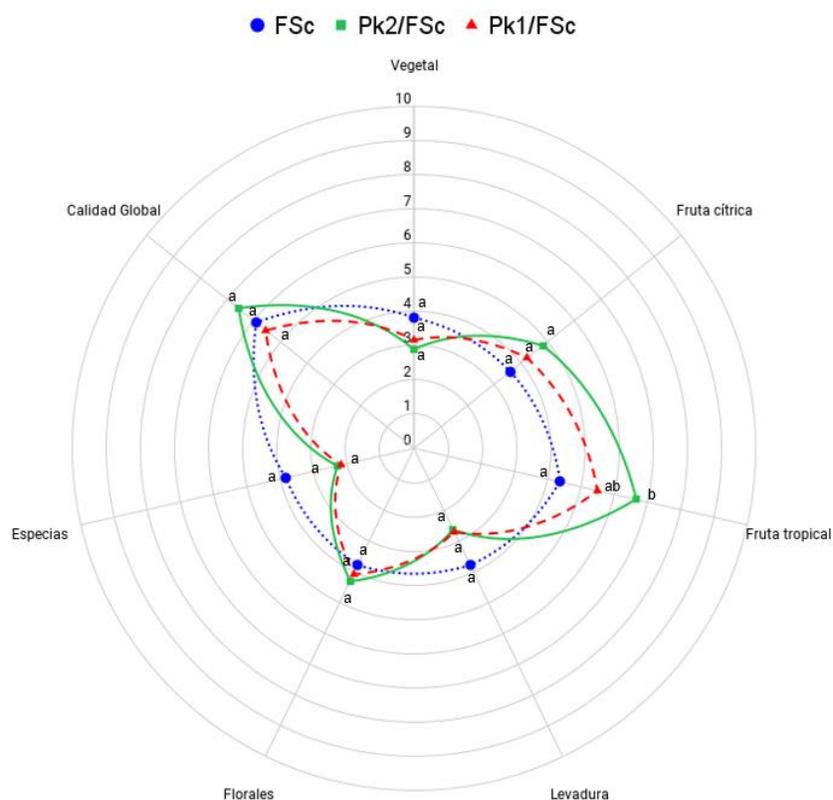
## 5.5 Análisis del perfil sensorial de los vinos.

Autores como Holt, *et al.* (2018); Michel, *et al.* (2016) y Saerens & Swiegers (2017) han descrito que *P. kluyveri*, en fermentación genera una elevada cantidad de acetato de isoamilo (80 mg/l después de dos días de fermentación) y que también produce otros compuestos frutales, como propionato y butirato de etilo (banana), valerato de etilo (manzana), decanoato de etilo (frutado, manzana) y octanoato de etilo (aromas a banana, fruta tropical, manzana, coñac), también han reportado la capacidad de esta especie de convertir precursores naturales presentes en las uvas en tioles polifuncionales, que proporcionan aroma a frutas tropicales al vino y promueve la acumulación de alcoholes complejos, terpenos totales y en tioles totales.

Se buscó evaluar el potencial organoléptico que *P. kluyveri* YCPUC83 entrega al perfil aromático de los vinos obtenidos en co-fermentación, en comparación a vinos mono-inoculados con *S. cerevisiae* EC1118. Para determinar la presencia del carácter aromático de *P. kluyveri* y como éste era percibido, se realizó una cata aromática. Las

evaluaciones sensoriales fueron realizadas por un panel sensorial compuesto de 20 jueces, los cuales se consideraron en su mayoría estudiantes de enología de último año pertenecientes al Departamento de Fruticultura y Enología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, así como también, consumidores naturales de vino. La evaluación sensorial se llevó a cabo en el Laboratorio de Enología de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal UC, en donde se utilizaron copas tulipán de color negro estandarizadas AFNOR recomendadas por la Organización Internacional del Vino (OIV). Se realizaron pruebas de aromas tales como test de tríos y análisis de aromas según aromas percibidos y su intensidad.

Al término de la fermentación alcohólica se evaluó el perfil aromático de los vinos generados de los tratamientos y el control. Se analizaron 6 descriptores aromáticos y la calidad global de cada vino que se observa en la Figura 3, en donde además se representan las diferencias significativas entre vinos en cada parámetro descriptivo indicado con letras a y b.



**Figura 3:** Análisis descriptivo de los vinos fermentados con la cepa *P. kluyveri* YCPUC83 y *S. cerevisiae* EC1118, siendo FSc: *S. cerevisiae* EC1118; FSc/Pk<sub>1</sub>: *S. cerevisiae* EC1118/*P. kluyveri* YCPUC83 encapsulada en alginato de sodio; FSc/Pk<sub>2</sub>: *S. cerevisiae* EC1118/*P. kluyveri* YCPUC83. Los datos para cada descriptor representan la media aritmética de las puntuaciones otorgadas por los 20 catadores. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza ANOVA. Letras diferentes indican diferencias significativas en el nivel de confianza del 95%.

Los resultados muestran que el descriptor “Fruta tropical” fue estadísticamente distinto entre FSc/Pk<sub>2</sub> en comparación a FSc, siendo un descriptor que los degustadores pudieron sentir en mayor proporción en los tratamientos que implican el uso de *P. kluyveri* YCPUC83 en co-fermentación con *S. cerevisiae* EC1118. Este resultado va en línea con otros reportes que indican que el uso de *P. kluyveri* en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae* promueve el aumento de la producción de 3-MH (3-Mercaptohexan-1-ol) y 3-MHA (3-Mercaptohexilo) que otorgan aromas tropicales a maracuyá y pomelo, en comparación a fermentaciones puras de *S. cerevisiae* en vinos de Sauvignon Blanc (Anfang *et al.*, 2009).

Por otro lado, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los vinos respecto a los otros descriptores aromáticos evaluados. Sin embargo, existe una tendencia marcada en el vino FSc (*S. cerevisiae* EC1118) respecto a caracteres aromáticos a Especies, Levadura y Vegetal. De igual manera, FSc fue el vino con menor tendencias a aromas a Fruta Cítrica, Fruta Tropical y Florales según el panel de degustadores.

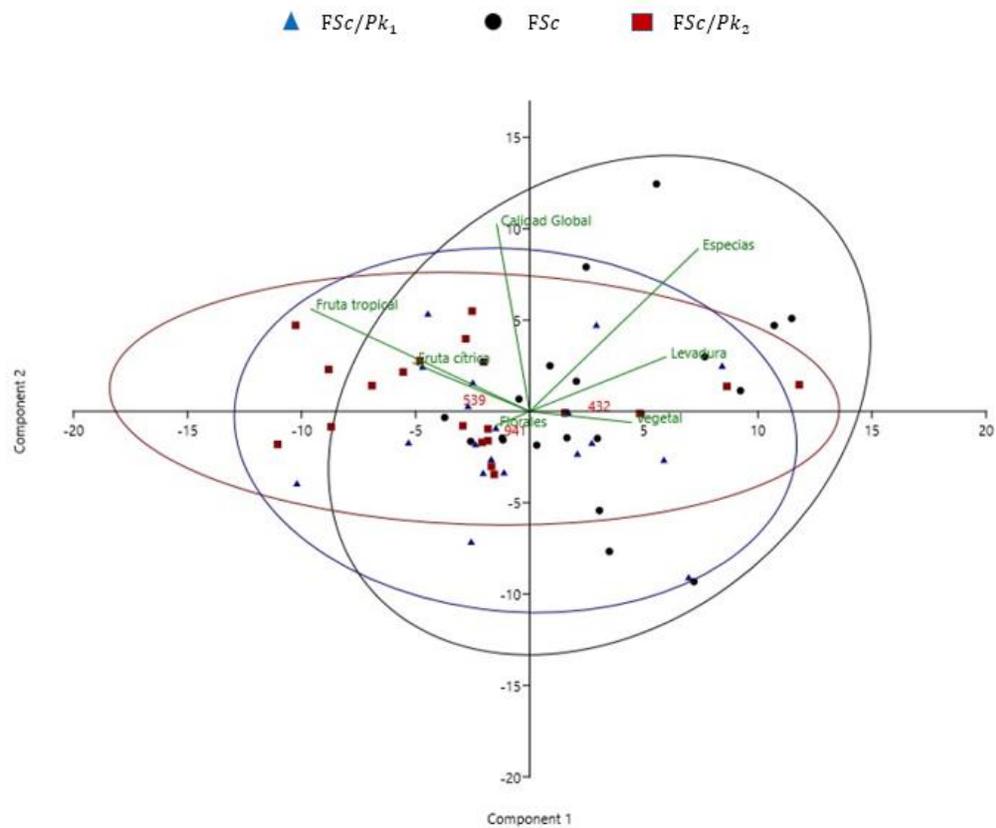
En cuanto a la tendencia en el comportamiento de los vinos FSc/Pk<sub>1</sub> y FSc/Pk<sub>2</sub>, ambos tuvieron tendencias similares en cuanto a la intensidad de los descriptores aromáticos, no teniendo diferencias significativas entre ambos en ninguno de los aromas descritos, siendo FSc/Pk<sub>2</sub> mejor evaluado en cuanto a calidad global del vino posiblemente por presentar, además, más puntuación en aromas a Fruta Tropical, Fruta Cítrica y Florales.

Resultados similares han sido reportados por Padilla *et al.* (2016) quienes indican que los vinos obtenidos de fermentaciones en las cuales participan las levaduras del tipo

No-Saccharomyces, especialmente *P. kluyveri*, aportan mayor complejidad aromática y reflejando una mejor calidad organoléptica del vino.

### 5.5.1 Análisis de Componentes Principales

Los resultados obtenidos de los perfiles aromáticos para cada vino fueron analizados mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) para explicar la variabilidad de los datos, con el fin de buscar relaciones existentes entre los caracteres aromáticos y los ensayos de co-fermentación con *P. kluyveri* YCPUC83 y *S. cerevisiae* EC1118 (Figura 4).

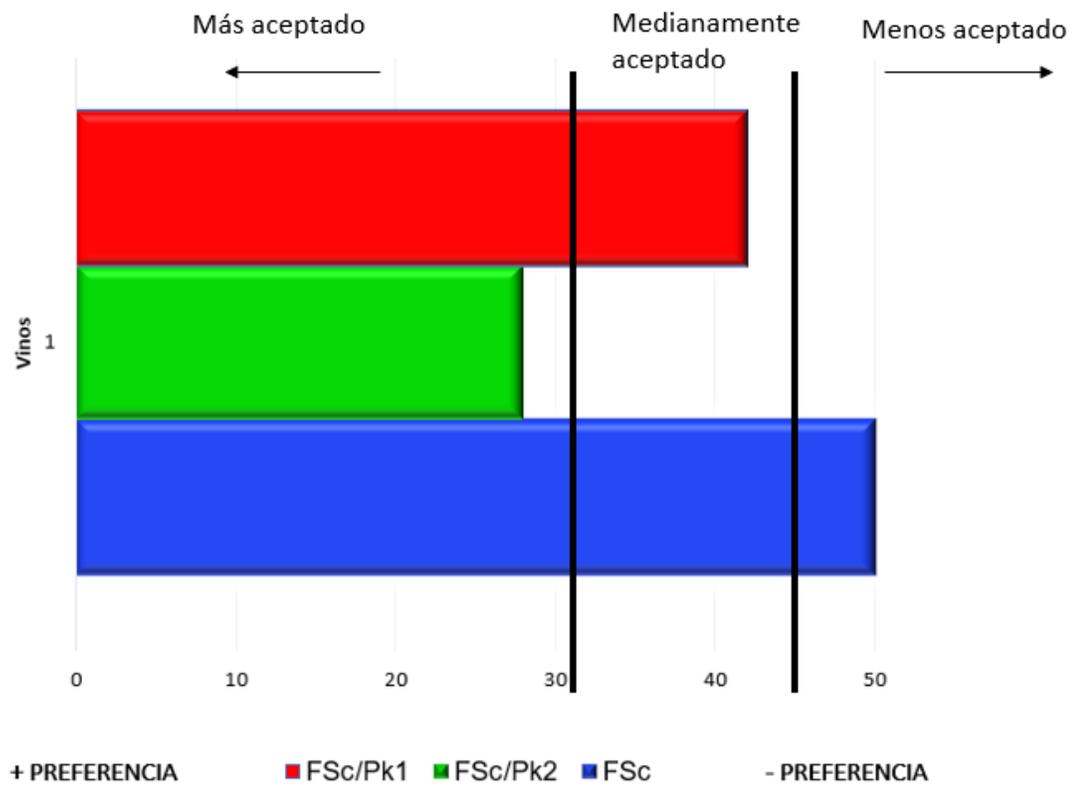


**Figura 4:** Gráfico de puntuaciones de los vinos obtenidos en co-fermentación *S. cerevisiae* EC1118 / *P. kluyveri* YCPUC83 inmovilizada en alginato de sodio y de forma libre. ( $FSc/Pk_1$  y ( $FSc/Pk_2$  respectivamente), además del vino control inoculado con *S. cerevisiae* EC1118 ( $FSc$ ).

Los resultados muestran que las co-fermentaciones de *P. kluyveri* YCPUC83/*S. cerevisiae* EC1118 se relacionan con la mayor formación de ésteres, terpenos y tioles, favoreciendo el perfil aromático de los vinos resultantes, potenciando descriptores aromáticos tales como Frutal Tropical, Florales y Fruta Cítrica (los cuales van en una misma dirección en el plano, lo que asevera que existió relación entre estos aromas y los vinos). En cambio, el vino FSc presentó una mayor tendencia a los descriptores Especies, Levadura y Vegetales. Sin embargo, se correlacionan los 3 tipos de vinos entre sí debido a que, en la mayoría de los aromas, no se presentan diferencias claras y por lo tanto, no hay distribuciones específicas de posición en el plano para cada vino, sino que existe un traslape en los ejes en los tres tipos de vinos.

### 5.5.2 Nivel de aceptación de los vinos

El nivel de aceptación de los vinos fue evaluado mediante una prueba de ordenamiento. Como resultados de esta prueba, se obtuvo que el vino FSc resultó ser el menos aceptado, el vino FSc/*Pk*<sub>1</sub> medianamente aceptado y FSc/*Pk*<sub>2</sub> el tratamiento con mayor aceptación por parte del panel de jueces (Figura 5) siguiendo la metodología de “Tabla de los rangos” propuesta por Kramer (1963). Estos resultados se alinean con lo reportado en este estudio, donde el uso de *P. kluyveri* YCPUC83 en co-fermentación con *S. cerevisiae* EC1118 obtuvo preferencias en el ámbito organoléptico y sensorial en los vinos obtenidos, mejorando la calidad aromática y obteniendo un mayor nivel de aceptación en los vinos que fueron co-inoculados con *P. kluyveri* YCPUC83 en comparación al vino que se fermentó solo con *S. cerevisiae* EC1118.



**Figura 5.** Prueba de ordenamiento que indica la aceptación de vinos por parte del panel de jueces. Interpretación de datos se realizó siguiendo la metodología de “Tabla de los rangos” propuesta por Kramer (1963).

## 6. Conclusión

En este estudio, se encapsuló la cepa *P. kluyveri* YCPUC83 para su uso en co-fermentación. Los resultados indican que mediante esta estrategia se asegura más de un 86% de viabilidad en el final de la fermentación alcohólica en co-fermentación con *S. cerevisiae* EC1118, sugiriendo ser una alternativa interesante de replicar en futuros estudios que busquen mejorar el rendimiento fermentativo, dejar una menor cantidad de azúcares residuales en el tiempo y proporcionar una alta tasa de viabilidad. Esta estrategia permite efectuar fermentaciones alcohólicas seguras garantizando el consumo total de los azúcares teniendo un efecto evidente de la sinergia de estos dos inóculos en cuanto a materias de complejidad e intensidad aromática.

Aunque son necesarios estudios adicionales con mostos de uva naturales, las propiedades organolépticas de los vinos elaborados con *P. kluyveri* YCPUC83 han sido reflejadas desde la aceptabilidad analítica y sensorial de los vinos producidos en co-fermentación según las pruebas de análisis sensorial realizadas, en las cuales queda reflejada la preferencia por los vinos que contienen la levadura, presentando una mayor tendencia hacia aromas frutales y florales, mientras que el vino que contenía sólo *S. cerevisiae* EC1118, presentó menor aceptabilidad analítica y una mayor tendencia hacia aromas a especias y levadura.

Los resultados de esta investigación invitan a seguir la línea investigativa en torno a la encapsulación de *P. kluyveri*, su impacto organoléptico, rendimiento fermentativo y viabilidad en fermentaciones posteriores.

## 7. Resumen

**Francisca Riquelme Toledo. Encapsulación y evaluación de la cepa de *Pichia kluyveri* YCPUC83 para su uso en co-fermentaciones en mosto sintético.** Tesis, Magister en Fisiología y Producción Vegetal, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

*Pichia kluyveri* is a Non-Saccharomyces yeast that is characterized by its contribution to the aromatic potential of wines. However, it only survives in the first stage of fermentation before *Saccharomyces cerevisiae* completely dominates the medium. The main objective of this study was to evaluate the potential organoleptic contribution that *Pichia kluyveri* YCPUC83 has on the aromatic profile of wines obtained in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. A sodium alginate-based medium 2,27% that allows *P. kluyveri* to be encapsulated was evaluated in order to ensure its viability until the end of fermentation. Then, fermentations with encapsulated and non-encapsulated *P. kluyveri* were carried out in co-fermentation with *S. cerevisiae* EC1118 and oenological parameters and sensory profile of the wines were evaluated. The results of this study suggest that the encapsulation technique in *P. kluyveri* YCPUC83 turns out to be an interesting and innovative alternative for the oenological industry, since it is capable of improving fermentation performance, ensuring viability at the end of fermentation without affecting oenological parameters. On the other hand, co-fermenting with yeast improves the sensory profile of wines, as it demonstrates a clear trend in obtaining floral, fruity and tropical aromas compared to wines obtained by fermentation with *S. cerevisiae* EC1118.

**Key words: Wine Aroma, *Pichia kluyveri*, Sodium alginate, Encapsulation, co-inoculation**

## 8. Referencias

**Anfang, N., M. Brajkovich, and M.R. Goddard.** (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in sauvignon blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15(1): 1–8. [https://www.researchgate.net/publication/230254637\\_Anfang\\_N\\_Brajkovich\\_M\\_Goddard\\_MR\\_Co-fermentation\\_with\\_Pichia\\_kluyveri\\_increases\\_varietal\\_thiol\\_concentrations\\_in\\_Sauvignon\\_Blanc\\_Aust\\_J\\_Grape\\_Wine\\_R\\_15\\_1-8](https://www.researchgate.net/publication/230254637_Anfang_N_Brajkovich_M_Goddard_MR_Co-fermentation_with_Pichia_kluyveri_increases_varietal_thiol_concentrations_in_Sauvignon_Blanc_Aust_J_Grape_Wine_R_15_1-8)

**I, Ruiz J, Esteban–Fernández A, Navascués E, Marquina D, Santos A.** (2017) Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* 22:189

**Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D.** (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International journal of food microbiology*, 122(3), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>

**Benito, S., Morata, A., Palomero, F., González, C., Suárez-Lepe, J. A.** (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chemistry*. [https://www.researchgate.net/publication/222085979\\_Formation\\_of\\_vinylphenolic\\_pyranoanthocyanins\\_by\\_Saccharomyces\\_cerevisiae\\_and\\_Pichia\\_guilliermondii\\_in\\_red\\_wines\\_produced\\_following\\_different\\_fermentation\\_strategies](https://www.researchgate.net/publication/222085979_Formation_of_vinylphenolic_pyranoanthocyanins_by_Saccharomyces_cerevisiae_and_Pichia_guilliermondii_in_red_wines_produced_following_different_fermentation_strategies)

**Benito, Á., F. Calderón, and S. Benito.** (2019). The influence of non-saccharomyces species on wine fermentation quality parameters. *Fermentation* 5(3): 1–18. <https://www.mdpi.com/2311-5637/5/3/54>

**Benito S, Ruiz J, Belda I, Kiene F, Beisert B, Navascués E, Marquina D, Calderón F, Santos A, Rauhut D** (2019). Application of Non-Saccharomyces Yeasts in

Wine Production. In *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. Springer, Cham

**Bruto, S.; Kunz, L.; Muller, DC; Santos Kron, A.; Freimoser, FM.** (2018). Caracterización de levaduras antagónicas para aplicaciones de biocontrol en manzanas o en suelo mediante análisis cuantitativos de comunidades de levaduras sintéticas.

**Bueno, G.; Gastón, C.; Pérez, H.; Brizuela, M.; Tortoló, K.** (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Disponible en: [http](http://www.icidca.com)

**Calderón, F., Benito, Á., & Benito, S.** (2019). Schizosaccharomyces pombe and Lachancea thermotolerans: Joint Use as an Alternative to the Traditional Fermentations by Saccharomyces cerevisiae and Oenococcus oeni in Oenology. In *Alcoholic Beverages* , 387-417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815269-0.00012-X>

**Champagne, C. and P. Fustier.** (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2): 184- 190. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166907000328>

**Chr. Hansen** (s.f). FrootZen™ es una cepa única de Pichia kluyveri que proporciona un efecto antioxidante y mejora las notas afrutadas de su vino. [https://enolviz.com/\\_documentos/Viniflora-FrootZen\\_OnePager-PRINT-ES.pdf](https://enolviz.com/_documentos/Viniflora-FrootZen_OnePager-PRINT-ES.pdf)

**Contreras, A.; Hidalgo, C.; Henschke, Pensilvania; Cámaras, PJ; Curtín, C.; Varela, C.** (2014). Evaluación de levaduras no Saccharomyces para la reducción del grado alcohólico en vinos. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>

**Crafack, M.; Mikkelsen, MB; Saerens, S.; Knudsen, M.; Blennow, A.; Lowor, S.; Takarama, J.; Swiegers, JH; Petersen, GB; Heimdal, H.** (2013). Influir en el sabor del cacao utilizando Pichia kluyveri y Kluyveromyces marxianus en un cultivo iniciador mixto definido para la fermentación del cacao. En *t. J. Food Microbiol.* 167 , 103–116.

**De Deken, R. H.** (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast | *Microbiology Society*. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>

**de Vos, P.; Faas, M., Spasojevic, M., & Sikkema, J.** (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>

**Dukes B. & Butzke C.** (1998). Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (2), 125-134. <https://www.semanticscholar.org/paper/Rapid-Determination-of-Primary-Amino-Acids-in-Grape-Dukes-Butzke/27c2040bc35d5b3141e2cafd7b9abc6a07153463>

**Fumi, M.D.; Trioli, G.; Colagrande, O.** (1988). "Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle-fermented sparkling wine production". *Am.J. Enol. Vitic.*, 39: 267-272.

**Gutiérrez, A.; Boekhout, T.; Gojkovic, Z.; Katz, M.** (2018). Evaluación de levaduras no *Saccharomyces* en la fermentación de vino, cerveza y sidra para el desarrollo de nuevas bebidas. *J. Inst. Elaborar cerveza.* <https://doi.org/10.1002/jib.512>

**Hierro, N., González, Á., Mas, A., & Guillamón, J.** (2006). Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: Effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Research*, 6, 102-111. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00014.x>

**Holt S., Mukherjee V., Lievens B., Verstrepen K., Thevelein J.** (2018) Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations.

Food Microbiol. 72. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017303763?via%3Dihub>

**Hranilovic, A., Gambetta, J., Jeffery, D., Grbin, P., Jiranek, V.** (2020). Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 329. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108651>

**Hu, K.; Jin, G.J.; Mei, W.C.; Li, T.; Tao, Y.S.** (2018). Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum*/*S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement. *Food Chemistry*

**Jenkins, D.; Powell, C.; Fischborn, T.; Smart, K.** (2011). Rehydration of Active Dry Brewing Yeast and its Effect on Cell Viability. *Journal of the Institute of Brewing*. DOI: 117. 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00482.x.

**Jolly, N.; Petrorius, I.; Augustyn, O.** (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *South African Journal for Enology and Viticulture* 27. DOI:10.21548/27-1-1475

**Kapsopoulou, K.; Mourtzini, A.; Anthoulas, M.; Nerantzis, E.** (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol.* 23. 735-739. DOI; 10.1007/s11274-006-9283-5.

**Kourkoutasa, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I.; Marchant, R. y Koutinas, A.** (2004). Tecnologías de inmovilización y materiales de apoyo adecuados en la producción de bebidas alcohólicas. DOI:10.1016/j.fm.2003.10.005

**Kramer, A.** (1963). Revised Tables for Determining Significance of Differences. *Food Technologie.* 17:1596-1597.

**Krieger-Weber, S.** (2009) Application of yeast and bacteria as starter cultures. *Biology of microorganisms of grapes, in must and in wine* pp 489-511. [https://www.researchgate.net/publication/320801116\\_Application\\_of\\_Yeast\\_and\\_Bacteria\\_as\\_Starter\\_Cultures](https://www.researchgate.net/publication/320801116_Application_of_Yeast_and_Bacteria_as_Starter_Cultures)

**Mewa-Ngongang, M.** (2019). The Use of *Candida pyralidae* and *Pichia kluyveri* to Control Spoilage Microorganisms of Raw Fruits Used for Beverage Production. *MDPI. Foods* **2019**, 8(10), 454. <https://doi.org/10.3390/foods8100454>

**Michel, M.; Meier- Dörnberg, T.; Jacob, F.; Methner, J.; Wagner, R.; Hutzler, M.** (2016). Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *J Inst Brew.*, 122

**Mora, J., J. I. Barba y A. Mulet.** 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. <https://www.ajevonline.org/content/41/2/156>

**Liu, P., Lu, L., Duan, C., & Yan, G.** (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology* , 71, 356-363.

**Luan, Y.; Zhang, B.Q.; Duan, C.Q.; Yan, G.L.** 2018. Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. *Food Science and Technology*

**Luyt, N.** 2015. Interaction of multiple yeast species during fermentation. Trabajo Final de Máster en Ciencias. Universidad de Stellenbosch.

**Novo, M.; Gonzalez, R.; Bertran, E.; Martínez, M.; Yuste, M.; Morales, P.** (2014). "Improved fermentation kinetics by wine yeast strains evolved under ethanol stress, *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.004>

**Organización Internacional del Vino (OIV).** 2016. Código Internacional de Prácticas Enológicas, 3. 3.2. DEFINICIONES COMPLEMENTARIAS RELATIVAS AL CONTENIDO EN AZÚCAR1 (18/73 & ECO 3/2003, OENO 415-2011). <https://www.oiv.int/public/medias/3753/f-code-i-32es.pdf>

**Ortiz, N.; Ochoa, L.; González, S.; Rutiaga, O.; Gallegos, J.** (2021). "Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática". <https://doi.org/10.22430/22565337.1962>

**Padilla, B.; Gil, J.V.; Manzanares, P.** 2016. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*

**Panreac Química.** (2000). Técnicas usuales de análisis en enología. pp 6. <https://www.laboaragon.com/docs/marcas/panreac/Enologia%20Manual%20de%20Tecnicas.pdf>

**Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. Ä., & Schnürer, J.** (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 3-13. doi: 10.1111/j.1567-1364.2005.00004.x

**Peltier, E.; Bernard, M.; Trujillo, M.; Prodhomme, D.; Barbe, J.; Gibon, Y.; Marullo, P.** (2018). Wine yeast phenomics: A standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190094>

**Petruzzi, L.; Capozzi, V.; Berbegal, C.; Corbo, MR; Bevilacqua, A.; Spano, G.; Sinigaglia, M.** (2017) Recursos microbianos y significado enológico: Oportunidades y beneficios. Parte delantera. *Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00995>

**PROMALIC.** AEB Spa. Italia. **Immobilized disacidifying yeast, strain *Schizosaccharomyces*.** TECHNICAL DATASHEET. <https://www.aeb-group.com/en/promalic-4719>

**PRORESTART.** AEB Spa. Italia. Selected *Saccharomyces cerevisiae* strain immobilized in alginate. TECHNICAL DATASHEET. [https://www.aeb-group.com/media/catalogo-unico/prorestart-2874/docs/en/PRORESTART\\_TDS\\_EN\\_0260516\\_OENO\\_Italy.pdf](https://www.aeb-group.com/media/catalogo-unico/prorestart-2874/docs/en/PRORESTART_TDS_EN_0260516_OENO_Italy.pdf)

**Puig, A.; Bertran, E.; Vilavella, M.; García-Martínez, T.; Mauricio, J.; Minguez, S.** (2010). Levaduras Inmovilizadas: Evaluación de su potencial enológico. INCAVI-IRTA. España. [https://incavi.gencat.cat/.content/or\\_organismes/or01\\_incavi/or01\\_11\\_documentacio\\_tecnica/documents/2010/fixers\\_estatics/2010\\_levaduras\\_bioinmovilizadas\\_foro\\_logrono.pdf](https://incavi.gencat.cat/.content/or_organismes/or01_incavi/or01_11_documentacio_tecnica/documents/2010/fixers_estatics/2010_levaduras_bioinmovilizadas_foro_logrono.pdf)

**Ramírez, M.** 2017. *Propiedades funcionales de hoy*, Barcelona: Omnia Science. <https://orcid.org/0000-0001-6569-3133>

**Rantsiou K, Dolci P, Giacosa S, Torchio F, Tofalo R, Torriani S, Suzzi G, Rolle L, Cocolin L.** (2012) *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Appl Environ Microbiol.* 78(6):1987-94. doi: 10.1128/AEM.06768-11.

**Raynal, C., Wardrop, F., Pillet, O., Languet, P., Heras, J., Dumont, A., Ortiz-Julien, A.** (2010) Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-Saccharomyces y de una levadura Saccharomyces cerevisiae, una herramienta innovadora para el enólogo. Lallemand. [http://www.enoreports.com/enoreports/pdf/lallemand\\_jul10.pdf](http://www.enoreports.com/enoreports/pdf/lallemand_jul10.pdf)

**Röcker, J., Strub, S., Ebert, K., & Grossmann, M.** (2016). Usage of different aerobic non-Saccharomyces yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines. *European Food Research and Technology* , 242, 2051-2070. DOI: 10.1007/s00217-016-2703-3

**Ruiz, J., Kiene, F., Belda, I.; I.; Fracassetti, D.; Marquina, D.; Navascues, E.; Calderón, F.; Benito, A.; Rauhut, D.; Santos, A.; et al.** (2019) Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Appl Microbiol Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10008-9>

**Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A.** (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 169-180. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3)

**Roudil, L.; Ruso, P.; Berbegal, C.; Albertín, W.; Spano, G.; Capozzi, V.** (2019) Non-Saccharomyces Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector, *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture.* <https://dx.doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>

**Saerens, S.; Swiegers, H.** (2017). Enhancement of beer flavor by a combination of Pichia yeast and different hop varieties; United States Patent US 2017/0183612A1, Hoersholm, DK.

**Shi, L., Li, Z., Zhang, Z., Zhang, T., Yu, W., Zhou, M. y Tang, Z.** (2013). Encapsulación de Lactobacillus bulgaricus en microesferas de leche recubiertas de carragenana-goma garrofín con estructura de doble capa. *LWT Food Science and Technology*, 54. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643813001916>

**Soden, A., I. L. Francis, H. Oakey y P. A. Henschke.** 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of chardonnay wine. *Austr. J. Grape Wine Res.*, 6(1):21-30. DOI:10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x

**Tenorio, M., Mateos, I., de Prádena, J., García, M., Pérez, M., Redondo, A., Villanueva, M. & Zapata, M.** (2014). *El vino y su análisis*. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/29446/7/PIMCD%20Nº%20243.%20ANEXO%201.%20E-BOOK-%20EL%20VINO%20Y%20SU%20ANÁLISIS.pdf>

**Tronchoni J, Curiel J, Morales P, Gonzáles R.** (2017). Different Non-Saccharomyces Yeast Species Stimulate Nutrient Consumption in *S. cerevisiae* Mixed Cultures . *Frontiers in Microbiology*, Vol 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02121>

**Tsakiris, A., Sipsas, V., Bekatorou, A., Mallouchos, A. y Koutinas, A** (2004). Elaboración de vino tinto por células inmovilizadas e influencia en la composición volátil. *Revista de Química de Alimentos Agrícolas*, 52(5) pp. 1357-1363.

**Vicente J, Calderón F, Santos A, Marquina D, Benito S.** (2021) High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(3):1196. <https://doi.org/10.3390/ijms22031196>

**Walker, G.** (2011). *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 25-34. doi: 10.1007/s10482-010-9491-8

**Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS.** (2001) Análisis y producción del vino. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. <https://fundacion.unirioja.es/foroCYTED-IBEROEKA/ponencias/ponencia03.pdf>

## 9. Anexos

**9.1 Ficha análisis sensorial sólo AROMAS.** Evaluación sensorial de 3 muestras por degustador.

Nombre: \_\_\_\_\_

N° Muestra: \_\_\_\_\_

**Ficha análisis sensorial sólo AROMAS**

Evaluación sensorial de 3 muestras por degustador.  
Vinos elaborados por microvinificación en laboratorio.

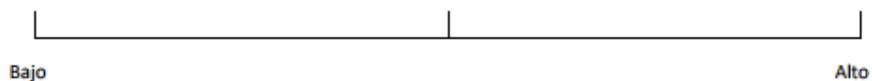
Mediante una línea vertical indique la intensidad de aromas percibidos. Siendo "Bajo" no percibido, medianamente percibido (en la mitad) y Alto si es altamente percibido.

**AROMAS**

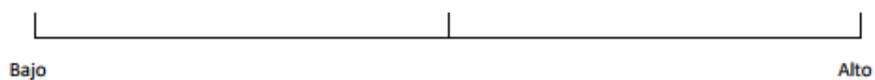
**Vegetal:** pimentón, espárrago, sésamo, aceitunas.



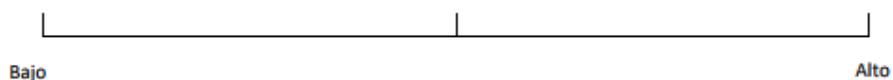
**Frutas cítricas:** limón, pomelo, naranja



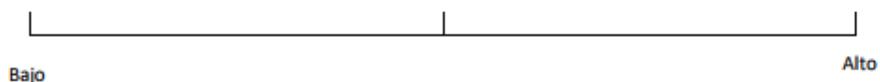
**Frutas tropicales:** mango, maracuyá piña, guayaba, banana.



**Frutas:** Grosella, durazno maduro, damasco

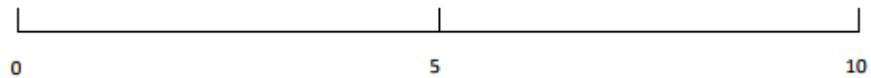


**Florales**



**9.2 Calidad Global para cada muestra de vino.** Mediante una línea vertical, evalúe del 1 al 10, qué tan aceptable es el vino respecto a los aromas percibidos. Siendo “0” no percibido, “5” medianamente percibido y “10” altamente percibido.

**CALIDAD GLOBAL.** Mediante una línea vertical, evalúe del 1 al 10, qué tan aceptable es el vino respecto a los aromas percibidos. Siendo “0” no percibido, “5” medianamente percibido y “10” altamente percibido.



**9.3 Test de ordenamiento.** En la siguiente serie de copas, ordenar de mayor a menor intensidad los aromas (Frutal/Vegetal) percibidos.

**Test de ordenamiento.** En la siguiente serie de copas, ordenar de mayor a menor intensidad los aromas (Frutal/Vegetal) percibidos.

Frutal ..... > ..... > ..... >

Vegetal ..... > ..... > ..... >

