

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

Evaluación del efecto de los compuestos volátiles en la
inoculación de cultivos mixtos con *H.vineae* y *S.cerevisiae*
en la producción de vinos de calidad.

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en
Biotecnología.

Natacha Collins – 243906

Tutora: PhD. María José Valera

2025

Declaración de Autoría

Yo, Natacha Collins, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano.

Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el trabajo final de grado;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Natacha Collins

9 de marzo de 2025

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mi tutora, PhD. María José Valera, por su guía en la realización de este trabajo, aprecio no solo su apoyo en lo académico si no también en lo personal. Valoro enormemente su confianza, paciencia y dedicación para enseñarme todo lo que sabe.

A todo el Área de Enología y Biotecnología de las fermentaciones y al Laboratorio de Biotecnología de los Aromas del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTAL), de Facultad de Química; por darme la oportunidad de tener mi primer trabajo, aprender tanto y crecer profesionalmente. Gracias a cada uno por siempre darme una mano.

Al Fondo Clemente Estable y la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), por la financiación del proyecto.

A la Universidad ORT Uruguay y a sus docentes, por brindarme los conocimientos y herramientas para despeñarme en esta área.

A mis amigos, los de siempre, los que hice en el camino y los compañeros de clase que se convirtieron en amigos; por la ayuda y haber hecho de estos años una experiencia divertida.

Por supuesto a toda mi familia, por mostrarme su apoyo y cariño de una forma u otra.

En especial a mamá y papá, por su esfuerzo, por ser un equipo de tres y confiar en mí.

Resumen

El uso extendido de *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación ha generado vinos sensorialmente estandarizados, ya que los aromas secundarios que aporta son similares entre cepas, lo que ha llevado a que muchos productos se perciban como *commodities*. Para contrarrestar esta situación, la industria ha comenzado a aplicar cultivos mixtos con levaduras no-*Saccharomyces*, que aportan compuestos volátiles distintivos antes de inocular *S. cerevisiae* para finalizar la fermentación. Esta estrategia resulta especialmente útil en variedades neutras como Ugni blanc, ampliamente cultivada por su resistencia y rendimiento, pero sin expresión aromática propia, permitiendo diferenciar sus vinos y aumentar su valor comercial.

Además, comprender cómo se comunican las levaduras mediante *quorum sensing* — proceso regulado por compuestos como el alcohol 2-feniletílico y el triptofol— permite optimizar el momento de inoculación en cultivos mixtos. Identificar estas moléculas, sus tiempos de producción y su efecto sobre el crecimiento de distintas cepas, brinda una herramienta para fomentar la cooperación entre levaduras, para obtener el máximo potencial que se busca en ambas especies (la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* y la producción de aromas de no-*Saccharomyces*) potenciando la producción de aromas deseables, evitar defectos sensoriales y asegurar la eficiencia fermentativa.

Se fermentó similar mosto con *Hanseniaspora vineae* M12/196F y se identificaron por GC-MS los compuestos volátiles producidos en las primeras 72 horas. Se seleccionaron aquellos con potencial rol en *quorum sensing* y se evaluó su efecto sobre el crecimiento de siete cepas de *H. vineae* y siete de *S. cerevisiae* en lector de placas, usando concentraciones fisiológicas y cuatro parámetros de crecimiento. El acetato de 2-feniletilo y el triptofol, producidos a las 24 horas, favorecieron el crecimiento de *S. cerevisiae*, mientras que el ácido hexanoico producido a las 48 horas lo inhibió. Luego, se realizaron fermentaciones con la cepa *S. cerevisiae* TS28 y adición exógena de estos compuestos, observándose que el ácido hexanoico aumentó la eficiencia fermentativa, por actuar como factor de estrés.

Para los ensayos de cultivo mixto se realizaron co-inoculaciones e inoculaciones secuenciales con la cepa *S. cerevisiae* TS28. Se hizo recuento celular, análisis de aromas por GC-MS y caracterización fisicoquímica por HPLC. De esta manera se observó que la inoculación de *S. cerevisiae* TS28 a las 24 horas de fermentación de *H. vineae* M12/196F fue la fermentación con mejor equilibrio entre producción de etanol más rápido, sin defectos aromáticos y presencia de aromas florales, frutales, mantecosos y especiados, un perfil aromático buscado en vinos blancos y vinos tintos jóvenes.

Palabras clave

Fermentación, compuestos aromáticos, levaduras, triptofol, acetato 2-feniletilo, ácido hexanoico.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: del inglés *Analysis of Variance*

BLAST: del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*

GC-MS: por sus siglas en inglés *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*

g: gramos

HPLC: por sus siglas en inglés de *High Performance Liquid Chromatography*

H.v. Hanseniaspora vineae

L: litro

mg: miligramos

mL: mililitros

ON: por sus siglas en inglés, *Over Night*

pH: potencial de hidrógeno

rpm: revoluciones por minuto

S.c. Saccharomyces cerevisiae

UV: radiación ultravioleta

WLN: por sus siglas en inglés, *Wallerstein Laboratory Nutrient*

YE: extracto de levadura, por sus siglas en inglés *Yeast Extract*

YPD: por sus siglas en inglés, *Yeast Extract Peptone Dextrose*

µg: microgramo

µL: microlitro

v/v: volumen volumen

°C: grados Celsius

Índice

INTRODUCCIÓN	10
1. Vino, impacto global e industria uruguaya	10
2. Percepción del consumidor	13
3. Compuestos aromáticos del vino	13
4. Composición de la uva, matriz de la fermentación	14
5. Vinificación.....	15
6. Levaduras de vinificación	17
6.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
6.2. No- <i>Saccharomyces</i>	18
7. Fermentación alcohólica	20
Alcoholes superiores	22
Ácidos grasos.....	24
Ésteres	25
8. Cultivo mixto.....	26
9. <i>Quorum Sensing</i>	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
METODOLOGÍA	30
1. Insumos.....	30
2. Estrategia experimental	31
2.1. Caracterizar la cinética fermentativa de <i>H.vineae</i> M12/196F. Identificar y cuantificar concentraciones de compuestos aromáticos producidos en las primeras 72 horas de esta	31
2.1.1. Fermentación de <i>H.vineae</i>	31
2.1.2. Seguimiento de cinética fermentativa y poblacional	32
2.1.3. Extracción de compuestos libres con cartuchos Isolute ENV+	32
2.1.4. Identificación de compuestos extraídos	34
2.1.5. Cuantificación de compuestos extraídos.....	34
2.2. Estudio de efecto de compuestos bioactivos producidos por <i>H.vineae</i> M12/196F en concentraciones fisiológicas (correspondientes a las primeras 72 horas de fermentación) sobre la cinética de crecimiento de cepas de <i>Saccharomyces</i> y de <i>Hanseniaspora</i> . Identificación de moléculas con potencial <i>quorum sensing</i>	35
2.2.1. Precultivos.....	35
2.2.2. Siembra de microplaca	35
2.2.3. Análisis de parámetros de crecimiento	36

2.3	Estudio del efecto de compuestos bioactivos producidos por <i>H.vineae</i> M12/196F en concentraciones fisiológicas sobre la cinética fermentativa y producción de aromas de una cepa seleccionada por su compatibilidad con <i>S.cerevisiae</i>	37
2.3.1.	Elección de cepa de <i>S.cerevisiae</i>	37
2.3.2.	Fermentación de <i>S.cerevisiae</i> TS28 en símil mosto con compuestos agregados	38
2.3.3.	Identificación y cuantificación de compuestos durante la fermentación junto al compuesto seleccionado	38
2.4	Extracción de ADN de levaduras para secuenciación	38
2.5	Evaluación del impacto de diferentes estrategias de inoculación en el aroma del vino, identificando la que proporcione el mejor balance entre producción de etanol, intensidad y complejidad aromática	39
2.5.1.	Caracterización del mosto de uva	39
2.5.2.	Fermentación con cultivo mixto	39
2.5.3.	Determinación de cinética fermentativa y recuento de levaduras en placa.	40
2.5.5.	Determinación del perfil aromático	40
2.5.6.	Caracterización química del fermentado	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		42
1.	Caracterización de la cinética fermentativa de <i>H.vineae</i> M12/196F. Identificación y cuantificación de concentraciones de compuestos aromáticos producidos en las primeras 72 horas de esta	42
1.1.	Seguimiento de cinética fermentativa y crecimiento poblacional	42
1.2.	Compuestos identificados	44
2.	Estudio del efecto de compuestos bioactivos producidos por <i>H.vineae</i> M12/196F en concentraciones fisiológicas (correspondientes a las primeras 72 horas de fermentación) sobre la cinética de crecimiento de cepas de <i>Hanseniaspora</i> y de <i>Saccharomyces</i> . Identificación de moléculas con potencial <i>quorum sensing</i>	48
3.	Estudiar el efecto de compuestos bioactivos producidos por <i>H.vineae</i> M12/196F en concentraciones fisiológicas sobre la cinética fermentativa y producción de aromas de una cepa seleccionada por su compatibilidad con <i>S.cerevisiae</i>	55
3.1.	Elección de cepa de <i>S.cerevisiae</i> a utilizar	55
3.2.	Compuestos identificados	56
3.3.	Recuento poblacional y cinética fermentativa	57
4.	Presencia de genes	60
5.	Evaluación del impacto de diferentes estrategias de inoculación en el aroma del vino, identificando la que proporcione el mejor balance entre producción de etanol, intensidad y complejidad aromática	60
5.1.	Caracterización fisicoquímica del mosto y vino	60
5.2.	Determinación de cinética fermentativa y recuento de levaduras en placa	62
5.3.	Identificación y cuantificación de compuestos durante la fermentación mixta	63
CONCLUSIONES		68
PERSPECTIVAS		69
DIFUSIÓN		70

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	80

Introducción

1. Vino, impacto global e industria uruguaya

El vino es una bebida alcohólica fermentada a partir de uvas y levadura, existe desde casi los inicios de la civilización. Se estima que su origen se remonte al Paleolítico, aunque las primeras evidencias surgen de yacimientos neolíticos de Oriente Próximo [1]. Es posible que su origen fuera accidental, ya que la fermentación de la levadura en un recipiente con uvas es un proceso natural que no requeriría una intervención humana, aun así, dio paso al primer producto biotecnológico que evolucionaría junto con la humanidad hasta nuestros días.

En cuanto a categorías es posible distinguir entre el vino de mesa y el vino de calidad. El primero se produce a gran escala, sin denominación de origen y se puede hacer con varios tipos de uva, generalmente se comercializa a granel y está destinado al consumo diario, con márgenes de ganancia más bajos [2]. En cambio, el vino de calidad, que incluye vinos con identidad varietal, envejecimiento controlado y características organolépticas diferenciadas; posee mayor prestigio, además de que se percibe como un bien aspiracional e incluso como un artículo de lujo, capaz de participar en mercados premium e inversiones alternativas, representa una categoría con alto potencial de generar valor agregado [3]. No obstante, el sector de los vinos de calidad enfrenta una problemática clave: la creciente estandarización de los productos, que amenaza con convertir incluso los vinos de alta gama en *commodities*. En términos económicos, un *commodity* es un bien homogéneo, intercambiable y sensible a los precios del mercado global, cuyas características intrínsecas pierden importancia frente a la competencia por costos [4]. En el caso del vino, esta situación se manifiesta cuando los productos se diferencian más por su precio que por su calidad percibida, anulando los esfuerzos de autenticidad, origen y estilo [5]. Tal como lo señala Anderson (2024) [6], el auge de marcas globales genéricas y de exportaciones de vino a granel ha contribuido a reducir el valor promedio de exportación, llevando a algunos mercados a competir más por volumen que por diferenciación [6]. Frente a esta amenaza de "comoditización", muchas empresas vitivinícolas han comenzado a invertir en investigación, desarrollo y nuevas tecnologías que les permitan diseñar perfiles sensoriales únicos y reproducibles. En este marco, firmas como Lallemand y Oenobrand ofrecen soluciones biotecnológicas específicas para adaptar las fermentaciones al estilo de vino deseado, ya sea para potenciar ciertos aromas, mejorar la estructura en boca o reforzar la estabilidad microbiológica del producto [7] [8]. Estas herramientas permiten a los enólogos intervenir estratégicamente en el proceso de vinificación para construir diferenciación sensorial y comercial, fortaleciendo así la competitividad frente a un mercado global cada vez más homogéneo.

Según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), institución de carácter científico y técnico que asesora sobre normas de etiquetado, calidad, sanidad y producción a los principales países productores y consumidores [9]; la producción

mundial de vino en 2024 ha seguido la tendencia de descenso registrada en los últimos años, con un volumen estimado entre 22.700 y 23.500 millones de litros marcando una caída del 2% respecto a 2023 [10]. Este nivel de producción está fuertemente influenciado por eventos climáticos extremos, como heladas tempranas, lluvias intensas y sequías prolongadas, que han afectado la productividad de los viñedos en ambos hemisferios; además de que el precio promedio de exportación alcanzó los 3.62 EUR/L, el más alto jamás registrado, debido al incremento de costos en toda la cadena de suministro. A su vez esta categoría de vino es particularmente sensible a las crisis económicas como se dio en 2020 durante la pandemia del COVID-19. Durante períodos de recesión, los consumidores tienden a reducir el gasto en productos de lujo, lo que afecta directamente la demanda de vinos premium [11].

A pesar de estos desafíos, las perspectivas para el mercado de vinos premium son optimistas. Se espera que este segmento experimente un crecimiento significativo hacia 2029, impulsado por la creciente demanda de consumidores que buscan productos de alta calidad y experiencias únicas. Además, el vino de calidad está ganando popularidad como una opción de inversión alternativa, con un mercado que muestra una tendencia alcista en los precios y una mayor liquidez [12].

El mercado del vino ocupa una posición destacada en la economía global, situándose como una de las industrias agroalimentarias más valiosas del mundo. Aunque enfrenta desafíos estructurales, sigue manteniendo una alta demanda en mercados internacionales y su comercio representa aproximadamente el 45% del consumo mundial de bebidas fermentadas [10] [13].

La vitivinicultura en Uruguay tiene sus raíces en el siglo XIX, cuando inmigrantes europeos introdujeron las primeras plantas y sentaron las bases de la industria estableciendo una tradición que ha evolucionado hasta convertirse en un importante sector para la economía nacional. A pesar de contar con una larga tradición en la producción de vinos, durante años el país permaneció relativamente desconocido en los mercados internacionales, sin embargo, en las últimas décadas, la industria vitivinícola uruguaya ha experimentado una transformación significativa posicionándose como un actor emergente en el comercio global del vino. Un factor clave en esta evolución ha sido el desarrollo y promoción del Tannat, una cepa de vid distintiva e intensa originaria del suroeste de Francia que ha encontrado en Uruguay un ambiente ideal para expresar su máximo potencial [14]; además de esta insignia el país cuenta con más vinos característicos, tanto tintos intensos de variedad cepas como Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Malbec, Merlot, Pinot Noir, Marselan, Moscatel Hamburgo; además de blancos jóvenes y frutales de Sauvignon blanc, Chardonnay y Ugni Blanc [15]. Parte de este éxito se debe al *terroir* característico de la zona, conjunto de factores naturales y humanos que dan a un vino su carácter único. Está influenciado por el clima, el suelo, la topografía, la microbiota y las prácticas humanas [16]. Todos estos elementos que, al actuar en conjunto, permiten obtener una materia prima de alta calidad, fundamental para producir vinos excepcionales ser reconocidos internacionalmente [16] [17].

El vino de “calidad preferente” en Uruguay se define como aquel que se elabora exclusivamente a partir de variedades de *Vitis vinífera* (la planta de vid o parra) con reconocida calidad enológica, previamente aprobadas por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INAVI); entidad responsable de regular y certificar la producción de los vinos de calidad preferente, garantizando que se mantengan los estándares del país [18]. Para ser considerado dentro de esta categoría, el vino debe cumplir con una serie de exigencias analíticas establecidas en el Decreto N° 283/993, emitido el 16 de junio de 1993 por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca [19]. Entre las condiciones que deben cumplirse, el vino debe tener un grado alcohólico mínimo del 10,5% en volumen y su acidez volátil no puede superar los 0,8 gramos por litro; expresada en ácido acético; así como también se hace control sobre el anhídrido sulfuroso, la composición mineral, límites en la presencia de metales y esterilidad; además de formas de manejo y criterios de calidad [20].

En 2024 se produjeron aproximadamente 66.744.522,12 litros de vino, de los cuales 37.414.468 litros corresponden a vino tinto, 7.121.905 litros a vino blanco y el resto se divide entre rosado y clarete. Actualmente, hay 5.880 hectáreas de viñedos y 201 bodegas registradas [21], divididos entre grandes y pequeños productores de las cuales muchas han apostado por aprovechar el prestigio de los vinos uruguayos que potencian el atractivo turístico y proyectar al país como destino para el turismo enológico, beneficiando a la economía local [15] [22]. A nivel de exportaciones, Uruguay ha incrementado su presencia en mercados clave como Brasil, Estados Unidos, México y Asia. En 2020, los ingresos por exportación de vino uruguayo fueron de 3.4 millones de dólares, cifra que ha mostrado un crecimiento sostenido en los últimos años [23]. A pesar de ser un mercado pequeño en comparación con otros productores sudamericanos como Argentina y Chile, Uruguay ha logrado posicionarse en el segmento de vinos de alta calidad, con precios que oscilan en la categoría de USD 15 a 50 por botella en mercados internacionales [23], optando por una estrategia de exportar calidad sobre cantidad.

Si bien el mercado interno es menor, el país se encuentra en el puesto 12° a nivel mundial en consumo per cápita de vino y el 1° en Latinoamérica; aunque datos no se correlacionan directamente con el vino de calidad sí reflejan la predisposición de los uruguayos al consumo de vino.

En términos de competitividad global aún ocupa una posición modesta en la producción de vino, situándose en el puesto 30 como productor y 48 como exportador a nivel mundial [23]. Sin embargo, su estrategia de diferenciación basada en la calidad y distinción de su *terroir*, la trazabilidad de sus productos y el respeto por las prácticas sostenibles han fortalecido su presencia en el comercio internacional y lo hacen un mercado con potencial de crecimiento y ser aún más competitivo, para esto es necesario tener en cuenta que es lo que busca el consumidor [18].

2. Percepción del consumidor

La percepción que el consumidor tiene sobre un vino de calidad está condicionada por un conjunto de atributos que se manifiestan en diferentes etapas del proceso de compra y consumo. En una primera instancia, son las propiedades extrínsecas del producto las que captan la atención y guían la decisión de compra inicial; estas incluyen el diseño del envase, la estética de la etiqueta, el prestigio de la bodega o la región de origen, y actúan como señales simbólicas de calidad que el consumidor interpreta en ausencia de información más concreta; estos atributos no forman parte física del producto, pero están fuertemente asociados a él y permiten la inferencia de su calidad percibida [24] [25].

Una vez realizada la compra y en el momento del consumo, son los atributos intrínsecos, aquellos ligados a las propiedades sensoriales y físicas como el aroma, color, sabor, textura y persistencia en boca, los que predominan en la evaluación del consumidor. Estos atributos definen la experiencia organoléptica y determinan en gran medida la intención de recompra, al generar una percepción global de calidad que se consolida con la repetición [24] [26].

Para desarrollar estrategias efectivas de diferenciación en el mercado del vino, es clave comprender y atender ambos tipos de atributos, reconociendo que la primera compra suele estar mediada por percepciones construidas social y culturalmente, mientras que la segunda está guiada por la vivencia sensorial concreta del producto.

El presente trabajo se centra en el aroma, este actúa como la carta de presentación sensorial de un vino, es lo primero que percibe el consumidor al acercar la copa a la nariz, incluso antes del primer sorbo, y condiciona fuertemente la expectativa sobre su calidad y sabor. A nivel emocional, los compuestos aromáticos tienen la capacidad de evocar memorias, paisajes, estaciones o experiencias personales, conectando al consumidor con sensaciones placenteras o evocativas que hacen del vino no solo una bebida, sino una experiencia [27]. Para modular el aroma es necesario conocer y saber cómo manejar cada una de sus posibles fuentes.

3. Compuestos aromáticos del vino

Un compuesto aromático es una molécula química capaz de interactuar con el epitelio olfativo en las fosas nasales en la parte superior interior de la nariz, provocando una respuesta sensorial en el hipotálamo, sólo las moléculas volátiles pueden llegar a este punto, donde serán asociadas a un descriptor aromático [28]. Aunque un compuesto sea volátil, hay una gran variabilidad en el rango de concentraciones en el que realmente capaz de ser percibido, su umbral de percepción. Mientras que algunas moléculas como el guaiacol tiene un umbral bajo, con solo 9,5 µg/L se percibe un aroma asociado a humo y hospital; otras tienen un umbral alto como el succinato de etilo que necesita concentraciones de 1.000.000 µg/L para llegar a sentirse como caramelo y café [29]. Los umbrales que se mencionan en este trabajo fueron reportados por Fariña et al. [30] y Carrau et al. [29]. Aunque un compuesto no llegue al umbral de percepción, la suma de varios compuestos descriptores aromáticos similares puede contribuir a que la nota aromática sea percibida igualmente [31].

Los responsables del aroma del vino pueden dividirse en diferentes categorías según su origen y momento de formación durante la vinificación. Los aromas varietales o primarios, provienen directamente de piel, pulpa y semillas de la uva y son fundamentales para definir la identidad y tipicidad del producto, entre estos están los terpenos, pirazinas, ácidos fenólicos y carotenoides [32]. Los aromas prefermentativos se generan en el período comprendido entre la cosecha de la uva y el inicio de la fermentación alcohólica. Durante esta fase, diversos procesos químicos y enzimáticos en presencia de oxígeno afectan la composición aromática del mosto, modificando la expresión de algunos precursores aromáticos [33]. Los aromas fermentativos o secundarios, y los principales para este estudio, son el resultado del metabolismo secundario de las levaduras en la fermentación alcohólica y bacterias lácticas en el caso de que ocurra la fermentación maloláctica. Los aromas de crianza o terciarios, también conocidos como *bouquet*, se desarrollan durante el envejecimiento del vino como resultado de la transformación de compuestos aromáticos previos en barricas de roble, donde el vino está en contacto con oxígeno de manera controlada, o en botella, en un ambiente reductor [33].

De los más de 150 descriptores aromáticos del vino, aproximadamente 20 surgen de la fermentación, tanto los deseados como los clasificados como defectos aromáticos. Entre los compuestos volátiles más relevantes se encuentran los alcoholes superiores, los ésteres y los ácidos grasos [34].

4. Composición de la uva, matriz de la fermentación

La uva es el fruto de la vid y constituye la materia prima principal de la elaboración del vino. Durante su proceso de maduración, en la uva tienen lugar una serie de cambios metabólicos que determinan la composición final de compuestos que juegan un rol muy importante en el color y sabor [35]. Por esta razón, lograr una maduración óptima es fundamental para asegurar una vinificación adecuada [33].

Los principales componentes químicos de la uva incluyen agua, sales minerales provenientes del suelo, azúcares, ácidos, compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, lípidos y terpenos. Los azúcares predominantes son la glucosa y la fructosa que se acumulan en la baya conforme avanza su maduración. Antes del envero (la fase donde comienza a crecer el grano de uva), la glucosa es el azúcar más abundante, pero una vez finalizado este proceso, se alcanza un equilibrio glucosa/fructosa cercana a 1:1. La presencia de estos azúcares es fundamental para la fermentación, ya que de ellos depende directamente la graduación alcohólica del vino [33] [36].

En relación con los ácidos orgánicos, la uva contiene principalmente ácido tartárico y ácido málico, los cuales representan alrededor del 90% de los ácidos totales. En menor proporción se encuentran el ácido cítrico, ácido láctico, cetoácidos y ácido succínico [33].

Otro grupo de compuestos clave en la calidad del vino son los compuestos fenólicos, los cuales se encuentran principalmente en la piel y semillas de la uva. Los antocianos son los principales responsables del color en los vinos tintos, mientras que los taninos influyen en la percepción de astringencia y amargor [37].

Finalmente, los terpenos, como el linalol, citronelol, geraniol, nerol y α -terpineol, juegan un papel fundamental en el aroma del vino. Se encuentran en mayor concentración en variedades blancas siendo responsables del carácter aromático característico de estos vinos [38], estos son los aromas primarios o varietales.

Entre ellas, por ejemplo, la cepa Ugni Blanc también conocida como Trebbiano Toscano, es una de las variedades blancas más cultivadas en el mundo y la tercera en Uruguay [39] por su resistencia inclemencias del clima, enfermedades y buen rendimiento [40]; se caracteriza por su alta acidez natural la hace ideal para la producción de vinos frescos y longevos. Su composición química refleja una baja concentración de compuestos fenólicos, lo que le confiere un color pálido y un perfil aromático más neutro y simple en comparación con otras variedades blancas más aromáticas [41], esto la hace ideal para ensayos de donde se busca identificar específicamente los aromas producidos por levaduras. Lorenzo de Medici (1449-1492), en su poema *The Partridge Hunt*, hace referencia a un vino Trebbiano describiéndolo como "*suspicious*" es decir de calidad dudosa, pero sugiere que el deseo y la expectativa pueden hacer que cualquier cosa parezca deliciosa:

"The Trebbiano wine was most suspicious,

But longing will make anything delicious."

En términos de azúcares, su acumulación en la baya es moderada, lo que da como resultado vinos con bajo contenido alcohólico y una frescura característica. Su equilibrio entre acidez y azúcares hace que sea una de las variedades más utilizadas en la producción de vinos base para espumosos y destilados de alta calidad [42]. Este caso refleja una materia prima, la uva, con mucha presencia a nivel mundial pero que por si sola no puede aportar un carácter distintivo a su subproducto, el vino, por lo que es necesario aplicar una estrategia a lo largo del proceso para obtenerlo.

5. Vinificación

La vinificación es el proceso mediante el cual las uvas se transforman en vino, ilustrado en la **Figura 1** y a mayor detalle en la **Figura 1** del **Anexo 1**, comienza con la cosecha de la uva que se realiza cuando estas han alcanzado un grado de madurez adecuado y se seleccionan manualmente. Estas son lavadas para eliminar los restos de tierra y suciedad. Luego, las uvas pasan por el despalillado y prensado (las uvas blancas tienen un paso de enfriamiento previo para reducir actividad enzimática y oxidación [41]), se separan los

racimos de los tallos y se rompen suavemente las bayas para liberar su jugo (mosto) y pulpa [35].

Al mosto se le agrega anhídrido sulfuroso, un antioxidante y conservante que tiene actividad antibacteriana y antifúngica dependiendo de su concentración para evitar que “levaduras salvajes” u otros microorganismos presentes en la uva y de la que no se conoce su comportamiento comiencen la fermentación. Su aplicación debe ser controlada ya que puede inhibir la fermentación, afectar el sabor o aroma del producto final y causar alergias en concentraciones excesivas. La concentración máxima permitida es de 200 mg/L para vinos con menos de 4 g/L de azúcar expresado en glucosa [20].

Luego sigue la inoculación de levaduras que darán paso a la fermentación, este punto la vinificación de los vinos tintos y blancos toma caminos distintos; para los vinos tintos, se realiza una maceración al fermentar el mosto junto con los hollejos (pieles) y semillas, lo que permite extraer color, taninos y compuestos aromáticos característicos presentes en la piel [43]. En cambio, las variedades blancas se fermentan únicamente el líquido, lo que da como resultado un vino más ligero y fresco [41]. Posteriormente en algunos casos se puede realizar la fermentación maloláctica donde bacterias lácticas transforman el ácido málico a ácido láctico; la actividad enzimática de las bacterias actúa reduciendo la acidez del medio, contribuyendo al cuerpo del vino, así como al enriquecimiento del aroma y sabor [33].

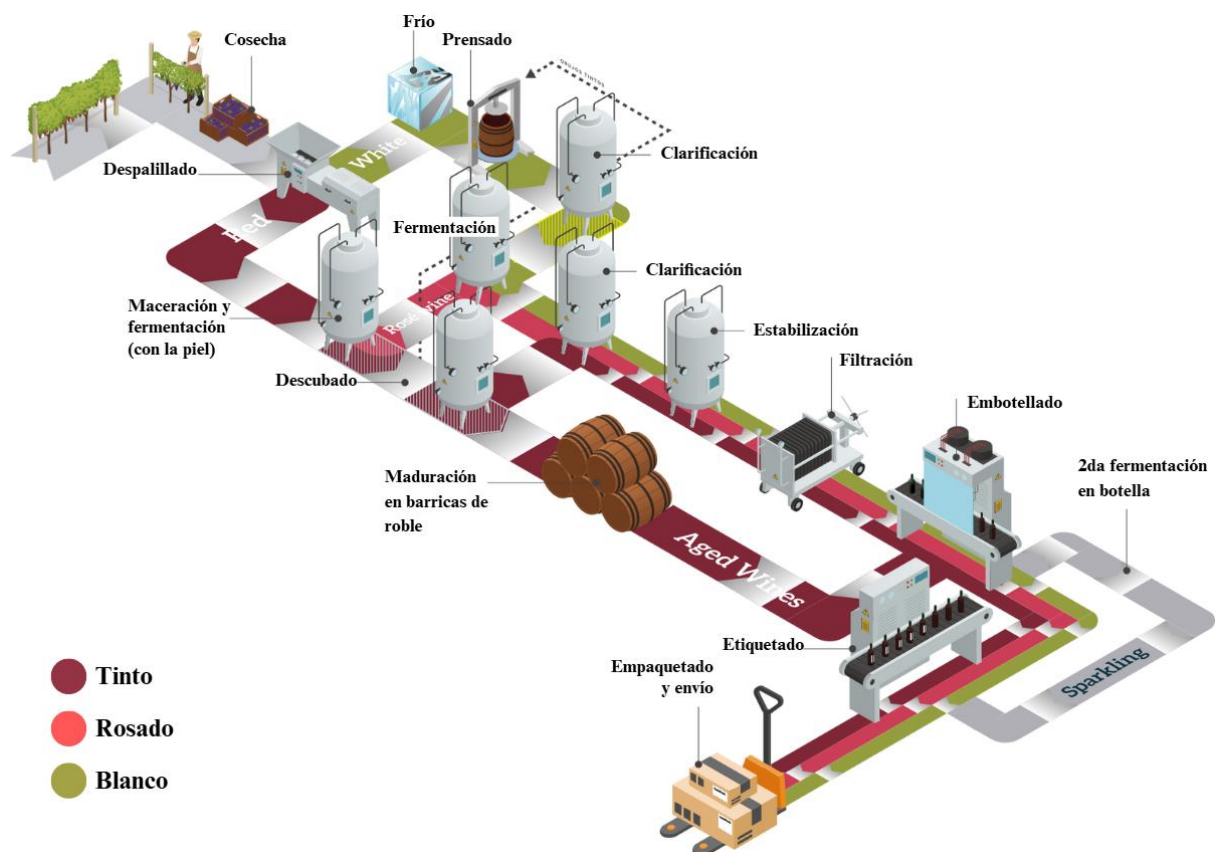


Figura 1. Diagrama de flujo de la vinificación.

Después de la fermentación, en los vinos tintos se realiza el prensado, y pasa por un período de maduración y crianza en barricas de roble para aportar complejidad y aromas más intenso; finalmente todos son filtrados para eliminar impurezas y asegurar la estabilidad fisicoquímica y son embotellados y etiquetados.

A instancias de este trabajo, se hará hincapié en la fermentación alcohólica ya que sí bien los procesos previos y posteriores a la fermentación aportan diferentes características organolépticas que en conjunto forman el carácter de cada vino, en este punto es donde las levaduras entran en juego para aportar los aromas fermentativos o secundarios.

6. Levaduras de vinificación

Las levaduras son organismos unicelulares pertenecientes al reino Fungi [33]. Las levaduras involucradas en la fermentación alcohólica se agrupan en *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.

La diversidad de levaduras presentes en el viñedo y en la bodega influye en la dinámica de fermentación y en la composición final del vino, ya que cada cepa posee una capacidad metabólica única para producir etanol, transformar precursores aromáticos y generar compuestos volátiles. Por esta razón se ha implementado el aislamiento, caracterización y comercialización de levaduras para saber cuáles son más aptas para el tipo de producto que se desea [44].

6.1. *Saccharomyces cerevisiae*

En el grupo *Saccharomyces* se destaca *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura predominante en la fermentación del vino. Aunque rara vez se encuentra en la superficie de la uva, es común en el ambiente de la bodega como tanques, herramientas y los mostos [45].

Desde el punto de vista biotecnológico, *S. cerevisiae* es un organismo ampliamente estudiado y utilizado en múltiples industrias debido a su facilidad de manipulación genética y su capacidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales [46]. Su genoma, completamente secuenciado, ha permitido entender mejor sus mecanismos metabólicos y su interacción con otros microorganismos en el proceso de fermentación; tanto así que ha sido la principal levadura utilizada en la fermentación alcohólica a lo largo de los años debido a su alta capacidad fermentativa. La eficiencia fermentativa se refiere a que la mayor parte de su metabolismo hacia la vía principal de la fermentación alcohólica, transformando azúcares en etanol y dióxido de carbono. Este enfoque metabólico prioriza la rápida conversión de los azúcares del mosto en alcohol, lo que asegura una fermentación completa y estable. Sin embargo, como consecuencia, la producción de metabolitos secundarios, compuestos aromáticos y de interés sensorial,

suele ser más limitada por lo que el perfil aromático que aporta la vino no es muy complejo [46].

Esta característica la hace altamente competitiva en el medio, ya que la acumulación de etanol inhibe el crecimiento de otras levaduras y microorganismos al igual que su capacidad de asimilar nitrógeno [47] y producción de péptidos antimicrobianos [48]. A su vez ha demostrado una gran resistencia a condiciones de fermentación, como altas concentraciones de azúcar, pH bajo, calor [30] [49].

El uso extensivo de *S. cerevisiae* en la vinificación y la falta de complejidad sensorial ha llevado a una cierta estandarización de los productos en el mercado, ya que los metabolitos secundarios responsables del perfil aromático dependen de cada cepa [50] [51].

6.2. No-Saccharomyces

Las levaduras no-*Saccharomyces*, también llamadas levaduras nativas o autóctonas, representan más del 99% de la población presente en el exterior de uvas y mostos [44]; [52].

Se han identificado tres grupos principales dentro de las levaduras no-*Saccharomyces*: levaduras oxidativas, que no juegan un papel en la fermentación del vino; levaduras fermentativas moderadas, como *Hanseniaspora spp.*, *Candida spp.*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Pichia spp.*, que predominan en las primeras etapas de fermentación; y levaduras altamente fermentativas, como *Torulaspota delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans*, que pueden completar la fermentación alcohólica o influir en sus etapas finales [53] [54].

Las levaduras no-*Saccharomyces* han cobrado relevancia en la vinificación debido a su capacidad para aportar mayor complejidad aromática y diversificación en los vinos al no enfocar tanto su metabolismo en la producción de etanol sino más bien en la producción de metabolitos secundarios. Tradicionalmente, estas levaduras fueron vistas como agentes de deterioro, ya que algunas especies pueden producir compuestos indeseables como ácido acético en exceso [55]. Pero al ser adecuadamente seleccionadas dentro de la gran diversidad de cepas, pueden mejorar la calidad del vino gracias a la producción de metabolitos secundarios durante la fermentación alcohólica [51] [56].

Además, las levaduras no-*Saccharomyces* contribuyen a la liberación de aromas varietales de la uva. Se ha identificado que la mayoría de las levaduras no-*Saccharomyces* presentan mayor actividad de la enzima β -glucosidasa que las *Saccharomyces* [54]. La mayoría de los aromas en las uvas se encuentran en forma no volátil, unidas a un azúcar por enlaces glucosídicos. Estos glucósidos se liberan por acción de la enzima β -

glucosidasa, especialmente durante la fermentación, haciendo el aroma perceptible al olfato [55].

Entre ellas se han estudiado *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora osmophila* y *Hanseniaspora vineae*.

Hanseniaspora vineae

En 2002, *H. vineae* fue aislada de viñedos uruguayos por el Área de Enología y Biotecnología de Fermentaciones de Facultad de Química y se iniciaron estudios para caracterizarla, encontrando que menos del 5% de las especies apiculadas tenían un impacto positivo en el aroma del vino, y dentro de este grupo, aproximadamente el 90% correspondía a *H. vineae*. El genoma fue secuenciado por primera vez en 2013 [57], siendo el primer genoma de una levadura apiculada en ser caracterizado. En 2022 Oenobrand[®], empresa que provee soluciones biotecnológicas para la vinificación, comenzó a comercializar la cepa T02/05F bajo el nombre Fermivin[®] VINEAE HV205, esta cepa produce 10 veces más acetatos y el doble de bencenoides, compuestos aromáticos, en comparación a *S.cerevisiae* [58], recomendado tanto para vinos tintos, rosados, blancos y espumantes.

A diferencia de otras *Hanseniasporas*, *H. vineae* ha mostrado una mayor tolerancia al etanol, pudiendo completar fermentaciones hasta 10-11% de alcohol por volumen, mientras que otras especies del género no superan el 6% de alcohol. Esto se debe en parte a que su genoma presenta un mayor número de copias de los genes ADH, responsables de la resistencia al etanol [57].

A nivel metabólico, *H. vineae* exhibe una alta capacidad para producir compuestos aromáticos como ésteres acetatos y benzenoides, específicamente 2-feniletanol, tirosol, triptofol, y alcohol bencílico así como sus correspondientes ésteres, por lo cual también se caracteriza: tiene un gran potencial para acetilar. Además, genera menores concentraciones de alcoholes superiores y ácidos grasos de cadena media, lo que reduce el impacto de aromas negativos y favorece la percepción de frescura y frutalidad [59].

Otra característica importante es su capacidad para producir enzimas extracelulares como β -glucosidasa y proteasas. Como ya se ha mencionado, estas enzimas tienen un impacto positivo en la liberación de precursores aromáticos de la uva y en la estabilidad proteica de los vinos blancos. En estudios recientes, se ha observado que algunas cepas de *H. vineae* pueden reducir la turbidez de los vinos blancos en hasta un 50%, disminuyendo la necesidad de tratamientos con bentonita, una arcilla que se utiliza en el tratamiento clarificante [60].

Además, se ha estudiado el comportamiento de *H. vineae* en diversos tipos de vino. El análisis químico de los compuestos aromáticos producidos revela que los vinos fermentados con *H. vineae* contienen una cantidad considerablemente mayor de estos compuestos en comparación con los inoculados con *S. cerevisiae*, lo que podría explicarse

por duplicaciones de genes ARO, relacionados con la producción de estos compuestos y altamente expresados en esta cepa [61]. Sin embargo, se observó que los mostos inoculados con *H. vineae* requieren más tiempo para completar la fermentación en comparación con *S. cerevisiae*; no obstante, las vinificaciones lograron finalizar, y este mayor tiempo de fermentación no debe considerarse necesariamente un aspecto negativo, ya que las fermentaciones más lentas pueden tener beneficios organolépticos al prevenir la volatilización de aromas deseados y ser más eficientes energéticamente al requerir menos energía para su refrigeración [60] [62].

7. Fermentación alcohólica

Es la forma en la que las levaduras metabolizan de los azúcares presentes en el jugo de uva, principalmente la glucosa, y a partir de su degradación obtienen la energía necesaria para su crecimiento y actividad metabólica [33]. Este proceso se da a una temperatura de entre 20°-30° para vinos tintos y entre 10°-20° para vinos blancos. Dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, pueden seguir dos rutas metabólicas principales, la fermentación alcohólica o la respiración celular. Ambos procesos comienzan con la vía metabólica central, la glicólisis, donde la glucosa es transformada en piruvato, siendo primero fosforilada y convertida en fructosa-1,6-bifosfato, lo que requiere el consumo de dos moléculas de ATP, para luego ser escindida en dos compuestos de tres carbonos: gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato y finalmente, en la última fase el gliceraldehído-3-fosfato es oxidado y transformado en piruvato, generando una ganancia neta de dos moléculas de ATP por cada glucosa metabolizada [63]. En ausencia de oxígeno, las levaduras llevan a cabo la fermentación alcohólica, un proceso en el cual el piruvato es transformado en etanol y dióxido de carbono [33]. Esta transformación ocurre en dos pasos: primero, el piruvato es descarboxilado por la enzima piruvato descarboxilasa, dando lugar a acetaldehído y liberando CO₂. Luego, el acetaldehído es reducido a etanol mediante la acción de la alcohol deshidrogenasa, en un proceso que permite regenerar el NAD⁺ necesario para que la glicólisis continúe [63], de esta manera se generan los compuestos característicos del vino [50]. Este proceso se ilustra en la **Figura 2**.

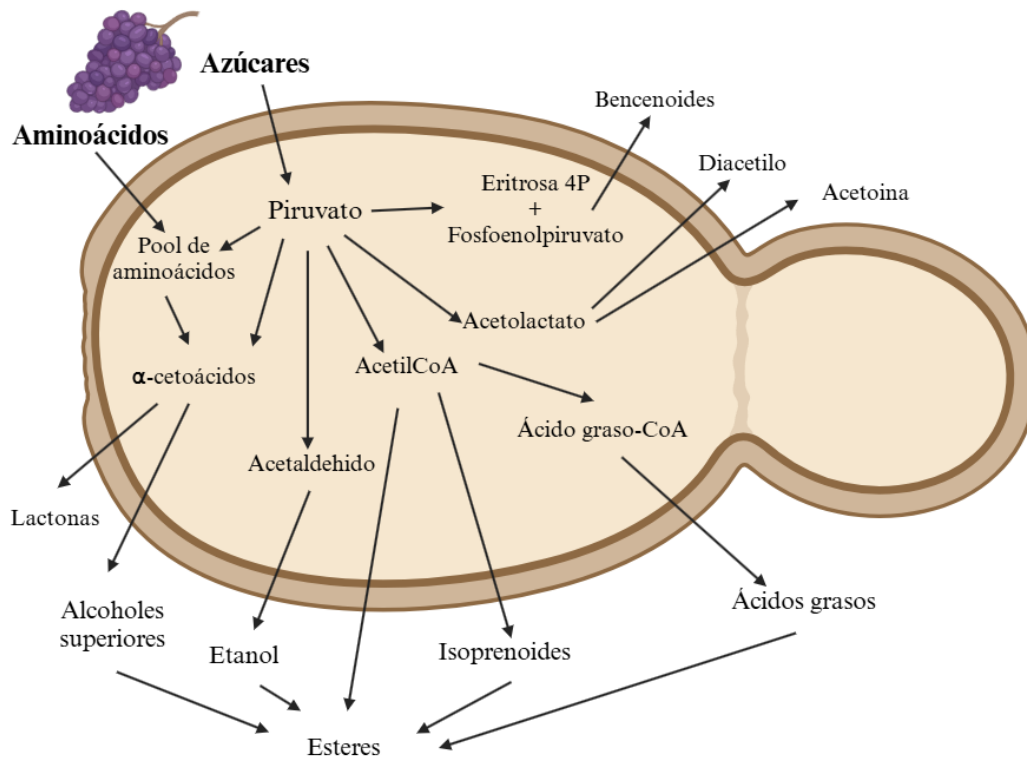


Figura 2. Metabolismo del azúcar.

Si bien se consumen la glucosa y la fructosa durante el proceso y se encuentran en concentraciones similares en la uva madura, *S. cerevisiae* muestra una clara preferencia por la glucosa, consumiéndola en primera instancia antes de metabolizar la fructosa [64]. Al finalizar el proceso, la mayoría del azúcar residual suele ser fructosa, la cual tiene un mayor poder endulzante en comparación con la glucosa [63].

El etanol es el segundo componente más abundante en el vino después del agua y el que crea mayor interés como producto de la vía principal de la fermentación. La cantidad de etanol en el vino final depende, en gran medida, de la concentración inicial de azúcares en el mosto y de la eficiencia de las levaduras utilizadas en la fermentación [33]. Según las condiciones, el tipo de producto y la capacidad fermentativa de las levaduras se necesita entre 16 y 18 g de azúcar/L, para producir un 1% vol. de etanol durante la fermentación alcohólica, los mostos deben contener entre 180 y 288 g de azúcar/L para obtener vinos de 10 a 16% vol. de etanol. Desde un punto de vista sensorial, el etanol aporta ciertas características organolépticas al vino. Posee un leve dulzor, una acidez moderada y un ligero amargor. Además, desempeña un papel fundamental como solvente y transportador de otros compuestos aromáticos, contribuyendo a la percepción de aromas y sabores en el vino [65].

Además de estos productos principales, también se surgen productos secundarios por vías secundarias del metabolismo de los azúcares ilustradas en la **Figura 2**, como el glicerol [66] que no tiene un impacto directo en el aroma del vino. Pero los metabolitos secundarios que influyen mayormente, como los bencenoides, isoprenoides, acetoina,

alcoholes superiores, ácidos grasos y sus ésteres; estos son los aromas secundarios o fermentativos. Los principales se detallan a continuación.

Alcoholes superiores

Todas las levaduras poseen la capacidad de generar alcoholes superiores, los cuales constituyen el grupo predominante de compuestos aromáticos en las bebidas alcohólicas. Estos alcoholes se distinguen por su aroma y sabor intensos, con notas picantes o cálidas [49] [67]. Se clasifican en dos tipos principales: alifáticos y aromáticos. Dentro del grupo de los alifáticos se encuentran el 1-propanol, el alcohol isoamílico y el alcohol isobutílico, mientras que entre los aromáticos destacan el alcohol 2-feniletílico y el tirosol [36].

Los alcoholes superiores pueden formarse a través de rutas anabólicas, a partir de glucosa, o mediante vías catabólicas, a partir de aminoácidos presentes en el medio. Su formación se debe al catabolismo de aminoácidos, el cual sigue la ruta de Ehrlich [68], **Figura 3**.

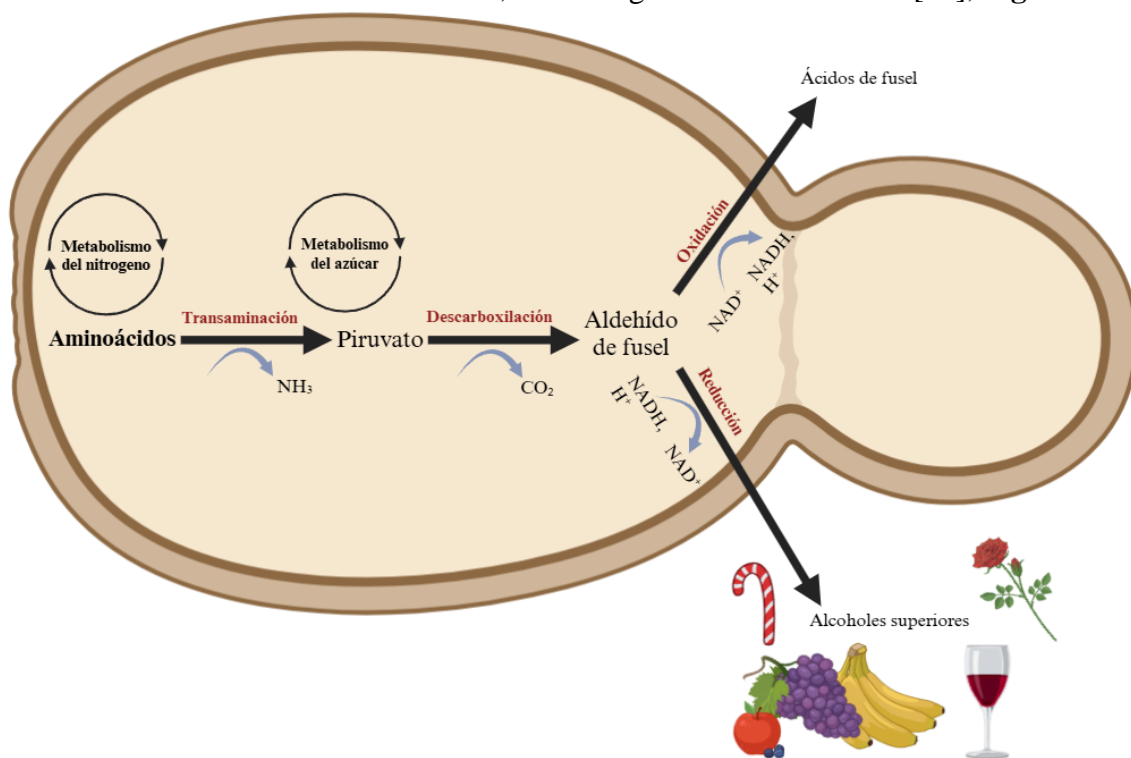


Figura 3. Ruta de Ehrlich.

Esta vía metabólica se compone de tres etapas principales [69] con genes reportados como sus moduladores. En la primera fase, las transaminasas codificadas por los genes ARO8, ARO9, BAT1 y BAT2 catalizan la conversión de los aminoácidos en sus correspondientes α -cetoácidos mediante un proceso de desaminación. Posteriormente, estos α -cetoácidos, como el piruvato, pasan a aldehídos a través de la acción de una de las cinco descarboxilasas presentes en su genoma (Pdc1p, Pdc5p, Pdc6p, Aro10p y Thi3p). Finalmente, la reducción de los aldehídos a alcoholes superiores es llevada a cabo por un grupo de alcohol deshidrogenasas, incluyendo Adh1p a Adh6p y Sfa1p [69]. En este

último caso, su síntesis puede involucrar la incorporación de nitrógeno amoniacal a esqueletos de cetoácidos mediante transaminación, con posibles funciones estructurales en la formación de proteínas. Dentro de este grupo, los compuestos más comunes son el 2 y 3-metilbutanol, el propanol, el butanol, el pentanol, el alcohol 2-feniletílico y el 3-metiltio-1-propanol [70].

La composición y concentración de estos compuestos en el vino dependen de diversos factores, entre ellos, la cepa de levadura empleada durante la fermentación y la disponibilidad de aminoácidos en el medio [50]. En la **Tabla 1** se presentan alguno de ellos.

Tabla 1. Alcoholes superiores en vinos junto a su descriptor aromático asociado y umbral de percepción (mg/L). Adaptado de [49]; [29]; [53].

Compuesto	Descriptor	Umbral (ug/L)
1-pentanol	Químico, aceite de fusel,	2.500 - 64.000
	desagradable	
1-butanol	Vinoso, medicina	500 - 10.000
1-propanol	Vinoso, esmalte de uñas	40.000
Alcohol isoamílico	Alcohólico, esmalte de uñas	250 - 31.0000
Alcohol isobutílico	Químico, aceite de fusel	565 - 228.000
2 y 3 metil 1-butanol	Dulce, papa	1.000
Alcohol 2 feniletílico	Rosa, talco, miel	10.000
Tirosol	Amargo, químico	200.000
Triptofol	N/I	N/I
Alcohol bencílico	Floral, rosa, fenólico, balsámico	200.000

N/I, no identificado.

Ácidos grasos

Los ácidos orgánicos poseen una volatilidad insuficiente como para influir significativamente en el perfil aromático del vino, a excepción del ácido acético. La biosíntesis de estos ácidos puede ocurrir a través de la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico con la incorporación de coenzima A, o bien de forma paralela a la producción de ácido fórmico, también derivado del ácido pirúvico y la coenzima A [71], se ilustra en la **Figura 2**.

Los ácidos de cadena media o larga, con más de seis carbonos, suelen presentar notas aromáticas lácteas, evocando ciertos tipos de queso, aunque sus concentraciones en los vinos suelen ser bastante bajas y pueden tener un impacto negativo en la calidad, dentro de este grupo están el ácido hexanoico, octanoico y decanoico y los ácidos 2 y 3-metilbutanoico. A su vez son constituyentes esenciales en la membrana celular [30].

Por otro lado, se generan ácidos grasos ramificados de cadena corta, con menos de seis carbonos, se originan en los procesos de anabolismo y catabolismo de los aminoácidos, como el ácido acético y butírico, con notas de vinagre, mantequilla rancia. Algunos de los ácidos mencionados se presentan en la **Tabla 2**.

Durante el proceso fermentativo, se observa un aumento en la concentración de los ácidos grasos de cadena corta, mientras que aquellos de cadena larga tienden a reducirse [49] [30]. En altas concentraciones pueden afectar el crecimiento de las levaduras.

Tabla 2. Ácidos grasos en vinos junto a su descriptor aromático asociado y umbral de percepción (mg/L). Adaptado de [29] [53].

Compuesto	Descriptor	Umbral (ug/L)
Ácido acético	Vinagre, rancio	150.000
Ácido butírico	Queso, rancio	2.200-4.000
Ácido isobutírico	Transpiración, agrio	8.100
Ácido 2 y 3-metilbutanoico	Queso azul	250
Ácido hexanoico	Grasoso, rancio, queso	420
Ácido octanoico	Grasoso, rancio, jabonoso	500

Ácido decanoico

Grasoso, rancio, desagradable 1.000

Ésteres

Los ésteres se forman en la fermentación alcohólica por la reacción entre alcoholes y ácidos grasos de manera intracelular. Los ésteres alcohólicos (acetatos de alcoholes superiores) se generan cuando la enzima alcohol acetiltransferasa (AATase) transfiere un grupo acetilo desde el Acetil-CoA a un alcohol superior; estos suelen tener menor umbral de percepción que sus respectivos alcoholes por lo que son percibidos más fácilmente [72].

Por otro lado, los ésteres de ácidos grasos, ésteres etílicos, se forman cuando una esterasa cataliza la reacción entre un ácido graso activado, Acil-CoA, y etanol [73]. La síntesis de estos ésteres está influenciada por factores como la cepa de levadura, la disponibilidad de nitrógeno asimilable y la temperatura; los ésteres de ácidos grasos de cadena corta aportan más aromas que los de cadena larga. Son los principales responsables de los aromas afrutados y florales en el vino [29]. En la **Tabla 3** se describen algunos de estos.

Tabla 3. Ésteres en vinos junto a su descriptor aromático asociado y umbral de percepción (mg/L). Adaptado de [29] [53].

Compuesto	Descriptor	Umbral (ug/L)
Acetato 2 feniletilo	Frutado, miel, floral	250
Acetato de tirosol	Frutado, floral	2000
Acetato de tritofol	Jazmín, notas especiadas	5000
Acetato de isoamilo	Banana, pera	30
Hexanoato de etilo	Banana, manzana, violetas	5-200
Octanoato de etilo	Durazno, manzana verde	14
Decanoato de etilo	Dulce, avellana	200

Teniendo en cuenta que cada especie de levadura tiene un metabolismo diferente al momento de producir estos productos secundarios, el perfil aromático será característico del metabolismo secundario de cada cepa de levadura [65].

8. Cultivo mixto

El cultivo mixto de levaduras es una estrategia biotecnológica utilizada en vinificación que busca combinar las propiedades fermentativas de *Saccharomyces cerevisiae* con el potencial aromático de levaduras no-*Saccharomyces*. Mientras que *S. cerevisiae* se caracteriza por su eficiencia en la fermentación alcohólica y su capacidad para convertir la mayor parte de los azúcares del mosto en etanol, las levaduras no-*Saccharomyces* aportan una mayor diversidad de metabolitos secundarios, como ésteres, alcoholes superiores y compuestos volátiles que enriquecen el perfil sensorial del vino [74]. Sin embargo, estas últimas presentan una menor tolerancia al etanol y frecuentemente no son capaces de completar la fermentación por sí solas, lo que hace necesaria la incorporación de *S. cerevisiae* para asegurar la estabilidad microbiológica y el grado alcohólico deseado [75].

Para llevar a cabo un cultivo mixto existen dos estrategias principales: la co-inoculación y la inoculación secuencial. En la co-inoculación, ambas levaduras se agregan al mismo tiempo al mosto. Esta técnica permite una fermentación más rápida y puede ser ventajosa desde el punto de vista operativo, pero conlleva el riesgo de que *S. cerevisiae*, por su rápido consumo de nutrientes y su resistencia al estrés fermentativo, inhiba el crecimiento de la levadura no-*Saccharomyces*. Esta dominancia metabólica puede limitar la expresión de los compuestos aromáticos deseados, dado que *S. cerevisiae* tiende a monopolizar el medio desde las primeras etapas [76].

Por otro lado, la inoculación secuencial permite modular el proceso. En este enfoque, primero se inocula la levadura no-*Saccharomyces*, permitiéndole actuar durante un periodo inicial de la fermentación para que libere sus compuestos aromáticos, y luego se incorpora *S. cerevisiae* para completar la conversión de azúcares en etanol [77]. Esta estrategia ha mostrado mejores resultados en términos de retención y expresión de aromas diferenciales, ya que la levadura no-*Saccharomyces* dispone de un entorno menos competitivo durante sus primeras etapas de crecimiento [75].

Este tipo de fermentación controlada puede generar vinos con mayor complejidad sensorial, más fresca y con perfiles diferenciados según la cepa utilizada [43].

9. Quorum Sensing

El término *quorum sensing* (QS) inicialmente fue ampliamente estudiado en bacterias donde se lo vio relacionado con la producción de biopelículas y toxinas, pero en años recientes su investigación se ha expandido a hongos y levaduras, incluyendo *Cryptococcus neoformans*, *H. uvarum* y *S. cerevisiae* [78].

Es un mecanismo de comunicación celular dependiente de la densidad poblacional en microorganismos. A través de la secreción y detección de moléculas señaladoras, los microorganismos coordinan respuestas colectivas al estado del medio como la disponibilidad de nitrógeno o la presencia de etanol en función del número de individuos, de manera de adaptarse y sobrevivir [79]. Este sistema regula procesos clave como la morfogénesis, la producción de metabolitos secundarios, la formación de biopelículas, esporulación, cambios morfológicos y regulación de la virulencia y la respuesta a cambios ambientales [80].

En *S. cerevisiae*, el QS funciona mediante la producción y acumulación de moléculas de señalización, llamadas moléculas de *quorum sensing* (QSMs, por sus siglas en inglés) [79]. Cuando la concentración de estas moléculas alcanza un umbral crítico, se activan vías de señalización intracelular que modifican la expresión génica y provocan cambios en la fisiología celular. En *S. cerevisiae* las QSM reportadas son el 2-feniletanol, el triptofol y el tirosol. Estas moléculas se sintetizan a partir de la ruta de Ehrlich, activando la expresión los genes ARO9 y ARO10, generando un bucle de retroalimentación positiva que incrementa aún más su producción. Además, ARO80 actúa como regulador transcripcional clave activando la expresión de ARO9 y ARO10 en respuesta a las QSMs, mientras que los genes Tpk2p y Flo8-FLO11 regulan la morfogénesis en función de la densidad celular [80].

Estas moléculas no solo actúan como señales reguladoras del crecimiento celular, sino que también resultan ser los metabolitos secundarios que influyen en las características organolépticas del vino al contribuir a su perfil aromático, moléculas como 2-feniletanol y tirosol están asociadas a descriptores aromáticos descriptos anteriormente [81]. Es decir, las mismas moléculas que la levadura produce para “hablar” con sus pares, son las que después determinan la expresión aromática del vino. Por lo que se si es posible comprender cómo las levaduras se comunican entre sí mediante señales químicas dependientes de la densidad celular, si se logra entender en qué momento las levaduras empiezan a “escucharse” y cómo responden a estas señales, es posible definir mejor el momento oportuno para inocular cada especie, optimizando la técnica de cultivo mixto y así potenciar al máximo la producción de aromas deseables y la eficiencia fermentativa.

Hipótesis

Existe una estrategia óptima para realizar la inoculación de *S.cerevisiae* en cultivo mixto con *H.vineae* M12/196F. Este sistema de interacción entre las dos especies está regulado por compuestos volátiles y permite maximizar la calidad aromática de vinos producidos con variedades neutras de uva.

Objetivos

Objetivo general

Determinar una estrategia óptima de inoculación de *S. cerevisiae* y *H. vineae* en cultivo mixto, e identificar compuestos producidos en las primeras horas de la fermentación claves en su interacción, obteniendo vinos de calidad con elevada complejidad aromática.

Objetivos específicos

- Caracterizar la cinética fermentativa de *H.vineae* M12/196F. Identificar y cuantificar concentraciones de compuestos aromáticos producidos en las primeras 72 horas de esta.
- Estudiar el efecto de compuestos bioactivos producidos por *H.vineae* M12/196F en concentraciones fisiológicas (correspondientes a las primeras 72 horas de fermentación) sobre la cinética de crecimiento de cepas de *Hanseniaspora* y de *Saccharomyces*. Identificar moléculas con potencial *quorum sensing*.
- Estudiar el efecto de compuestos bioactivos producidos por *H.vineae* M12/196F en concentraciones fisiológicas sobre la cinética fermentativa y producción de aromas de una cepa seleccionada por su compatibilidad con *S.cerevisiae*.
- Evaluar el impacto de diferentes estrategias de inoculación en el aroma del vino, identificando la que proporcione el mejor balance entre producción de etanol, intensidad y complejidad aromática.

Metodología

1. Insumos

Los insumos utilizados en el presente trabajo pertenecen al Área de Enología y Biotecnología de las fermentaciones y el Laboratorio de Biotecnología de los Aromas del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTAL), de Facultad de Química; en el marco del proyecto “Cultivos mixtos y uvas: cooperación y competencia entre levaduras e interacciones con compuestos bioactivos durante la fermentación”, un proyecto investigación Fundamental Fondo Clemente Estable con fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Así también las levaduras utilizadas fueron adquiridas o aisladas por el Área de Enología y Biotecnología de las fermentaciones, **Tabla 4**.

Tabla 4. Cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* utilizadas.

Nombre	Género	Especie	Origen
TS28	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oenobrand, Montpellier, Francia
3C	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oenobrand, Montpellier, Francia
KU1	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Viñedos uruguayos
ALG804	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oenobrand, Montpellier, France
MS522	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Viñedos uruguayos
0035	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Universidad de California, Davis
0030	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Universidad de California, Davis
M12/196F	no- <i>Saccharomyces</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Viñedos uruguayos
T02/25F	no- <i>Saccharomyces</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Viñedos uruguayos
M12/196F	no- <i>Saccharomyces</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Viñedos uruguayos
TE11/48F	no- <i>Saccharomyces</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Viñedos uruguayos
T02/05F	no- <i>Saccharomyces</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Viñedos uruguayos
T02/19F	no- <i>Saccharomyces</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Viñedos uruguayos
AWRI1280	no- <i>Saccharomyces</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Viñedos uruguayos
AWRI3579	no- <i>Saccharomyces</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Viñedos australianos

2. Estrategia experimental

2.1. Caracterizar la cinética fermentativa de *H.vineae* M12/196F. Identificar y cuantificar concentraciones de compuestos aromáticos producidos en las primeras 72 horas de esta

Se realizaron fermentaciones a escala laboratorio, microfermentaciones en matraces, de la cepa *H.vineae* M12/196F que no está siendo comercializada pero tiene potencial de ser de interés para la industria por su alta producción de bencenoides [82]. Se caracterizó el crecimiento y cinética fermentativa; se extrajeron, identificaron y cuantificaron aromas en los primeros tres días de la fermentación. El esquema experimental de esta sección se ilustra en la **Figura 4**.

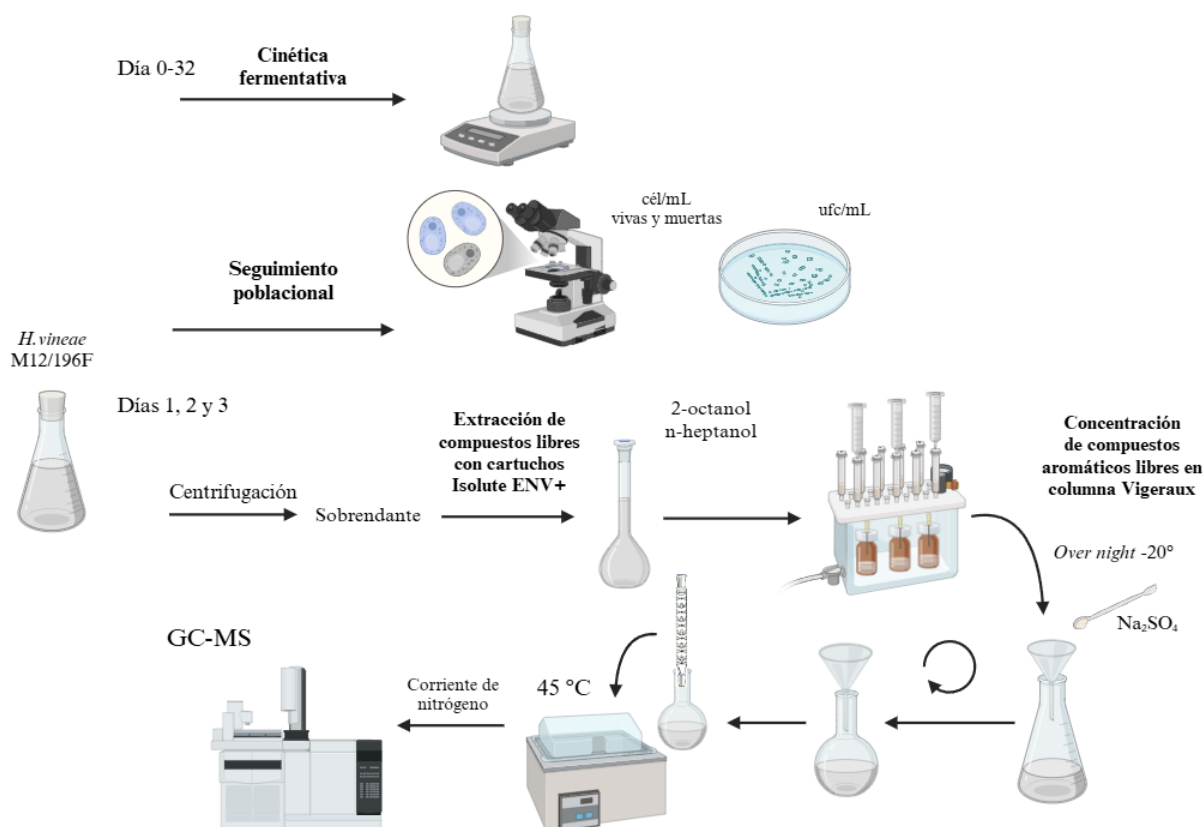


Figura 4. Esquema experimental de la sección 2.1.

2.1.1. Fermentación de *H.vineae*

Se descongelaron las cepas de levadura que se encontraban almacenadas a -70 °C y fueron cultivadas en placas de WLN agar [83] a 28 °C por dos días.

Se realizaron microfermentaciones en matraces estériles de 250 mL, por triplicado; cada uno en 75 mL de símil mosto que asemeja la composición del jugo de uva; 100 g/L de fructosa; 100 g/L de glucosa; 2,5 g/L tartrato ácido de potasio; 3,0 g/L ácido L-málico;

0,2 g/L ácido cítrico; 1,14 g/L fosfato dipotásico; 1,22 g/L sulfato de magnesio; 0,44 g/L dicloruro de calcio dihidratado; 10 mL stock vitaminas; 1 mL stock oligoelementos; stock aminoácidos 10 mL. Se filtró con filtro estéril MiniSart de 0,22 um y se agregó 10 mg ergosterol disuelto en EtOH 97%.

El stock de aminoácidos cuenta se conforma de Fenilalanina (Phe) 0,10 mg/mL, Tirosina (Tyr) 0,241 mg/mL, Triptófano (Trp) 1,205 mg/mL, Isoleucina (Ile) 2,411 mg/mL, Ácido aspártico (Asp) 4,218 mg/mL, Ácido glutámico (Glu) 6,026 mg/mL, Arginina (Arg) 9,040 mg/mL, Leucina (Leu) 3,616 mg/mL, Treonina (Thr) 4,218 mg/mL, Glicina (Gly) 0,603 mg/mL, Glutamina (Gln) 2,411 mg/mL, Alanina (Ala) 1,205 mg/mL, Valina (Val) 2,411 mg/mL, Metionina (Met) 1,808 mg/mL, Serina (Ser) 4,821 mg/mL, Histidina (His) 1,808 mg/mL, Lisina (Lys) 3,013 mg/mL, Prolina (Pro) 6,026 mg/mL y Asparagina (Asn) 1,808 mg/mL. Estos se mezclan en una plancha para homogeneizar y calentar a entre 100 °C y 70 °C al mismo tiempo. Posteriormente se filtró con un filtro estéril MiniSart de 0,22 um.

Estos fueron inoculados con 1×10^6 cél/ml de *H.vineae* M12/196F en condiciones de esterilidad a partir de colonias crecidas en WLN agar. Los matraces estaban tapados con algodón y aluminio para evitar contaminaciones y permitir la liberación de gas. La fermentación se realizó a 20 °C en estufa refrigerada.

2.1.2. Seguimiento de cinética fermentativa y poblacional

Cada día se agitaron levemente los matraces de manera manual para evitar gradientes de concentración y sedimentación de las levaduras; al igual que mejora la aireación y liberación de CO₂.

Posteriormente a la agitación se pesaban los matraces en balanza de precisión ya que la liberación de CO₂ producido por el proceso fermentativo, se traduce en una pérdida de peso de los matraces a lo largo de los días y es utilizada como forma indirecta de medir la cinética fermentativa. El CO₂ potencial se calculó con la **Ecuación 1** de **Anexo 2** a partir de los azúcares presentes en el símil mosto.

Se realizaron recuentos en cámara de Neubauer con azul de metileno 0.01%, citrato de sodio 2%; de muestras extraídas a las 24, 48 y 72 horas de la fermentación para determinar la densidad celular. El número de cél/ml fue calculado con la **Ecuación 2** del **Anexo 1**. Además de recuento en placa, utilizando la **Ecuación 3** también en **Anexo 1**.

El resto de la muestra fue almacenada en freezer a -20 °C.

2.1.3. Extracción de compuestos libres con cartuchos Isolute ENV+

Al finalizar el tiempo de fermentación correspondiente a cada triplicado, el contenido del matraz fue centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos para recuperar el sobrenadante donde se encuentran los compuestos producidos y liberados al medio extracelular, el *pellet*

compuesto de restos de levaduras fue descartado. El sobrenadante se almacenó a -20 °C en vasos de recolección estériles.

El método adaptado por *Boido. et al.* [84] permite separar tanto los compuestos aromáticos libres (aquellos que están en su forma volátil y pueden percibirse directamente a través del olfato) de los que se encuentran en forma ligada (aquellos conjugados con otras moléculas como azúcares en forma de glicósidos de manera que no son volátiles y, por lo tanto, no contribuyen al aroma del vino de manera inmediata). Los cartuchos utilizados contienen una resina polimérica de estireno-divinilbenceno, cuya estructura ha sido modificada para convertirla en un material adsorbente altamente hidrofóbico.

Se preparó el estándar interno 2-octanol y n-heptanol en un matraz aforado de 10,00 mL se agregaron 3,4 µL de estándar de 2-octanol y 3,4 µL de estándar de n-heptanol. La solución se completó hasta volumen con metanol. Las concentraciones finales obtenidas fueron de 0,278 g/L para 2-octanol y 0,279 g/L para n-heptanol.

La muestra se preparó tomando 50 mL en un matraz de 100 mL al que se le adicionó 0,1 mL de estándares internos y se enrasó con agua destilada.

Se acondicionaron los cartuchos Isolute ENV+ (International Sorbent Technology Ltd., Mid Glamorgan, UK) [85], para esto se preparó el sistema manifold conectándolo a la bomba de vacío, agregando los cartuchos con 1 g de un polímero de estireno-divinilbenceno (SDVB) altamente reticulado al sistema manifold utilizando adaptadores; los espacios donde no se conectaron cartuchos se tapan con tapones para asegurar el vacío del recipiente; a su vez a los cartuchos se conectan jeringas de 50 mL a modo de contenedor para que la muestra. Los cartuchos se lavaron con 15 mL de metanol y posteriormente se activaron con 20mL de agua destilada. Se esquematiza el proceso de elución en la **Figura 5**.

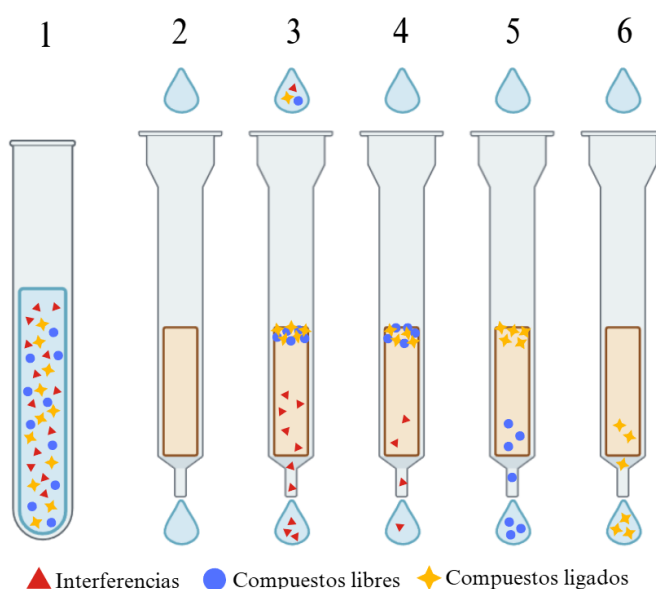


Figura 5. Esquema del procedimiento de retención y elución de los distintos compuestos aromáticos de muestra para cartuchos ISOLUTER ENV+. **1.** Pretratamiento de la muestra, dilución. **2.** Lavado de la fase con solventes metanol, miscible en agua para la eliminación de interferencias, posterior lavado con agua. **3.** Pasaje de la muestra. **4.** Elución de interferencias con agua. **5.** Elución de los compuestos volátiles libres con diclorometano. **6.** Elución de los compuestos ligados con metanol.

La **extracción** se realizó eluyendo la muestra a través de la resina, luego esta se lavó con 20 mL de agua. Se quitó el recipiente de plástico y se agregaron agujas y frascos de vidrio color ámbar con aluminio a modo de tapa para recolectar la muestra. Se eluyó la fracción libre en el cartucho con 30 mL de diclorometano, adaptando el sistema de presión controlada para tener un flujo de 4-5 mL/min. La fracción libre se almacenó *ON* en el freezer a -20 °C para que se congelase el agua. Para lavar los cartuchos se volvió a agregar el recipiente de plástico y 30 mL de metanol.

Para la **concentración** la fracción libre ya congelada esta se sacó del freezer y rápidamente (para evitar que se descongele el agua) se transfirió a un matraz seco a través de un embudo con lana de vidrio, se secó agregando sulfato de sodio anhidro, se agitó levemente y filtró nuevamente con lana de vidrio a un balón de 100 mL. Se concentró con una columna Vigeraux en el balón de vidrio con piedras de ebullición dentro, para que no se creen burbujas al elevar la temperatura, en un baño a 45 °C hasta un volumen de 4 mL aproximadamente. Una vez llegado al volumen se trasvasó a un vial y se terminó de concentrar hasta 200 µL con corriente de nitrógeno.

2.1.4. Identificación de compuestos extraídos

La identificación se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, GC-MS, en un espectrómetro de masas Shimadzu-QP 2010 ULTRA (Tokio, Japón) equipado con una columna capilar Stabilwax (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espesor de película; Restek Corporation, Bellefonte, PA, EE.UU.). Para el GC la temperatura del horno era de 40 °C, la del inyector 240 °C en modo *split*. Para el MS la fuente de iones de temperatura es de 200 °C, la de la interfase 240 °C. Se tuvieron en cuenta los índices de retención lineal según el índice de Kovats o índice de retención y su fragmentación que se comparó con las de bibliotecas de espectros de referencia para su identificación [86] [87] [88] [89].

2.1.5. Cuantificación de compuestos extraídos

Los cromatogramas extraídos del GC-MS fueron analizados en el programa *Lab solutions* [90] La cuantificación se realizó integrando los picos de los compuestos, tomando de referencia el área del estándar 2-octanol y n-heptanol de concentración conocida, las concentraciones se calcularon utilizando la **Ecuación 4, Anexo 3**.

2.2. Estudio de efecto de compuestos bioactivos producidos por *H.vineae* M12/196F en concentraciones fisiológicas (correspondientes a las primeras 72 horas de fermentación) sobre la cinética de crecimiento de cepas de *Saccharomyces* y de *Hanseniaspora*. Identificación de moléculas con potencial *quorum sensing*

Los experimentos que se explican en esta sección sirvieron para estudiar como las concentraciones fisiológicas de algunos los compuestos identificados y cuantificados en la sección anterior afectaban el crecimiento de cepas de levaduras *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

2.2.1. Precultivos

Se realizan precultivos en 5 mL de YPD (20 g/L glucosa; 20 g/L peptona; 10 g/L extracto de levadura) en tubos estériles a partir de una colonia de cada una de las cepas crecidas en WLN. Se crecieron *ON* en *shaker* a 120 rpm y 25 °C.

2.2.2. Siembra de microplaca

Del compuesto correspondiente se realizan diluciones a partir de soluciones más concentradas [91] de manera de llegar a la concentración producida por *H.vineae* M12/196F en cada momento, utilizando la **Ecuación 5, Anexo 4**.

Se sembraron 250 uL por pocillo, con 225 uL de símil mosto con la dilución del compuesto a analizar y 25 uL del inóculo de manera de que sean 10^6 cél/mL por pocillo, esto se calcula a partir del recuento en microscopio óptico en cámara de Neubauer, **Ecuación 1, Anexo 2**.

Las distintas cepas de levaduras se sembraron en placas de 96 pocillos de manera horizontal, a excepción de la última fila donde no se sembró ninguna levadura y funciona como blanco. De manera vertical y de a tres columnas se sembraron las concentraciones del compuesto seleccionado de manera que las primeras tres columnas corresponden a la concentración producida por *H.vineae* M12/196F a las 24 horas, las siguientes tres a la de 48 horas, de igual manera las otras tres para las 72 horas y las últimas son triplicados de control negativo sin compuesto. El esquema de siembra se ilustra en la **Figura 6**, tanto para las levaduras *Saccharomyces* (**Figura 6a**) y las no-*Saccharomyces* (**Figura 6b**).

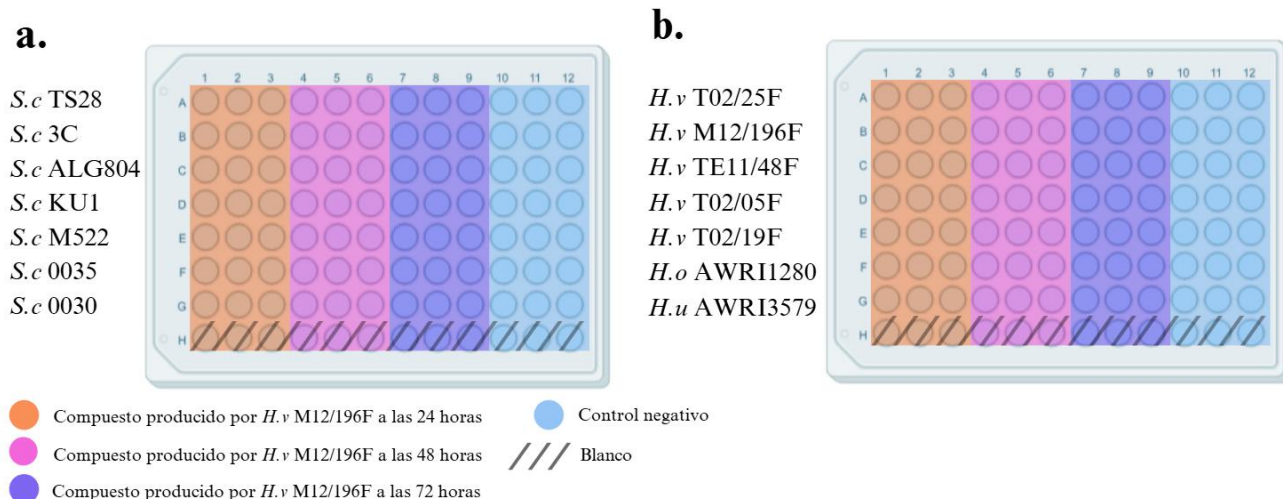


Figura 6. Esquema de siembra de placa de 96 pocillos. **a.** Cepas de levaduras *Saccharomyces*. **b.** Cepas de levaduras no-*Saccharomyces*.

Cada placa se dejó creciendo en el lector de placas TECAN por 48 horas, utilizando el programa *Magellan* [92] seteado para que se tomaran medidas de absorbancia a 620 nm cada 20 minutos con un total de 97 ciclos a 25 °C (con un rango de temperatura entre 24 y 26 °C).

2.2.3. Análisis de parámetros de crecimiento

Los archivos extraídos del lector de placas TECAN fueron procesados mediante el software GATHODE [93], un paquete de software para analizar series temporales de mediciones de densidad óptica registradas con ayuda de un lector de placas. Permite extraer parámetros de crecimiento como la fase de latencia, el tiempo de duplicación, el tiempo que tarda en llegar a su máximo crecimiento y la velocidad de crecimiento.

Estos datos se analizaron el comando de análisis estadístico de los datos mediante ANOVA con el programa de análisis y visualización de datos STATISTICA 7.0 [94]. Se calcularon y las diferencias significativas de Tukey.

En estudios de crecimiento celular de levaduras, los parámetros cinéticos permiten evaluar la eficiencia y dinámica del proceso. El **tiempo máximo** se refiere a cuánto tarda el cultivo en llegar a la velocidad máxima de crecimiento, un aumento en este valor indica un crecimiento fue más lento. El **tiempo de duplicación**, corresponde al intervalo requerido para que la población de microorganismos se duplique, su incremento sugiere una menor tasa de proliferación. La **duración de la fase de latencia** es el tiempo que tarda en comenzar la fase exponencial, su prolongación implica que la levadura enfrenta desafíos en la adaptación, ya sea por estrés ambiental, deficiencia de nutrientes o la necesidad de activar rutas metabólicas específicas. La **velocidad de crecimiento** mide la rapidez con la que aumenta la biomasa, su incremento refleja condiciones favorables para el desarrollo celular y una eficiente asimilación de sustratos [93].

Mediante el programa se determinaron en qué condiciones había diferencias significativas para cada uno de estos. Para mejor visualización del efecto producido se diseñó un sistema de puntuación en el que si un parámetro que presenta diferencia significativa demuestra que una concentración de compuesto favorece el crecimiento de la levadura, se le suma un punto (+1), si por el contrario lo desfavorece se le resta un punto (-1) y si no presenta diferencias significativas, o sea que no le afecta de ninguna manera y por lo tanto no presenta diferencias significativas, no se le adjudica puntaje (0). Esto se repite para cada parámetro de crecimiento de cada cepa de levadura bajo cada concentración de compuesto.

2.3 Estudio del efecto de compuestos bioactivos producidos por *H.vineae* M12/196F en concentraciones fisiológicas sobre la cinética fermentativa y producción de aromas de una cepa seleccionada por su compatibilidad con *S.cerevisiae*

A partir del punto anterior se seleccionaron compuestos que favorecieran o desfavorecieran el crecimiento de cada una de las cepas, algunos de los compuestos de mayor interés pasaron a este estudio para ver su efecto sobre la fermentación de la levadura *Saccharomyces* si se agrega en esas mismas concentraciones fisiológicas de manera exógena. Este y cada uno de los siguientes ensayos de fermentación fueron detenidos al día 10, no porque se considerara que la fermentación había terminado, sino para evitar la aparición de defectos aromáticos que pueden aparecer por tratarse de una escala de laboratorio y no reflejan lo que sucedería a escala industrial con mayor agitación.

2.3.1. Elección de cepa de *S.cerevisiae*

Para seleccionar la cepa de *S.cerevisiae* a utilizar se diseñó un experimento en microplaca a modo de observar el efecto de un mosto fermentando por *H.vineae* M12/196F sobre el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* de manera global y no solamente compuesto por compuesto, se realizó un cultivo en símil mosto por 24 horas en agitación 120 rpm y este mosto ya centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, se filtraron 10 mL con filtro estéril MiniSart de 0,22 μm y luego se le agregó 52 μL de solución de nutrientes (50 μL extracto de levadura, 2 μL tiamina) fue utilizado como medio para sembrar una placa de 96 pocillos con las siete cepas de *S.cerevisiae* a utilizadas. Se sembraron 225 μL de este mosto, los pre-cultivos de las siete cepas de *S.cerevisiae* fueron realizados como se describe en el **Punto 2.1.1**. Se ilustra en la **Figura 7**.

En las otras tres columnas se inocularon las cepas, pero con mosto nuevo sin nutrientes para ver el potencial máximo de crecimiento, cuando el medio tiene todos los nutrientes.

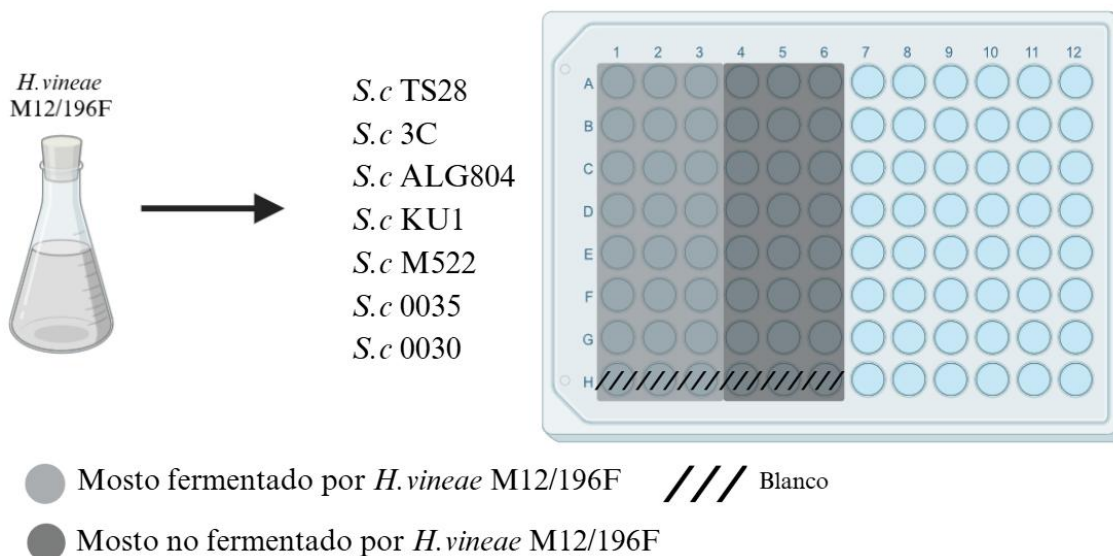


Figura 7. Procedimiento de microplaca con cepas de *S.cerevisiae* en mosto fermentado por *H.vineae* M12/196F.

Se realizó el mismo análisis descrito en el punto 2.2.3 de manera de seleccionar la cepa de *S.cerevisiae* cuyo crecimiento se viera más favorecido por el mosto fermentado de *H.vineae* M12/196F.

2.3.2. Fermentación de *S.cerevisiae* TS28 en símil mosto con compuestos agregados

Las fermentaciones de *S.cerevisiae* TS28 se realizaron por triplicado de igual manera que se detalla en puntos anteriores, pero en este caso cada triplicado se les agregó de manera exógena la concentración producida en determinado momento por *H.vineae* M12/196F de los compuestos seleccionados a partir de su efecto favorable o negativo sobre la fermentación analizado en el punto anterior.

2.3.3. Identificación y cuantificación de compuestos durante la fermentación junto al compuesto seleccionado

La extracción de compuestos libres con cartuchos Isolute ENV+ y concentración de estos en matraces con columna Vigeraux, así como su identificación y cuantificación por GC-MS siguen el procedimiento ya mencionado anteriormente, en los 2.1.3; 2.1.4 y 2.1.5.

2.4 Extracción de ADN de levaduras para secuenciación

Para la extracción de ADN genómico de las levaduras, se empleó inicialmente el kit QIAGEN Genomic DNA [95] específico para levaduras, siguiendo el protocolo estándar recomendado por el fabricante. Sin embargo, debido a la baja cantidad de ADN recuperado en las muestras procesadas, se implementaron modificaciones al

procedimiento con el objetivo de mejorar la disrupción celular y optimizar la recuperación del material genético.

En una de las modificaciones, antes de la lisis celular, las células fueron sometidas a nitrógeno líquido para inducir la crio trituración del material, facilitando la ruptura de la pared celular mediante la posterior pulverización mecánica. En otra variante del protocolo, se aplicó sonicación previa a la extracción durante 5 minutos, utilizando un sonicador de laboratorio con parámetros controlados de amplitud y tiempo de exposición, con el fin de fragmentar la estructura celular mediante cavitación ultrasónica antes del proceso de lisis enzimática.

Las muestras obtenidas tras cada procedimiento fueron sometidas a análisis de calidad e integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando buffer TAE y tinción con GreenSafe [96] para la visualización del ADN bajo luz UV.r

2.5 Evaluación del impacto de diferentes estrategias de inoculación en el aroma del vino, identificando la que proporcione el mejor balance entre producción de etanol, intensidad y complejidad aromática

Se diseñaron los experimentos de manera de caracterizar las fermentaciones con co-inoculación e inoculaciones secuenciales el momento de inoculación de la levadura *Saccharomyces* a una fermentación de no-*Saccharomyces*.

2.5.1. Caracterización del mosto de uva

Se utilizó mosto blanco de uva Ugni Blanc cedido por GRUPO TRAVERSA S.A [97]. Se le midió densidad utilizando un densímetro portátil Anton Paar, así como la temperatura para relacionar la densidad a los gramos de azúcar (utilizando la **Tabla 5, Anexo 5**) el pH, la refractometría y se determinó el nitrógeno asimilable mediante el método de Sørensen [98].

Para eliminar cualquier microorganismo presente en el mosto se agregó 200 uL/L de Dimetil dicarbonato (DMDC). Se esperó 5 horas para que este se degradara en agua y CO₂ antes de utilizar el mosto.

2.5.2. Fermentación con cultivo mixto

Se realizaron microfermentaciones en mosto blanco de uva Ugni Blanco como se explica en el **punto 2.1.1**. En las pruebas de fermentaciones mixtas se realizó una co-inoculación simultánea de *H.vineae* M12/196F y *S.cerevisiae* TS28; así como inoculaciones secuenciales que comenzaron la fermentación con *H.vineae* M12/196F, a una de ellas se le inoculó con *S.cerevisiae* TS28 a las 24 horas, la otra a las 48 horas y la última a las 72 horas. Cada vez que se inoculó con *S.cerevisiae* TS28 se agregó solución de nutrientes

(15 $\mu\text{L/L}$ de tiamina y 375 $\mu\text{L/L}$ de extracto de levadura). Cada fermentación se realizó por triplicado como se ilustra en la **Figura 8**.

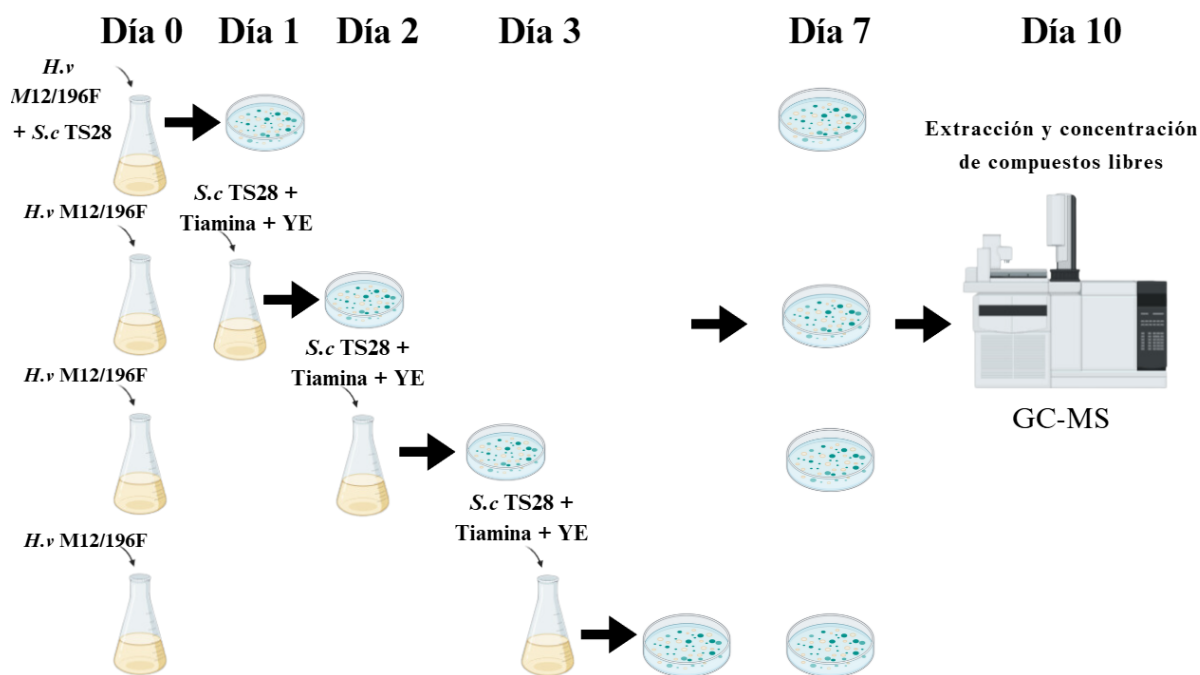


Figura 8. Estrategia experimental del punto 2.5.2.

Las fermentaciones se mantuvieron en estufa refrigerada a 20°C, agitándolas diariamente.

2.5.3. Determinación de cinética fermentativa y recuento de levaduras en placa.

Los matraces fueron pesados diariamente y muestras de cada uno fueron plaqueados en WLN luego de 24 horas de inoculación y al séptimo día de fermentación.

2.5.4. Identificación y cuantificación de compuestos durante la fermentación mixta

La extracción de compuestos libres con cartuchos Isolute ENV+ y concentración de estos en columna Vigeraux, así como su identificación y cuantificación por GC-MS siguen el procedimiento ya mencionado en los 2.1.3; 2.1.4; 2.1.5 en muestras extraídas el día 10.

2.5.5. Determinación del perfil aromático

Para caracterizar el perfil aromático de cada fermentación, los compuestos identificados se agruparon según sus descriptores sensoriales: frutal, floral, miel, mantecoso, especiado, herbáceo, queso o rancio, y graso. A cada compuesto se le calculó su *Odor Activity Value* (OAV), definido como la relación entre su concentración en el vino y su umbral de percepción sensorial.

2.5.6. Caracterización química del fermentado

Fueron analizadas concentraciones de glucosa, fructosa y etanol al mosto de uva previo a la fermentación y luego de esta mediante HPLC. Se realizaron curvas de calibración para ambos casos, **Anexo 5**. Se utilizó una columna SUPELCOGEL C-610H (30cm x 7.8mm, 9 μ m), fase móvil fue sulfúrico 0,005N, la temperatura del horno 60 °C, la temperatura del detector RID 60 °C, la temperatura detector UV 40 °C, la temperatura de la columna 60°C y un flujo de 0,5 mL/min.

Resultados y discusión

1. Caracterización de la cinética fermentativa de *H.vineae* M12/196F. Identificación y cuantificación de concentraciones de compuestos aromáticos producidos en las primeras 72 horas de esta

1.1. Seguimiento de cinética fermentativa y crecimiento poblacional

Para evaluar la cinética de fermentación, se llevaron a cabo microfermentaciones en un medio similar mosto, monitoreando el crecimiento de *H.vineae* M12/196F a lo largo del proceso fermentativo. En la **Figura 9** se evidencia que durante las primeras 24 horas la curva comienza a incrementarse, marcando la transición de la fase de latencia a la fase exponencial. En esta etapa, las levaduras se han adaptado al medio y han activado sus rutas metabólicas fermentativas, utilizando los azúcares fermentables como principal fuente de carbono y energía mediante la fermentación alcohólica, donde los convierten en etanol y CO₂. La producción de este último gas se empleó como un indicador indirecto de esta cinética, con muestreos realizados en los primeros tres días para su posterior análisis de compuestos volátiles.

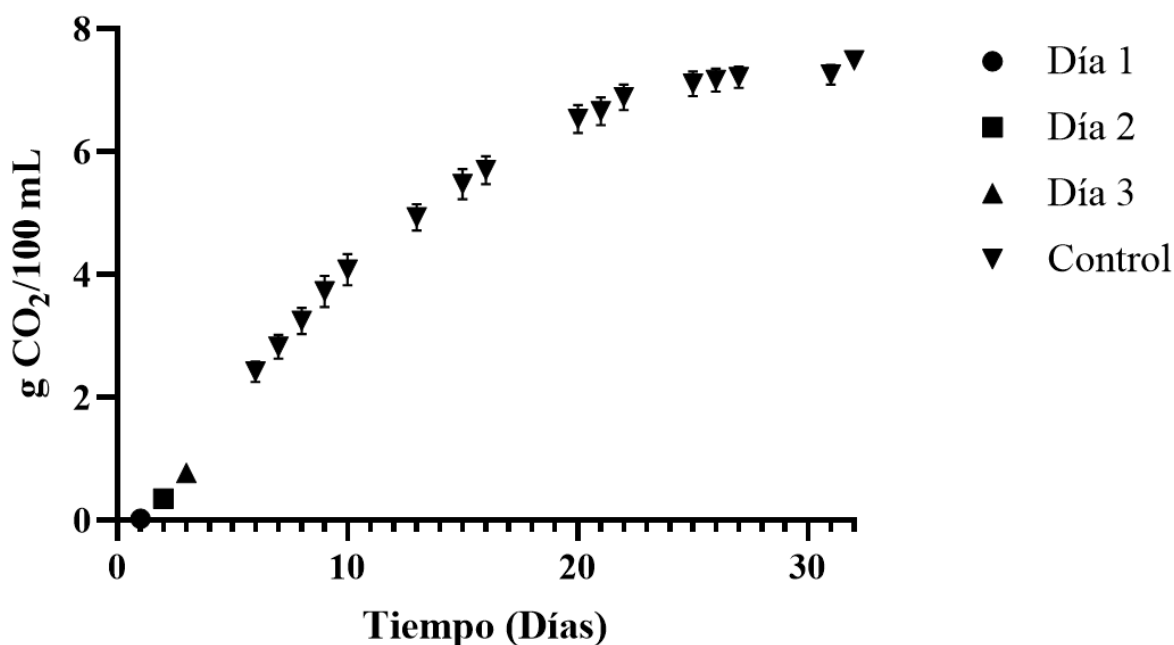


Figura 9. Gráfica de cinética fermentativa a lo largo del tiempo. ●, medida tomada el día 1. ■, medida tomada el día 2. ▲, medida tomada el día 3. ▼, medidas tomadas hasta el final de la fermentación como control.

La fase exponencial se extendió aproximadamente hasta los días 19-20, durante este tiempo la tasa de división celular se mantiene [99]. A partir de este punto, la variación en el peso de los matraces se tornó mínima, la curva mostró una tendencia hacia la meseta, sugiriendo que la población celular ha alcanzado su densidad máxima y ha entrado en un

estado de mantenimiento metabólico, donde las levaduras continúan con funciones fisiológicas esenciales, pero sin replicarse activamente, lo que indica una disminución en la tasa de producción de CO₂ y la transición a la fase estacionaria [33]. Comparativamente, estudios previos con *H. vineae* han reportado fermentaciones de menor duración [72]. Estas diferencias pueden deberse a que, si bien se partió de símil mostos con la misma concentración de azúcar y nutrientes, se utilizaron las mismas condiciones, la agitación diaria que se hace de forma manual puede haber sido diferente entre los operarios, dando lugar a el cultivo se comportara diferente. Además hay que considerar que aunque la fermentación se dio como finalizada, en este experimento se siguió midiendo la pérdida de CO₂ hasta el día 32 para completar la curva de cinética fermentativa; mientras que los estudios que utilizan *H.vineae* M12/196F finalizan aproximadamente al día 12, ya que a escala de laboratorio no se realizan los mismos tratamientos que en la bodega y pueden dar pie a compuestos volátiles que interfieran con la caracterización de los aromas; de ahora en más los experimentos realizados fueron terminados al día 10 por esta razón.

A partir de la concentración inicial de azúcares en el mosto, se estimó una producción teórica de 9,68 g CO₂/100 mL al final del proceso mediante la **Ecuación 1** del **Anexo 2**, mientras que la cuantificación experimental arrojó un valor de 7,48 g CO₂/100 mL, lo que indica una eficiencia fermentativa ligeramente inferior a la esperada, aunque dentro de un rango aceptable y similar a estudios previos con otras cepas de *H.vineae* [47].

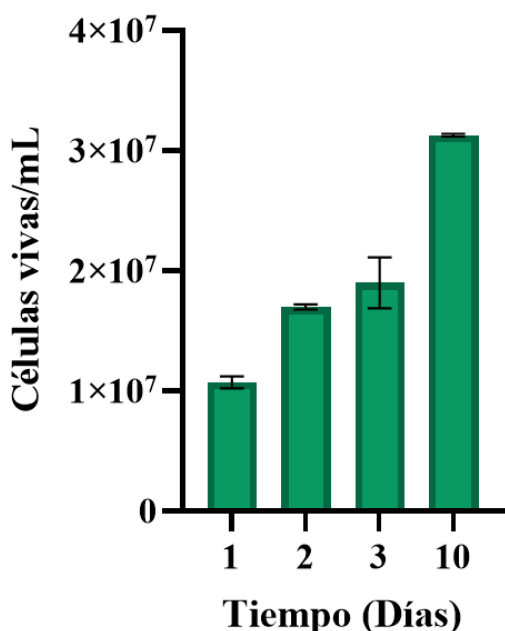


Figura 10. Recuento de células vivas a lo largo de la fermentación.

Esto se puede correlacionar con la cantidad de células vivas, **Figura 10**, estas crecen hasta llegar a 3.13×10^7 células al día 10, mientras que *Martin et al.* [82] logra aproximadamente 4×10^7 para el día 13. Por lo que si bien se tenía un número similar de levaduras que comportaron de manera distinta aún en las mismas condiciones experimentales, el único

factor que cambió es la agitación ya que se realizó de forma manual y puede variar entre operadores, dando a entender la importancia de la agitación para el crecimiento de *H.vineae* M12/196F.

1.2. Compuestos identificados

Se identificaron y cuantificaron 30 compuestos volátiles producidos durante la fermentación alcohólica de *H.vineae* M12/196F en los primeros tres días de fermentación, de los que se decidió seguir estudiando 10 de interés clasificados en alcoholes superiores, acetatos y ácidos grasos de cadena corta. El interés de estudiar los acetatos es por la alta capacidad de *H.vineae* de acetilar alcoholes superiores, mientras que los ácidos grasos pueden tener un rol de comunicación celular. La cuantificación de cada compuesto se desglosa a continuación. Las concentraciones se muestran más en detalle en la **Tabla 6, Anexo 2**.

Alcoholes superiores

Dentro de este grupo se identificó al alcohol 2-feniletílico, tirosol, triptofol y alcohol bencílico, las concentraciones se observan en la **Figura 11** acompañadas de la curva de crecimiento.

Tanto el alcohol 2-feniletílico como el tirosol muestran un incremento significativo en su concentración que acompaña el crecimiento celular, siendo los que se producen en mayor proporción; esto coincide con que la producción de ambos está regulada por la densidad celular [70]. Por un lado, el alcohol 2-feniletílico no supera su umbral de percepción de 10.000 µg/L en las primeras 72 horas de fermentación; aunque las fermentaciones con esta cepa indican que al día 12 si lo supera y se perciben los aromas de rosa y miel [82]; el incremento exponencial indica que podría haber llegado a esta concentración si se hubiera seguido el experimento.

Si bien el alcohol bencílico tampoco supera los 200.000 µg/L necesarios para detectarlo esto se debe a que se mantiene en concentraciones muy bajas al inicio de la fermentación. A pesar de su bajo nivel de producción, también tiene un umbral de percepción relativamente bajo, pudiendo alcanzar hasta 620 µg/L a los 12 días de fermentación [82], por lo que se podría llegar a detectar sus notas aromáticas floral, rosa, fenólico y balsámico. Aunque es producido en bajas concentraciones en comparación a otros compuestos, es muy característico de *H.vineae* y no se ha visto en fermentaciones de *S.cerevisiae* [82].

El triptofol es el que cuenta con un comportamiento más llamativo pues alcanza su máximo a las 48 horas, pero decrece a las 72 horas, no siguiendo la curva de crecimiento celular. Esto sugiere una posible transformación o degradación, que la mayoría del alcohol haya sido convertido en su forma acetilada mediante alcohol acetiltransferasas, enzima con alta actividad en esta levadura; esta forma del compuesto es más volátil y se acumula en el medio como parte del perfil aromático de la fermentación. Este proceso podría estar indicando un proceso de señalización. Tampoco se especifica un descriptor aromático, ni su umbral de percepción, lo que hace difícil evaluar su impacto en la calidad sensorial.

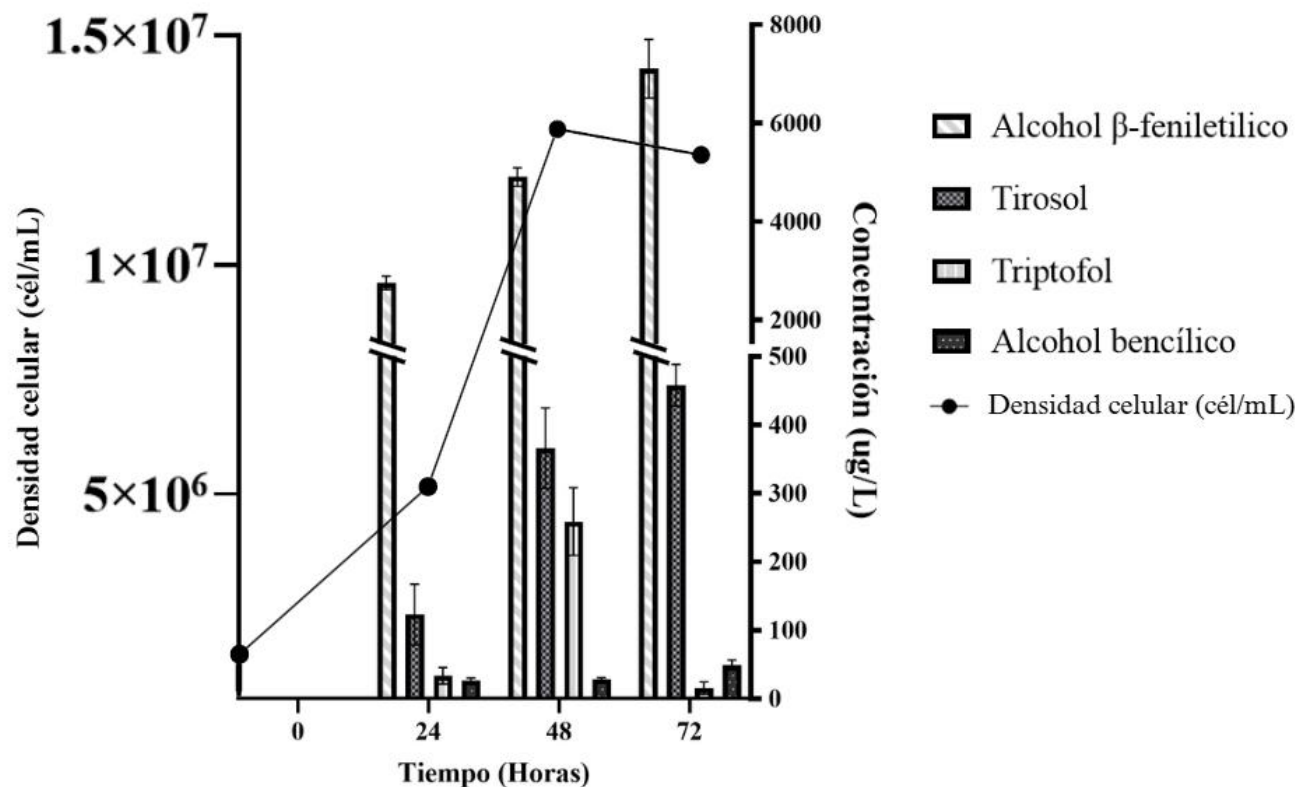


Figura 11. Dinámica de producción de alcoholes superiores y curva de crecimiento celular de *H. vineae* M12/196F durante la fermentación.

Al momento de caracterizar las diferentes cepas de *H. vineae* por [100] la cepa M12/196F se destacó por su alta producción de alcoholes superiores, casi en igual proporción que *S. cerevisiae* M522.

Ésteres

Dentro de este grupo se estudiaron los ésteres alcohólicos, entre ellos el acetato 2-feniletilo, el acetato de tirosol y el acetato de triptofol. Sus concentraciones se muestran en la **Figura 12**.

El acetato 2-feniletilo experimenta un aumento notable en su concentración, valor similar previamente reportado [82], superando su umbral de percepción, 250 µg/L, lo que indica que su contribución al aroma es significativa incluso en etapas tempranas de la fermentación. Este compuesto es conocido por aportar aromas de fruta tropical, manzana, miel y florales (concretamente rosa). Este es otro de los compuestos en los que se encuentra una diferencia de producción entre las *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, en especial el género *Hanseniaspora*, dentro de la cual la cepa M12/196F se ha destacado por ser la mayor productora. La concentración del acetato concuerda con ser la que está en mayor proporción con que su alcohol precursor también sea el más presente, por lo que se da una acetilación muy eficiente. La producción final del acetato alcanza aproximadamente 46% de la concentración del alcohol, lo que confirma una alta tasa de acetilación.

El acetato de tirosol también presenta un incremento considerable, partiendo de 386,0 $\mu\text{g/L}$ a las 24 horas y alcanzando 2448,74 $\mu\text{g/L}$ a las 72 horas, superando en este punto su umbral de percepción de 2000 $\mu\text{g/L}$, dando lugar a notas afrutados y florales. Si bien no está caracterizado para esta cepa, la cepa comercial M02/25F presentó una producción de 4547 $\mu\text{g/L}$ a los 12 días de fermentación por lo teniendo en cuenta el tiempo que le tomó a M12/196F llegar a la mitad de este valor, se podría suponer que puede producir más que M02/25F. El acetato de tirosol se encuentra en concentraciones mayores que su alcohol precursor desde el inicio al igual que *Martin et al.* [59]. Esto indica que la acetilación ocurre de manera muy eficiente y rápida por parte de *H. vineae* M12/196F.

El acetato de triptofol es el compuesto que muestra las mayores concentraciones en todos los tiempos de medición, iniciando en 4111,18 $\mu\text{g/L}$ a las 24 horas y superando el umbral de 5000 $\mu\text{g/L}$ para percibir los aromas afrutados y florales al llegar a 7334,3 $\mu\text{g/L}$ a las 48 horas. El caso más extremo de alta acetilación es el del triptofol, que muestra una concentración máxima a las 48 horas, su acetato es producido en una cantidad muy superior desde las primeras horas de fermentación. Esto indica que *H. vineae* M12/196F convierte casi todo el triptofol en su forma acetilada de manera inmediata, con una eficiencia extremadamente alta.

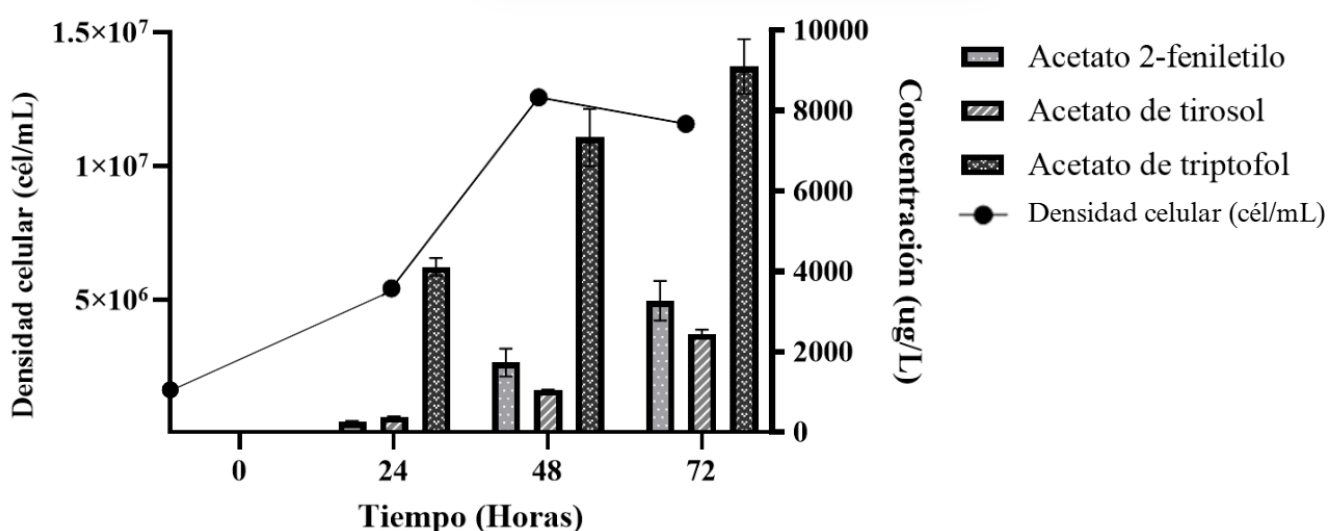


Figura 12. Dinámica de producción de acetatos y curva de crecimiento celular de *H. vineae* M12/196F durante la fermentación.

En la caracterización de *Martin et al.* [82] esta cepa resultó ser la mayor productora de acetatos y los valores son similares a los presentados por *Valera et al.* [72].

Ácidos grasos de cadena media

Se observa un incremento progresivo de los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico a lo largo del tiempo, **Figura 13**, lo que sugiere que *H. vinea* M12/196 metaboliza activamente los precursores lipídicos y aminoácidos durante la fermentación. En el comportamiento general de las no-*Saccharomyces*, estas suelen producir menos cantidad de ácidos grasos que las *Saccharomyces* [74].

El ácido hexanoico, que presenta notas aromáticas a queso y grasa, incrementa su concentración a lo largo del tiempo. Este comportamiento indica una activación de rutas metabólicas vinculadas a la síntesis y degradación de lípidos, con posibles efectos sobre la estabilidad de la membrana celular y la supervivencia de la levadura a condiciones fermentativas. En términos sensoriales, su concentración final no supera el umbral de percepción.

Por otro lado, el ácido octanoico, con descriptores rancios y grasos, aumenta de 35,14 $\mu\text{g/L}$ a 152,81 $\mu\text{g/L}$, también sin superar el umbral de percepción.

El ácido decanoico, que alcanza 598,07 $\mu\text{g/L}$ y tampoco supera el umbral de percepción es conocido por conferir notas cerosas y jabonosas en altas concentraciones. Se ha sugerido que este compuesto podría contribuir a la percepción de volumen en boca de los vinos fermentados con *H. vineae* M12/196F, debido a su interacción con otros lípidos y polisacáridos liberados durante la fermentación.

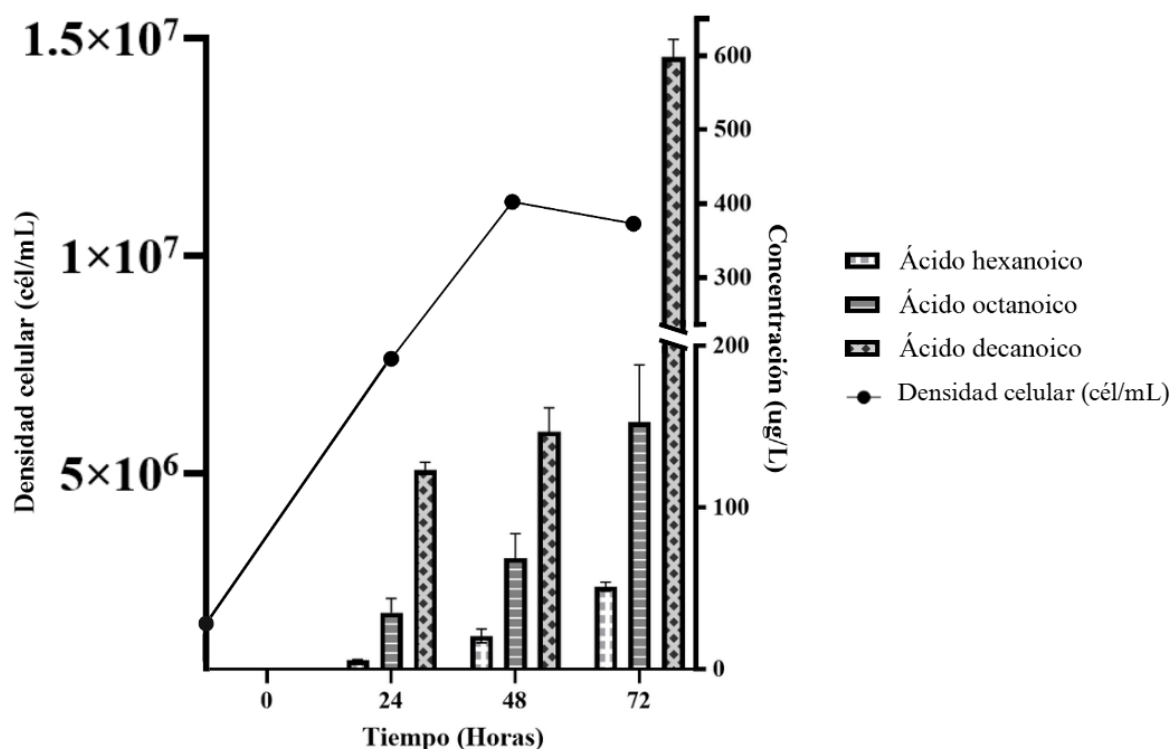


Figura 13. Dinámica de producción de ácidos grasos de cadena media y curva de crecimiento celular de *H. vineae* M12/196F durante la fermentación.

Ninguno de estos compuestos supera el umbral de percepción por lo que no afectarían negativamente a los aromas en este punto.

Teniendo en cuenta los compuestos que superaron el umbral de percepción, en este fermentado se debe de percibir aroma floral, a rosas, frutado y miel; aromas buscados en vinos blancos y vinos de maceración carbónica [43] [41].

2. Estudio del efecto de compuestos bioactivos producidos por *H.vineae* M12/196F en concentraciones fisiológicas (correspondientes a las primeras 72 horas de fermentación) sobre la cinética de crecimiento de cepas de *Hanseniaspora* y de *Saccharomyces*. Identificación de moléculas con potencial *quorum sensing*

Se evaluó el impacto de los compuestos bioactivos con sus diferentes concentraciones mencionados en el punto anterior en el crecimiento de distintas cepas de levadura. A través de este análisis, se determinó si la presencia de los compuestos favorece, inhibe o no altera el crecimiento de las levaduras evaluadas.

Los parámetros de crecimiento analizados fueron el tiempo máximo, el tiempo de duplicación, duración de la fase de latencia y la velocidad de crecimiento explicados en el **Punto 2.2.3** de Metodología.

La combinación de estos parámetros permite evaluar de manera integral el impacto de un compuesto en el crecimiento de las levaduras, de modo que, según los valores obtenidos y su tendencia general, se puede concluir si dicho compuesto favorece, inhibe o no tiene un efecto significativo sobre la proliferación celular a grandes rasgos. Las gráficas que se presentan a continuación evalúan estos parámetros con el criterio explicado en el **punto 2.2.3** de Metodología y el desarrollo de sus valores en el **Anexo 6**.

Alcohol 2-feniletílico

En *S.cerevisiae* este alcohol está reportado como QSM cuando hay poco nitrógeno en el medio [69]. En general se ve que afecta positivamente el crecimiento de estas cepas, **Figura 14a**. Estas son buenas productoras de alcoholes superiores, por lo que su presencia en el medio parece indicar un metabolismo funcional.

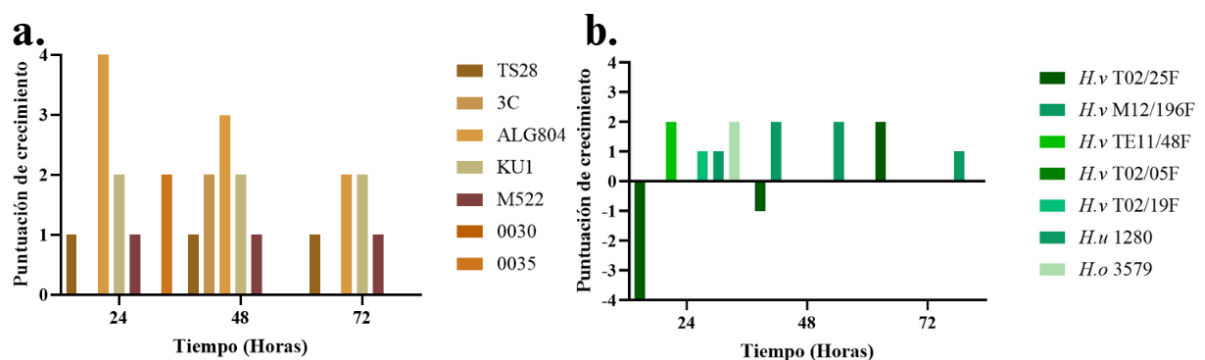


Figura 14. Efecto del alcohol 2-feniletílico en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* **a.** y **b.** *Hanseniaspora spp* según sistema de puntuación diseñado.

En contraste, las *Hanseniasporas*, **Figura 14b**, parece ser menos eficiente en la síntesis de alcoholes superiores, lo que podría hacer que el alcohol 2-feniletílico actúe como un factor de estrés en lugar de un promotor del crecimiento. La inhibición severa de la cepa T02/25F sugiere una sensibilidad específica, probablemente debida a diferencias en la estructura de su membrana celular o en la regulación de genes involucrados en la detoxificación de compuestos aromáticos.

Acetato 2-feniletílico

En todas las cepas de *S. cerevisiae* la exposición a la concentración de las 24 horas muestra un crecimiento favorecido moderado, lo que indica un efecto positivo generalizado en la fase inicial del crecimiento. Sin embargo, a las 48 horas, menos cepas muestran este beneficio, ya sea de igual manera o moderado. Lo que sugiere que el compuesto podría ser metabolizado o que su impacto positivo disminuye con el tiempo. No obstante, la cepa KU1 es una excepción, ya que sigue viéndose favorecida hasta alcanzar un puntaje máximo, lo que podría indicar una mayor eficiencia en la asimilación o tolerancia del compuesto. A las 72 horas, la tendencia se mantiene con una disminución del efecto positivo en la mayoría de las cepas, pero esta vez la cepa 3C muestra un mayor beneficio, sugiriendo que diferentes cepas pueden expresar mecanismos diferenciales de adaptación a la presencia prolongada del éster en el medio.

Por otro lado, las *Hanseniasporas* solo presentan tres cepas con un crecimiento favorecido por la presencia del acetato, siendo la más beneficiada *H. osmophila*. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración y el tiempo de exposición, el efecto positivo en esta cepa disminuye, lo que indica que el compuesto podría estar generando un efecto tóxico o limitante en concentraciones más elevadas. Esto podría estar relacionado con la menor capacidad de *H. vineae* para metabolizar ésteres en comparación con *S. cerevisiae*, lo que llevaría a una acumulación del compuesto en el medio y, en consecuencia, a una reducción del crecimiento celular.

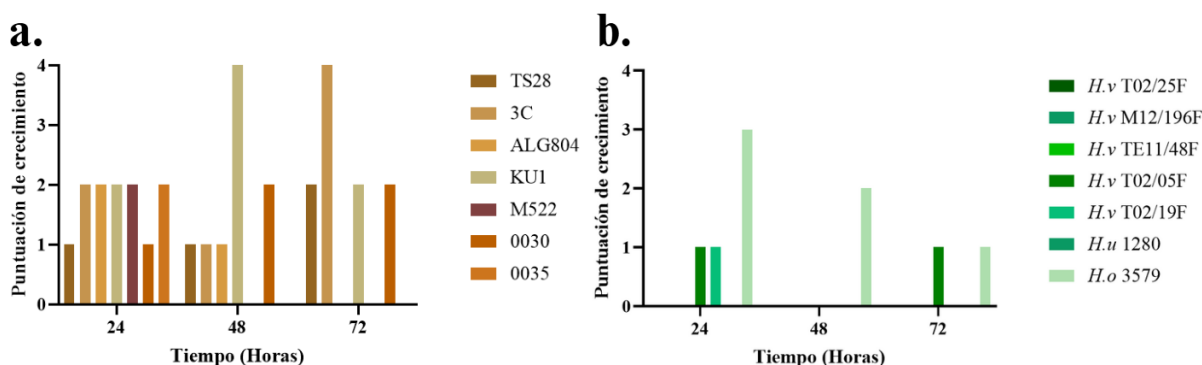


Figura 15. Efecto del acetato 2-feniletílico en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* **a.** y **b.** *Hanseniaspora spp.* según sistema de puntuación diseñado.

Posiblemente este acetato producido por *H.vineae* M12/196F es positivo para el crecimiento *S.cerevisiae*, por lo que esta estaría produciendo el alcohol 2-feniletílico muy eficientemente, este es el precursor de este acetato, de manera que *H.vineae* M12/196F lo acetile y así obtener este compuesto que lo beneficia en su crecimiento; dando lugar a una interacción sinérgica entre ambas levaduras donde ambas se ven beneficiadas [101].

Tirosol

Esta identificado como QSM en *S.cerevisiae* y se produce bajo determinada densidad celular. Además de ser muy eficiente para su producción [53]. Beneficia el crecimiento de manera moderada y equitativa entre todas las concentraciones a grandes rasgos, aunque con la concentración de las 72 horas las cepas 3C y TS28 muestran un crecimiento más favorecido.

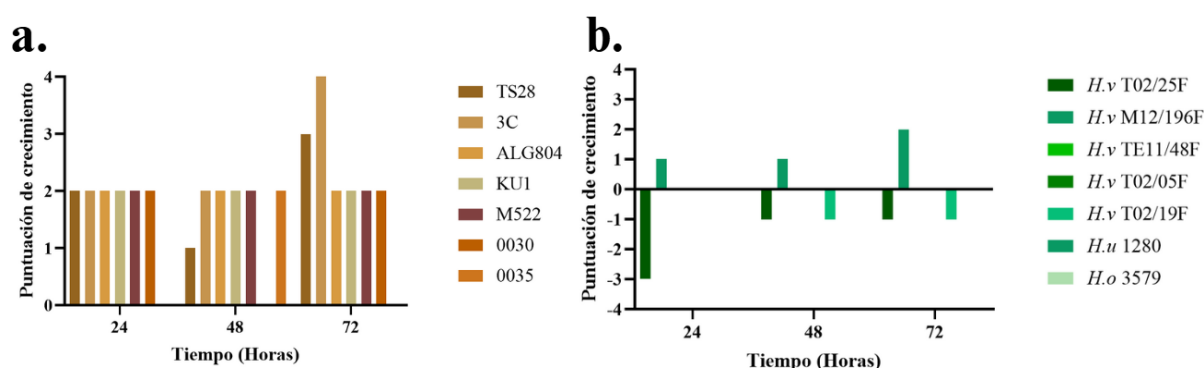


Figura 16. Efecto del tirosol en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* a. y b. *Hanseniaspora* spp. según el sistema de puntuación diseñado.

En las cepas de *Hanseniaspora*, se ve una tendencia a que no ayude al crecimiento o lo haga levemente. Esto indica que la capacidad de este género para asimilar este alcohol aromático es más limitada en comparación con *S. cerevisiae*, lo que puede estar relacionado con una menor eficiencia en la regulación de la ruta de Ehrlich o con diferencias en la estructura de la membrana celular que hacen que el compuesto no sea tan beneficioso [102]. Sin embargo, la cepa T02/25F muestra una marcada inhibición de hasta -3 puntos, similar a la inhibición observada con el alcohol 2-feniletílico. Esto sugiere que esta cepa tiene una sensibilidad particular a los alcoholes aromáticos, lo que la llevaría a producir el acetato 2-feniletílico por el que se caracteriza [58].

Acetato de tirosol

En *S. cerevisiae*, se ve una respuesta generalizada de ayudar muy poco o negativamente el crecimiento, por lo que no todas las cepas pueden metabolizarlo o utilizarlo con la misma eficiencia. A las 48 horas, la respuesta se vuelve más heterogénea, lo que sugiere que el compuesto podría estarse acumulando o generando un efecto negativo en el metabolismo de algunas.

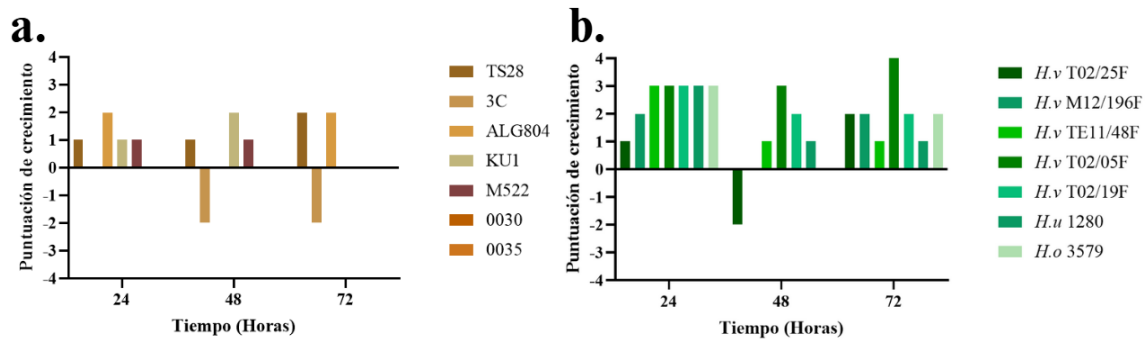


Figura 17. Efecto del acetato de tirosol en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* **a.** y **b.** *Hanseniaspora spp* según sistema de puntuación diseñado.

Las cepas de *Hanseniasporas* muestran el mismo patrón observado con el acetato de tirosol es el opuesto al de su correspondiente alcohol, lo que coincide con la capacidad de acetilación de este género ya que la mayoría de las cepas se ven beneficiadas (a excepción de T02/25F).

Triptofol

Este alcohol favorece claramente a varias cepas de *S. cerevisiae* de manera diferenciada a lo largo del tiempo, pero en mayor medida a en las primeras 24 horas, siendo KU1 y M522 las que sugieren tener una mayor capacidad para aprovecharlo el triptofol a largo plazo.

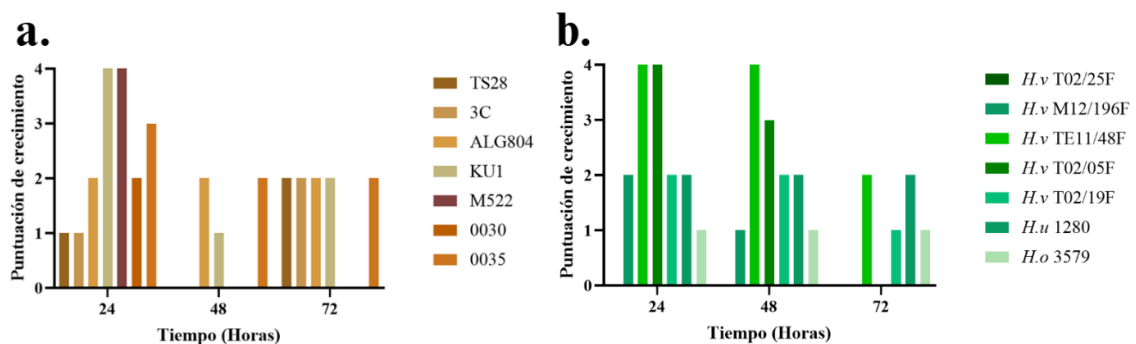


Figura 18. Efecto del triptofol en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* **a.** y **b.** *Hanseniaspora spp* según sistema de puntuación diseñado.

El comportamiento del triptofol en cepas *Hanseniasporas* muestra una respuesta más variada en comparación con otros alcoholes aromáticos evaluados anteriormente, lo que indica que, si bien esta especie generalmente presenta una menor capacidad para metabolizar estos compuestos en comparación con *S. cerevisiae* [82]. Inclusive la cepa T02/25M no se vio afectada (aunque tampoco beneficiada) a diferencia de su respuesta negativa ante otros alcoholes.

Acetato de triptofol

Los resultados obtenidos muestran una clara disminución en el beneficio en comparación a su alcohol tanto para las cepas de *S.cerevisiae*, las cuales son beneficiadas en menor medida e incluso a mayores concentraciones son afectadas, como las *Hanseniasporas* donde el efecto se ve más claramente también disminuir su crecimiento, pero incluso verse afectadas negativamente.

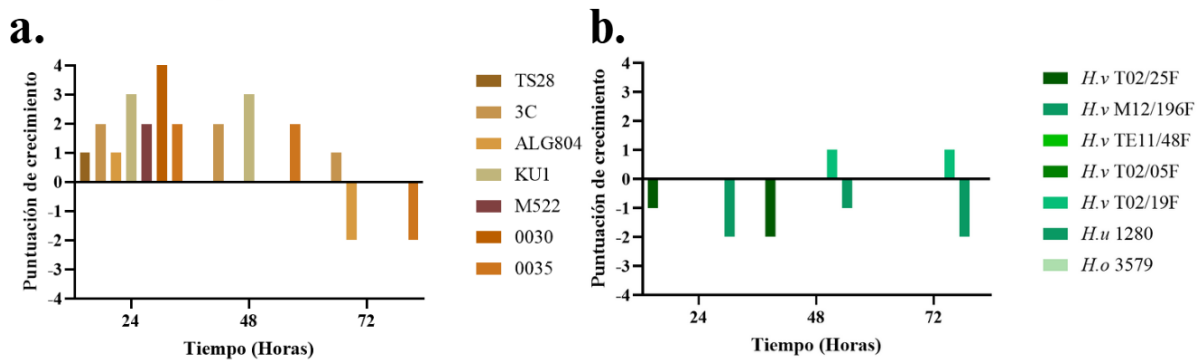


Figura 19. Efecto del acetato de triptofol en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* a. y b. *Hanseniaspora* spp. según sistema de puntuación diseñado.

Comparando estos resultados con el triptofol, se observa que el alcohol tuvo un efecto mucho más positivo en las cepas de *Hanseniaspora*. La conversión del triptofol a su forma acetilada parece reducir su impacto positivo en esta especie; puede que la acumulación del compuesto acetilado muy eficientemente podría generar estrés celular o compuesto cause una inhibición como lo registrado para bacterias por [103]; aunque sea parte de su metabolismo.

Alcohol bencílico

Los efectos del alcohol bencílico en el crecimiento de *S. cerevisiae* y las *Hanseniasporas* presentan una tendencia distinta similar al del triptofol beneficiándose ambas; aunque algunas cepas de *Hanseniaspora* se ve más favorecidas que *S. cerevisiae*, inclusive *H.uvarum* y *H. osmophila* que en [82] presentaron menor producción de este compuesto en comparación de *H.vineae*; esto puede deberse a la capacidad de *H.vineae* de producir este alcohol por lo que debe poder tolerarlo mejor.

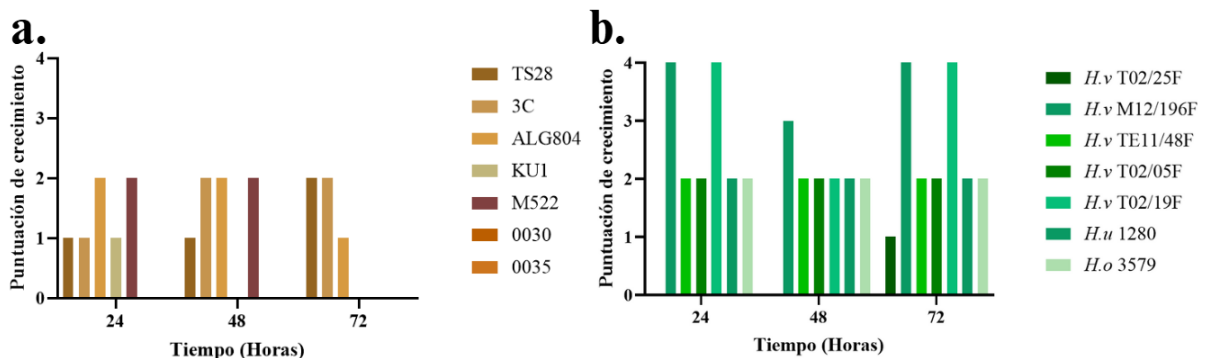


Figura 20. Efecto del alcohol bencílico en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* **a.** y **b.** *Hanseniaspora spp.*, según sistema de puntuación diseñado.

Dado que *H. vineae* generalmente presenta una menor capacidad para metabolizar alcoholes aromáticos, sería esperable que la acumulación de alcohol bencílico en el medio resultara en un efecto inhibitorio, como ocurre con otros alcoholes en esta especie. Sin embargo, su efecto positivo sugiere que puede estar desempeñando un papel distinto, ya sea actuando como un modulador de la membrana celular, afectando indirectamente la regulación de la expresión génica en estas cepas.

Ácido hexanoico

Mostró un efecto notablemente negativo en *S.cerevisiae*, con una mayor inhibición observada en la concentración de 48 horas, lo que indica que este compuesto no solo afecta el crecimiento celular, sino que su toxicidad se incrementa al aumentar la concentración [104]. El efecto negativo puede deberse a que al ser poco lipofílico no es capaz de atravesar la membrana, acumulándose en el exterior de manera similar a lo reportado para el ácido octanoico [105]. En procesos fermentativos, la presencia de ácidos grasos volátiles en altas concentraciones se asocia con efectos negativos en la producción de biomasa y en la viabilidad celular, pero en este estudio se trabajaron con concentraciones tan pequeñas que no se considera que sea altamente tóxico.

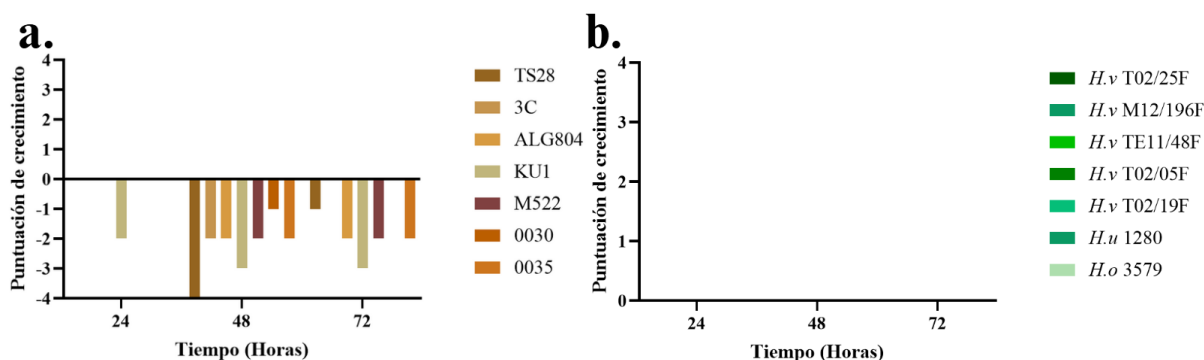


Figura 21. Efecto del ácido hexanoico en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* **a.** y **b.** *Hanseniaspora spp.*, según sistema de puntuación diseñado.

Observando a las cepas de *Hanseniaspora* se ve que no tuvo un impacto significativo en su crecimiento. Estos resultados sugieren una diferencia importante en la tolerancia de estas especies a ácidos grasos de cadena corta, lo que puede estar relacionado con diferencias en la composición y estabilidad de la membrana celular, posiblemente no le afecte que se acumule en el exterior; así como se podría intuir una diferente capacidad de detoxificación de compuestos lipofílicos entre géneros.

Ácido octanoico

En *S. cerevisiae*, mostró un efecto positivo en varias cepas a lo largo del tiempo de manera moderada en contraste con el ácido hexanoico, que las afectó negativamente. En cuanto al metabolismo, está reportado que *S. cerevisiae*, es capaz de difundir un poco de este ácido a través de su membrana pero vuelve a salir en forma disociada pues tiene afinidad a detoxificarla, el resto se acumula en la membrana citoplasmática [105].

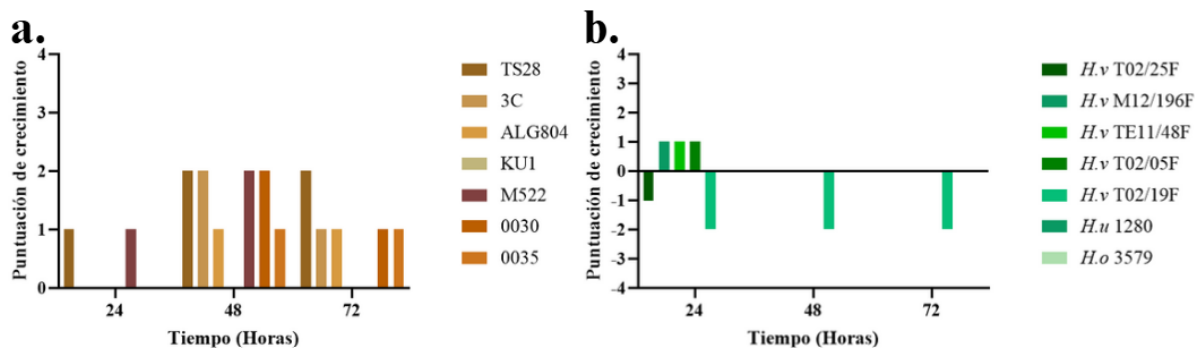


Figura 22. Efecto del ácido octanoico en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* **a.** y **b.** *Hanseniaspora* spp., según sistema de puntuación diseñado.

La respuesta diferencial de *Hanseniasporas* puede deberse a que no presente esta capacidad de detoxificación.

Ácido decanoico

La tendencia vista en los dos ácidos anteriores se repite para este, las cepas de *S. cerevisiae* se ven mayormente beneficiadas, especialmente para la concentración de las 24 horas; mientras que se hizo más notorio que no favorece al crecimiento de las *Hanseniasporas*. El ácido decanoico (C10:0) tiene una cadena más larga que los ácidos hexanoico (C6:0) y octanoico (C8:0), lo que lo hace más lipofílico y le permite integrarse más por difusión pasiva en membranas celulares de varias cepas de *S. cerevisiae* [106], no así en el caso de las *Hanseniasporas*.

Esta fuerte respuesta positiva en varias cepas sugiere que *S. cerevisiae* es capaz de asimilar y metabolizar eficientemente el ácido decanoico, posiblemente utilizándolo en vías de síntesis de lípidos de membrana [106] de manera que no se acumula en el citoplasma y no llega a concentraciones que resulten tóxicas.

En contraste las cepas de *Hanseniaspora* muestran una inhibición generalizada que sugiere no pueden metabolizarlo eficientemente, y que su acumulación a tan bajas concentraciones en el interior celular ya podría estar generando efectos tóxicos, como alteraciones en la fluidez de la membrana o interferencia con rutas metabólicas esenciales. Todas las cepas de *H.vineae* suelen producir ácidos en mucha menor proporción que las *S.cerevisiae*[82], por lo que tiene sentido que les afecte más.

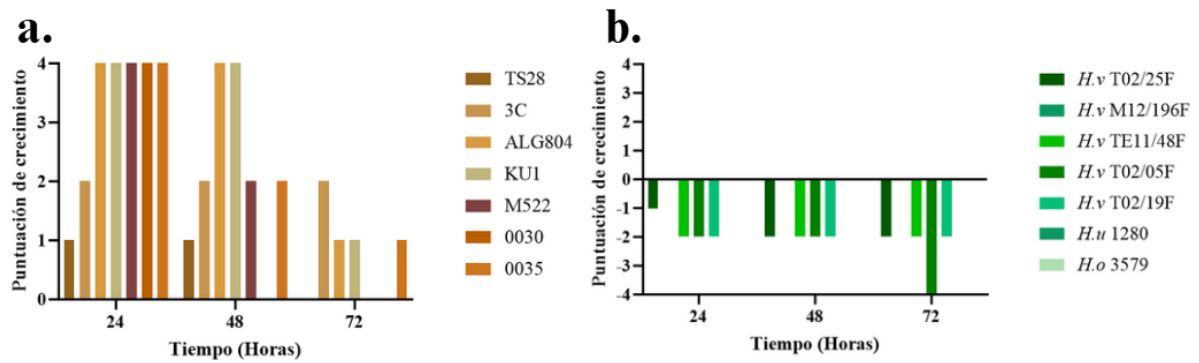


Figura 23. Efecto del ácido decanoico en concentraciones producidas a las 24, 48 y 72 horas de fermentación de *H.vineae* M12/196F en el crecimiento de distintas cepas de *S.cerevisiae* **a.** y **b.** *Hanseniaspora* *ssp.* según sistema de puntuación diseñado.

Parecería que a mayor cantidad de carbonos en los ácidos y por lo tanto ser más lipofílicos, tienen mayor capacidad de entrar a la membrana, Entre ambas especies estaría variando la capacidad de metabolizarlos o como les afecta su acumulación tanto dentro como fuera del citoplasma. no metabolizados. resultados son consistentes con la hipótesis de que los ácidos grasos de cadena media pueden generar toxicidad en levaduras con una menor capacidad de metabolización lipídica, como *H. vineae*. Su estructura de membrana podría no estar adaptada para incorporar estos compuestos sin sufrir alteraciones, lo que explicaría por qué su acumulación genera un efecto tóxico progresivo en esta especie. Al entrar a la célula el ácido se disociaría, liberando protones que acidifican el citoplasma y afectan procesos metabólicos esenciales, incluyendo la producción de ATP y el mantenimiento del gradiente de protones necesario para la respiración celular [106].

En base a estos estudios sobre el crecimiento, para los estudios de fermentación se decidió seguir con la concentración de acetato 2-feniletilo producida a las 24 horas por *H.vineae* M12/196F (252,57 µg/L), la concentración de triptofol producida a las 24 horas (33,25 µg/L), ambas por contribuir positivamente al crecimiento de las cepas de *S.cerevisiae*; mientras que como contraparte que desfavorezca el crecimiento se siguió estudiando al ácido hexanoico producido a las 48 horas (28,42 µg/L).

3. Estudiar el efecto de compuestos bioactivos producidos por *H.vineae* M12/196F en concentraciones fisiológicas sobre la cinética fermentativa y producción de aromas de una cepa seleccionada por su compatibilidad con *S.cerevisiae*

3.1. Elección de cepa de *S.cerevisiae* a utilizar

La selección de las cepas de levaduras y la estrategia de inoculación juegan un papel clave en la modulación del perfil aromático durante la fermentación. Se siguió utilizando la cepa *H. vineae* M12/196F como levadura no-*Saccharomyces*, pero era necesario

encontrar a su contraparte *Saccharomyces*. Para determinar cuál era la cepa más adecuada se evaluó el crecimiento de varias en un medio previamente fermentado por *H. vineae* M12/196F. Este medio fue empleado para cultivar las cepas de *S. cerevisiae* en un lector de placas, permitiendo analizar sus parámetros de crecimiento como se hizo en la sección anterior. Entre las cepas evaluadas, *S. cerevisiae* TS28 mostró el mejor desempeño a lo largo del tiempo, por lo que fue seleccionada para los ensayos posteriores.

3.2. Compuestos identificados

Las micro-fermentaciones de *S. cerevisiae* TS28 a las que se le agregaron los compuestos seleccionados como posibles moléculas de *quorum sensing* fueron analizadas para determinar los productos obtenidos al día 10 al igual que la dinámica poblacional a lo largo del tiempo, las concentraciones se muestran en la **Tabla 6**. Se compararon las concentraciones producidas por cada tratamiento con las de la fermentación de *S. cerevisiae* TS28 sola, como control.

La adición exógena de acetato de 2-feniletilo y triptofol mostró un efecto modulador positivo sobre la producción de varios compuestos de interés en la fermentación, particularmente favoreciendo la síntesis de alcoholes de cadena larga como el 1-heptanol y del diol 2,3-butanodiol, además de estimular la formación de ácidos grasos de cadena media y larga como el ácido octanoico y decanoico [34]. Estos resultados sugieren que ambos compuestos podrían estar activando rutas metabólicas asociadas al aumento de la complejidad aromática del vino. Sin embargo, también se observó una inhibición parcial en la formación de ciertos alcoholes superiores, como el isobutílico y el isoamílico, lo que indica un efecto específico sobre distintas rutas del metabolismo de aminoácidos.

Por otro lado, el ácido hexanoico tuvo un efecto más restrictivo sobre la producción de compuestos deseables. Aunque en algunos casos promovió levemente la síntesis de ciertos alcoholes y ácidos, en general tendió a reducir la producción de metabolitos volátiles clave, como el ácido decanoico y el ácido octanoico, además de inhibir parcialmente la formación de alcoholes superiores. Estos resultados indican que su presencia podría generar una condición de estrés que fuerza una mayor eficiencia fermentativa (como se observó en la producción de CO₂), pero a costa de una menor diversificación aromática.

En conjunto, se concluye que el acetato de 2-feniletilo y el triptofol actúan como moduladores positivos del perfil aromático, mientras que el ácido hexanoico, aunque puede estimular la fermentación, tiende a restringir la producción de compuestos aromáticos complejos, lo que debe tenerse en cuenta al momento de diseñar estrategias de cultivo mixto o uso de aditivos.

Tabla 6. Concentraciones de compuestos volátiles de mostos Ugni Blanc con agregado de compuestos seleccionados; fermentado con *S. cerevisiae* TS28. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar, las letras diferentes corresponden a valores significativamente distintos según el método LSD de Fisher.

	Compuesto ($\mu\text{g/L}$)	<i>S.c</i>	<i>S.c</i> + acetato 2- feniletilo	<i>S.c</i> + triptofol	<i>S.c</i> + ácido hexanoico
Alcoholes	Alcohol isobutilico	3633,4 \pm 206,1 ^{b,c}	3078,4 \pm 486,1 ^{a,b}	2966,1 \pm 332,3 ^a	3905,9 \pm 386,7 ^c
	Alcohol isoamílico	75669,9 \pm 919,7	74276,3 \pm 9802,1	71028,1 \pm 1112,8	74601,1 \pm 9090,7
	1-heptanol	551,8 \pm 45,5	560,7 \pm 99,0	619,4 \pm 68,5	574,3 \pm 87,2
	2,3-butanodiol	559,9 \pm 196,7 ^b	1068,2 \pm 183,3 ^a	1184,4 \pm 250,8 ^a	896,2 \pm 49,1 ^{a,b}
	Metionol	1271,9 \pm 143,8	1261,9 \pm 233,4	1209,2 \pm 213,7	1134,4 \pm 159,5
	Alcohol 2-feniletílico	22109,5 \pm 1911,9	22808,1 \pm 282,5	23464,2 \pm 3763,4	22460,5 \pm 4576,3
	Tirosol	3292,5 \pm 553,1	3457,0 \pm 722,1	3414,6 \pm 562,9	2751,8 \pm 117,7
	Triptofol	1303,3 \pm 558,1	1635,9 \pm 631,8	1016,1 \pm 471,9	984,7 \pm 335,4
Ésteres	4-hidroxi-butanona to de etilo	3016,6 \pm 400,6	3975,8 \pm 664,6	3011,9 \pm 465,4	2908,6 \pm 329,3
Compuestos carbonílicos	Acetoina	867,9 \pm 180,2	1003,1 \pm 170,0	860,3 \pm 226,4	822,5 \pm 46,9
	4-hidroxi-2-butanona	838,4 \pm 47,6	950,5 \pm 132,1	960,8 \pm 202,1	811,1 \pm 113,7
Ácidos grasos cadena media	de Ácido 2-metilpropanico	252,9 \pm 25,1 ^{a,b}	187,2 \pm 76,6 ^a	383,1 \pm 110,3 ^b	283,9 \pm 17,7 ^{a,b}
	Ácido hexanoico	919,4 \pm 131,1	918,7 \pm 81,6	943,1 \pm 177,6	805,4 \pm 35,5
	Ácido octanoico	2496,1 \pm 219,9	2669,1 \pm 61,4	2672,2 \pm 725,9	2271,6 \pm 30,2
	Ácido decanoico	1070,3 \pm 110,8	1965,3 \pm 14,4	1307,2 \pm 426,4	1105,7 \pm 38,2

En general, los alcoholes superiores y ácidos grasos de cadena media y larga fueron los más afectados, con el 2,3-butanodiol y el ácido decanoico presentando los mayores aumentos en presencia de los aditivos. Además, la tendencia sugiere que triptofol y acetato 2-feniletilo favorecen la síntesis de ciertos compuestos, mientras que el ácido hexanoico tiende a reducir la producción de algunos metabolitos clave.

3.3. Recuento poblacional y cinética fermentativa

Se realizaron recuentos de unidades formadoras de colonias (ufc/mL) en diferentes etapas de la fermentación para observar su posible impacto en la dinámica poblacional de la levadura y seguimiento de la cinética fermentativa.

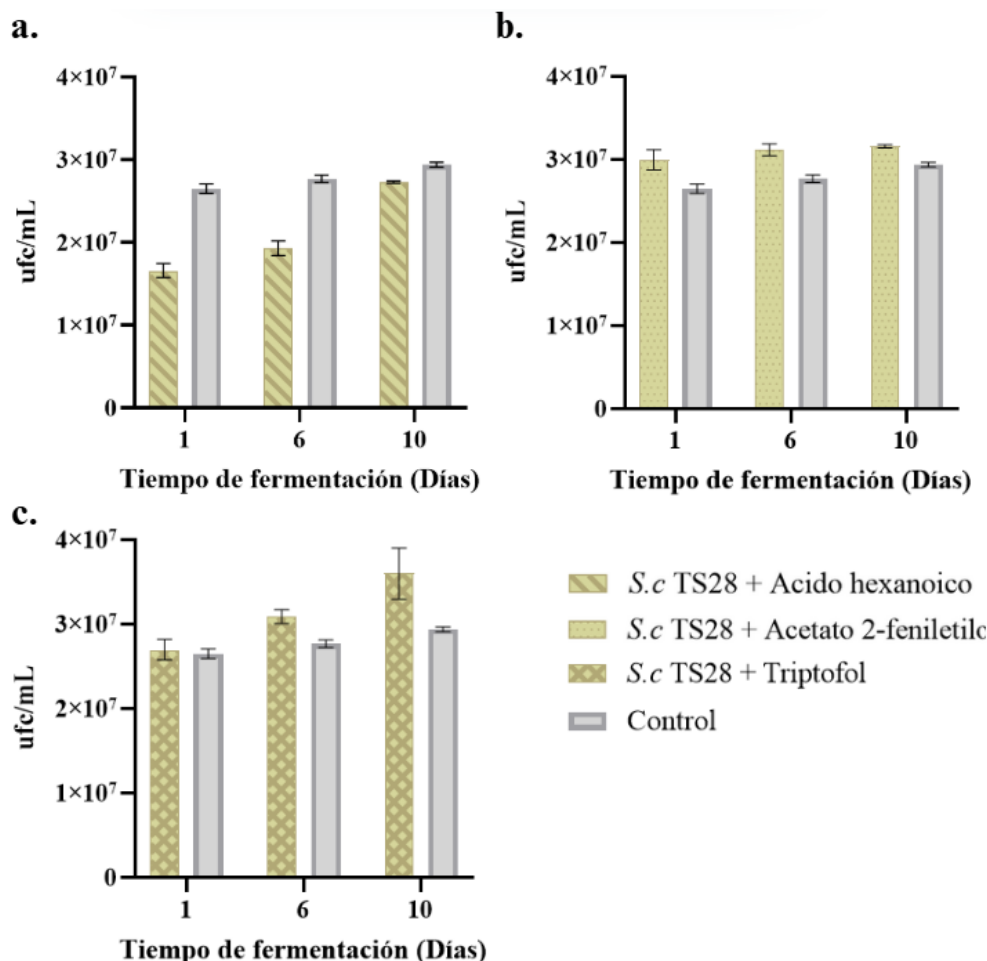


Figura 24. Recuento de colonias de microfermentación de *S.cerevisiae* TS28 a lo largo de la fermentación (un día luego de la inoculación al igual que al día seis y día 10), junto con el recuento de la fermentación de *S.cerevisiae* TS28 sin compuesto (control) **a.** Agregado de ácido hexanoico **b.** Agregado de acetato 2-feniletilo. **c.** Agregado de triptofol.

Si bien la población aumenta en el tiempo, la presencia de ácido hexanoico mostró una notable reducción en la concentración de células viables, (**Figura 24a**). Al primer día la fermentación suplementada con este ácido alcanzó una tasa 37,36% menor la del control, por lo que se puede ver que el efecto es temprano. En el día seis, el crecimiento se mantuvo por debajo del control con la misma tendencia. Para el día 10, la población celular aumentó con respecto a los días anteriores, con una diferencia del 7,14% de ufc/mL con la fermentación sin compuesto. Estos resultados indican que tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* TS28, con el impacto más fuerte en las primeras etapas de la fermentación, aunque su efecto negativo se atenúa a medida que el proceso avanza. Pero por otro lado resultó ser la fermentación que produjo mayor cantidad de CO₂, **Figura 25**, por lo que estaría funcionando como un factor de estrés que fuerza a la levadura a fermentar para producir más energía en vez de replicarse [106].

En presencia de acetato 2-feniletilo hay un incremento en la concentración de células viables en comparación con el control a lo largo de la fermentación (**Figura 24b**),

rondando un promedio de 11% mayor cantidad de ufc/mL en todo momento. La adición de este acetato parece estimular el crecimiento de *S. cerevisiae* TS28, especialmente en las primeras etapas de la fermentación. Sin embargo, a medida que la fermentación avanza, la diferencia en crecimiento con respecto al control disminuye. Esto sugiere que el efecto positivo del compuesto puede ser más pronunciado en la fase exponencial del crecimiento, pero menos relevante a medida que la fermentación se estabiliza y se alcanzan condiciones limitantes. La liberación de CO₂ se mantiene en el rango del control, por lo que solo beneficiaría el crecimiento, **Figura 25**.

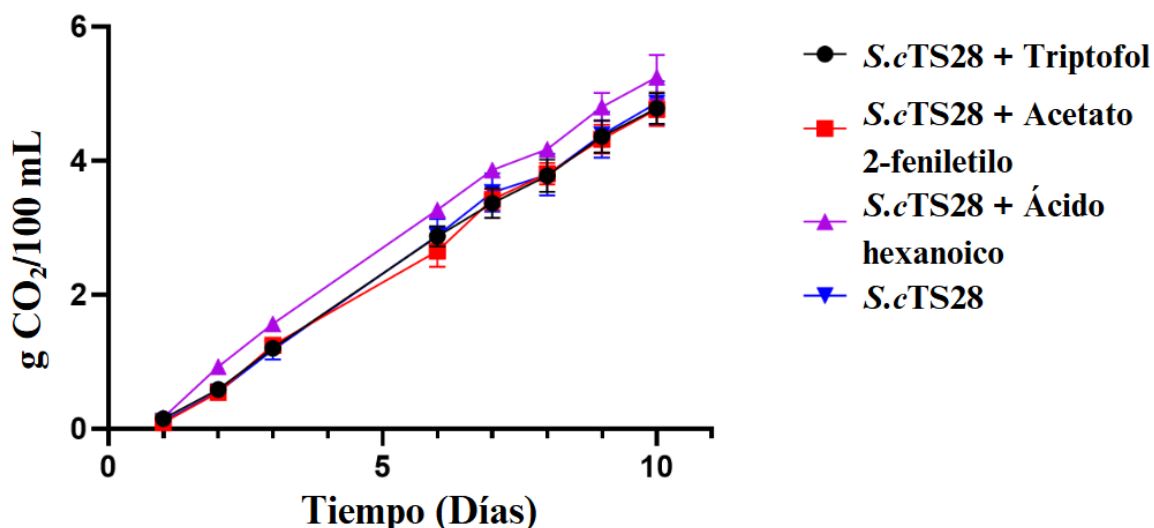


Figura 25. Curva de cinética fermentativa de cada uno de los agregados exógenos a la fermentación.

Ante el triptofol el crecimiento de *S. cerevisiae* TS28 mostró un aumento progresivo en la concentración de células viables en comparación con el control a lo largo de la fermentación (**Figura 24c**); viéndose la diferencia más clara al tercer día de fermentación con una diferencia del 22,45% más ufc/mL que el control. Estos resultados indican que el triptofol promueve el crecimiento de *S. cerevisiae* TS28, con un efecto estimulante que se intensifica a medida que avanza la fermentación. La tendencia sugiere que este compuesto podría estar favoreciendo la actividad metabólica de la levadura, prolongando la fase de crecimiento exponencial y mejorando la viabilidad celular en las últimas etapas del proceso fermentativo. La curva de fermentación tiene la misma tendencia que el acetato 2-feniletilo, queda dentro del rango del control.

Finalizando con la sección de fermentación, tanto el acetato de 2-feniletilo y el triptofol, producidos por *H. vineae* M12/196F a las 24 horas de fermentación, favorecieron tanto el crecimiento de *S. cerevisiae* como la producción de compuestos aromáticos deseables, destacándose como moduladores positivos del perfil sensorial. En cambio, el ácido hexanoico producido a las 48 horas no promovió el crecimiento ni la formación de aromas complejos, aunque su adición exógena estimuló la fermentación. Con esto ya se obtienen indicios de que las 24 horas es el momento en el que la comunicación celular lleva a la producción de aromas agradables y no defectos aromáticos.

4. Presencia de genes

No se logró extraer suficiente ADN como para realizar la secuenciación del genoma de *H.vineae* M12/196F utilizando el kit de extracción enzimática ni siquiera cuando se agregó disgregación mecánica utilizando nitrógeno líquido o sonicando. Esto concuerda con antecedentes del laboratorio, cuando se quiso modificar otras cepas de esta especie y se dificultó acceder al material genético. El protocolo que utiliza fenol:cloroformo para extraer ADN de *S.cerevisiae* mostró una mejor eficiencia al verse bandas más definidas al correr la muestra en gel de agarosa.

El tiempo restante no fue suficiente para realizar la secuenciación y analizar su cantidad de copias de genes reportados por estar involucrados en las rutas metabólicas de producción de los compuestos aromático estudiados, como ARO80 que regula la ruta de Ehrlich, promoviendo la biosíntesis de estos alcoholes; además de la regulación del crecimiento filamentoso y la adhesión celular por los genes Flo8 y Tpk2, relacionados con el QS en *S.cerevisiae* [81].

Aunque esto no se pudo estudiar en la cepa *H.vineae* M12/196F que fue la principalmente utilizada; si se buscaron copias de estos genes en otras cepas también mencionadas en este estudio y con las que se cuenta con el genoma secuenciado, *H.vineae* T02/05AF y *H.vineae* T02/19AF. Para determinar la presencia y el número de copias de los genes se realizó un análisis de alineamiento utilizando la herramienta BLAST del NIH [107] con los genomas de las cepas. Se observó que *H.vineae* T02/05AF tiene una copia de Tpk2, una de ARO80 y ninguna de Flo8. Mientras que *H.vineae* T02/19AF tiene dos copias de Tpk2, una de ARO80 e igualmente ninguna de Flo8. Si bien no se puede asegurar cuantas copias tendrá *H.vineae* M12/196F pues se ha demostrado que las distintas cepas se comportan y producen compuestos de manera diferente [82] pero se puede hipotetizar que será similar.

5. Evaluación del impacto de diferentes estrategias de inoculación en el aroma del vino, identificando la que proporcione el mejor balance entre producción de etanol, intensidad y complejidad aromática

5.1. Caracterización fisicoquímica del mosto y vino

Para caracterizaron las fermentaciones para comprender mejor su desarrollo, así como determinar el contenido del mosto de uva Ugni Blanc para tener valores de partida. Inicialmente se analizó el contenido de azúcar utilizando el equipo de Anton Parr y correlacionando la densidad por la tabla se 204 g/L de azúcar y 12,0 % de alcohol probable. Se determinaron varios parámetros necesarios para los vinos de calidad, **Tabla**

5. La determinación inicial del nitrógeno en el mosto de 120 mg/L, el suficiente para que no haya deficiencia en la fermentación.

La curva de calibración de tanto de la curva de calibración de la glucosa como de la fructosa tenían un máximo de 50 g/L, si bien este valor es mayor al esperado en un vino terminado (2-5 g/L), no tiene porque serlo para un mosto fermentando y menos aún para un jugo de uva. Por lo que el dato inicial del azúcar total será en base al medido con el equipo de Anton Parr.

Tabla 5. Concentración media \pm desviación estándar de los principales parámetros de control de calidad de los vinos, a los 10 días de fermentación por HPLC.

Muestra	Etanol (%v/v)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Azúcar total (g/L)	Azúcar residual (%)
Co- inoculación 0 horas	8,6 \pm 1,3	7,7 \pm 2,2	27,1 \pm 0,8	34,7	17,00
Inoculación <i>S.c TS28</i> a las 24 horas	7,1 \pm 0,1	20,7 \pm 2,2	43,0 \pm 4,9	63,79	31,36
Inoculación <i>S.c TS28</i> a las 48 horas	6,8 \pm 1,3	29,3 \pm 7,7	56,1 \pm 8,1	86,23	42,26
Inoculación <i>S.c TS28</i> a las 72 horas	6,3 \pm 0,1	34,1 \pm 0,9	64,8 \pm 1,0	98,97	48,51

En todos los experimentos sucedió que no se llegó a los 12% v/v de etanol esperados por la concentración de azúcar inicial ni el exigido por la normativa para que sea un vino de calidad preferente.

Esto se relaciona con que, si bien en todos los casos el consumo de glucosa es mayor que el de fructosa, lo cual es esperable ya que estas levaduras prefieren al primero para la glicolisis [36], ninguno llega al 2-5% de azúcar residual que exige la normativa, especialmente el tipo de vino hecho con Ugni Blanc debería ser un vino seco, o sea con poco contenido de azúcar. Este alto nivel de azúcar no es deseado porque puede causar un desequilibrio en la estabilidad fisicoquímica del producto.

Estos parámetros no reflejan las características que exige la normativa pero hay que tener en cuenta que el experimento se detuvo al día 10 con la intención de estudiar los aromas que es el principal objetivo de este trabajo, no se esperó a que la fermentación finalizara para evitar la aparición de compuestos indeseados pero que conlleva que el azúcar y el etanol presentes no reflejen lo que podría llegar a ser si se hubieran dejado fermentando hasta depletar completamente los azúcares.

Por otro lado, es necesario tener en cuenta que este es un experimento a escala laboratorio, en un matraz de vidrio y con agitación mínima una vez al día. No refleja exactamente lo que sucede en la bodega, donde se manejan mayores volúmenes, se tienen reactores de acero inoxidable y la misma fermentación crea burbujas que permiten un mayor intercambio gaseoso, además de los remontados que se realizan. Por esto no se puede decir que esto sucedería a escala industrial, pero si puede dar una perspectiva del proceso.

5.2. Determinación de cinética fermentativa y recuento de levaduras en placa

Para los estudios de cinética de fermentación se realizaron micro-fermentaciones en jugo de uva Ugni Blanc, que se dieron por finalizadas el día 10. En la **Figura 26** se presenta la cinética de cada una de las fermentaciones, todas comenzaron con *H.vineae* M12/196F y *S.cerevisiae* TS28 siendo inoculada en diferentes momentos por triplicado; una co-inoculación a las 0 horas junto con *H.vineae* M12/196F, otra a las 24 horas, a las 48 horas y una más a las 72 horas.

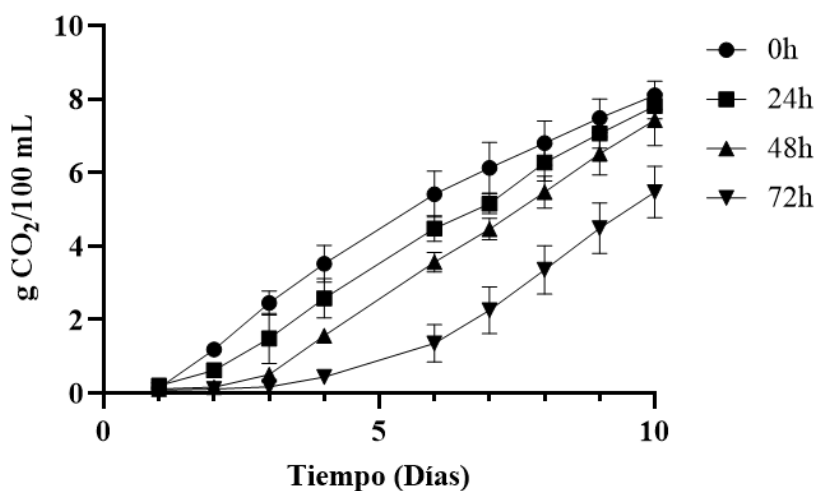


Figura 26. Cinética de micro-fermentaciones para distintos tiempos de inoculación de *S.cerevisiae* TS28 a *H.vineae* M12/196F.

La muestra tomada a las 0 horas presentó la mayor producción de CO₂, lo que sugiere que la fermentación fue más eficiente en esta condición. Esto puede atribuirse a la temprana presencia de *S. cerevisiae* TS28, que como ya se ha mencionado tiene una alta capacidad fermentativa. Dado que *S. cerevisiae* es más eficiente en la conversión de azúcares en etanol y CO₂, su inoculación temprana favorece una mayor producción de este gas. Por el contrario, cuando la fermentación comienza con *H.vineae* M12/196F, esta consume los

azúcares y nitrógeno del medio; cuando más se retrase la inoculación de *S. cerevisiae* TS28 menos fuentes de energía encuentra en el medio [99]; esta competencia por los nutrientes hace que la fermentación se enlentezca y sea menos eficiente. A su vez, la fase de latencia de la no-*Saccharomyces* es más prologada, el agregado de *S. cerevisiae* TS28 al medio aumenta la velocidad de fermentación [77].

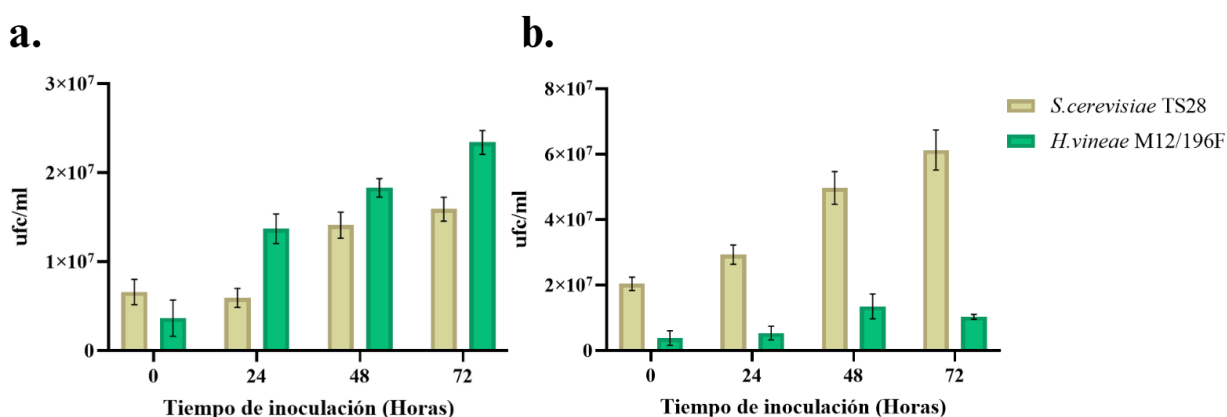


Figura 27. Recuento de colonias para la co-inoculación, y las inoculaciones secuenciales a las 24, 48 y 72 horas. **a.** un día luego de la inoculación de *S. cerevisiae* TS28 **b.** a la mitad de la fermentación.

En cuanto a la dinámica poblacional, al día siguiente de incorporar *Saccharomyces* al medio, **Figura 27a**, se observa que en la co-inoculación *S. cerevisiae* TS28 se encuentra en mayor cantidad que *H. vineae* M12/196F, posiblemente porque ya comenzó a aventajarle y consumir más los nutrientes del medio; aunque esta es la excepción ya que en las inoculaciones secuenciales *H. vineae* M12/196F es la mayoritaria ya que ha tenido más tiempo por desarrollarse sin competencia [75]. Al hacer el seguimiento a la mitad de la fermentación, **Figura 27b**, que los roles se han invertido y *S. cerevisiae* TS28 impuso en el medio como era esperado, no solo por su capacidad de consumir azúcares y captar nitrógeno más eficientemente, sino porque también el alcohol producido por ella será su estrategia para eliminar a la competencia, en este caso *H. vineae* M12/196F [54].

5.3. Identificación y cuantificación de compuestos durante la fermentación mixta

De igual manera que en ensayos anteriores, los compuestos identificados al día 10 se clasificaron en grupos descriptos a continuación; estos se observan en la **Figura 28**.

Alcoholes superiores

El alcohol que se encontró en mayor proporción es el alcohol isoamílico, específicamente a las 24 horas de inocular *S. cerevisiae* TS28, pasando levemente su umbral de percepción de 40.000 µg/L, por lo que podría ser perceptible un leve aroma frutal y alcohólico. De igual manera la mayor producción del alcohol 2-feniletílico se da la inoculación de las 24 horas, pero también a las 48 horas, en ambos casos superan el umbral de 10.000 µg/L por lo que se percibirían aromas a rosas, talco y miel.

Por otro lado, el tirosol presenta una concentración similar en las inoculaciones las secuenciales, solo se obtiene menos en el caso de la co-inoculación. Igualmente esta concentración es mayor a la producida por la fermentación de *H.vineae* en solitario, por lo que sería *S.cerevisiae* la responsable de la producción [53]. Mientras que el alcohol isobutílico no llega al umbral de percepción.

Finalmente, el triptofol es el que presenta menor concentración en todos los casos al igual que en la fermentación de *H.vineae* M12/196F, y aunque eran experimentos diferentes, al igual que en ese caso lo curioso sucede a las 48 horas (**Punto 1.2**). Al fermentar *H.vineae* M12/196F por si sola, la máxima concentración de este alcohol se lograba al segundo día de fermentación (258,72 µg/L) para luego descender abruptamente (15,56 µg/L); pero en la fermentación mixta al agregar *Saccharomyces* en ese momento se logra que la producción de final al día 10 sean la menor de todos los casos.

En todos los casos, a medida que la inoculación secuencial era más tardía se ve el incremento en la concentración de alcoholes, específicamente en la inoculación de las 24 horas al final del experimento [108].

Cetonas

Por otro lado, la acetoina, con un aroma mantecoso, y su forma reducida el 2,3 butanoidiol, descrito como dulce y alcohólico; son poco olorosos. En las fermentaciones las levaduras “fuertes” se producen ambos, mientras que las débiles solo aparece la acetoina [109]. Esto sucedió en las fermentaciones con *H.vineae* M12/196F donde solo se vio producción de acetoina; al igual que otras levaduras apiculadas como *H.guilliermondii* [109]. Mientras que la *S.cerevisiae* produce muy poco, más bien la consume [110]. No influirían directamente en el aroma, pero si puede indicar como es la convivencia entre levaduras en el medio y puede ser precursor de otros aromas.

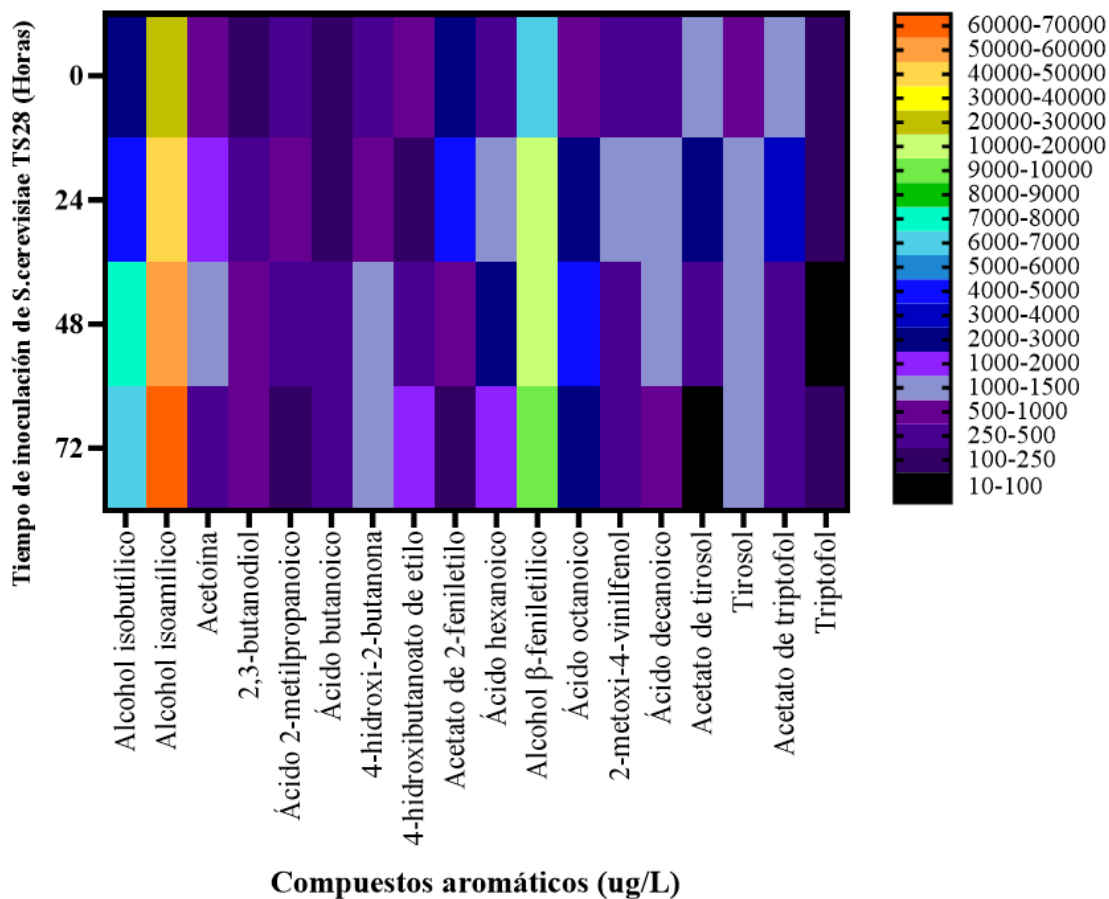


Figura 28. Producción de compuestos aromáticos junto con sus concentraciones es escala de colores (µg/L) al día 10 de fermentación para distintos tiempos de inoculación de *S.cerevisiae* TS28.

Ácidos grasos de cadena media

El ácido 2 metilpropanoico tiene un umbral de percepción de 2.300 µg/L, en ninguna de las inoculaciones se debería percibir. El ácido butanico, tiene un umbral muy bajo, de 173 µg/L, pero aun así tanto la co-inoculación como la secuencial de 24 horas presentan una concentración apenas por encima del umbral, por lo que debería haber notas a queso rancio; mientras que las 48 y 72 es un poco mayor; por lo que pueden sentirse el descriptor de manera más intensa.

La mayor concentración de ácido hexanoico se da en la inoculación de las 48 horas superando el umbral de percepción por lo que se podría percibir grasa y queso; a su vez este es el momento en el que se consideró que afectaba negativamente a la mayoría de las cepas de *S.cerevisiae* y es inapreciable para las cepas de *Hanseniaspora*. Podría estar dándose una interacción, de manera que las cepas de *Hanseniaspora* intentan competir con sus antagonistas y liberando esos compuestos indeseados en el medio [101]. De la misma manera el ácido octanoico y decanoico están en mayores concentraciones y pasan el umbral de percepción al agregar *S.cerevisiae* TS28 a las 48 horas de fermentación. En

la **Figura 29** observa que en tanto en las inoculaciones de las 48 horas y 72 horas aparecen compuestos relacionados con defectos aromáticos relacionados con queso, rancio y grasa.

Ésteres

El 4-hidroxi-butanoato de etilo es un éster hidroxilado derivado del ácido 4-hidroxi-butírico y el etanol, no contribuye tanto al aroma sino más bien al cuerpo del vino [111]. El acetato de 2 feniletilo super su umbral en todas las condiciones pero se destaca en la de las 24 horas, en este caso *H.vineae* M12/196F paso de producir 2.000 ug/L por si sola a 4.700 ug/L en presencia de *S.cerevisiae* TS28, dando un aroma aún más frutal, mieloso y floral [108]. El 2 metoxi 4 vinifenol (4-vinylguaicol) tiene un umbral muy pequeño de 40 ug/L de clavo y curry, es superado en todos los casos pero nuevamente tiene más a las 24 horas [112]. Se repite este comportamiento para el acetato de tirosol y triptofol.

En base al análisis de los compuestos volátiles, se observa que la mayor parte de aromas deseados se encuentran en la inoculación secuencial de 24 horas, se describir a este fermentado (no es un vino final, sino que es un vino en fermentación) como mayoritariamente floral, específicamente con sensación a rosas, frutal, alcohólico y notas de especies.

Con este análisis se caracterizó el perfil aromático de las fermentaciones, en la **Figura 29** se puede observar cómo los compuestos mencionados actualmente fueron agrupados según sus descriptores aromáticos para representarlos a partir de sus OAVS (Odor activity value), una relación entra la concentración y el umbral de percepción.

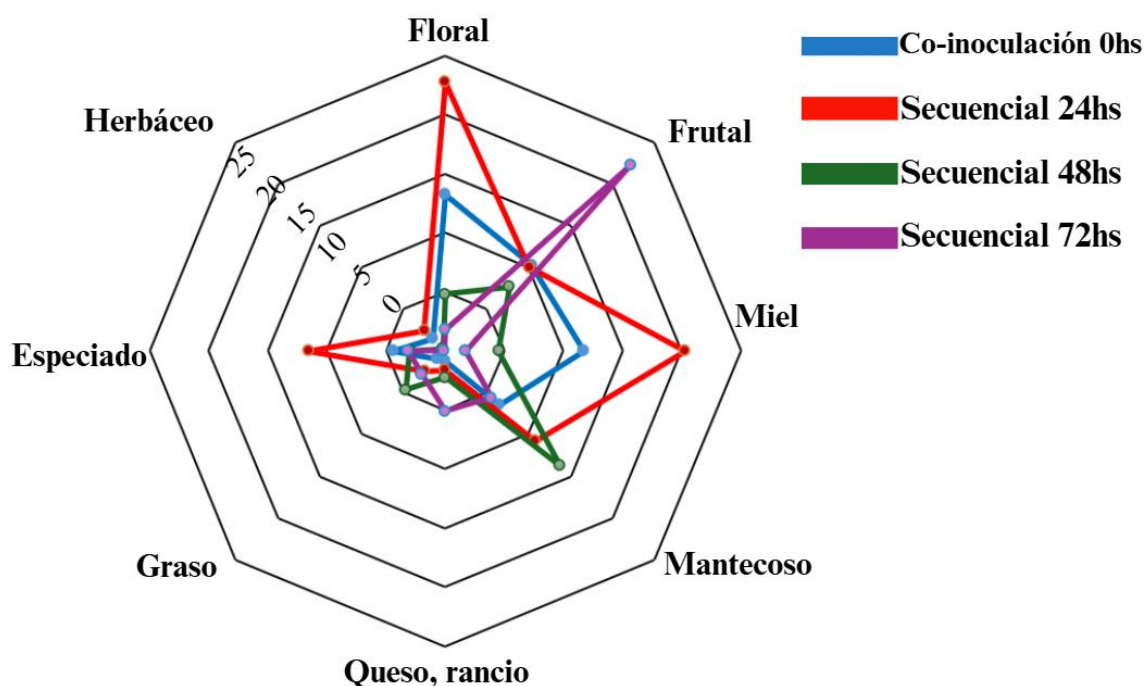


Figura 29. Perfiles aromáticos obtenidos con las diferentes estrategias de inoculación. Se representan las sumas de OAVs para los compuestos detectados por GC-MS clasificados según sus descriptores aromáticos primarios.

El perfil aromático varió según la estrategia de inoculación empleada. La coinoculación simultánea presentó aromas florales, frutales y a miel de forma moderada, mientras que los descriptores mantecoso y especiado se percibieron en menor intensidad. En la inoculación secuencial a las 24 horas, se destacó un perfil más intenso en notas florales, miel y especiadas, con presencia más sutil de aromas mantecosos y frutales. La inoculación a las 48 horas mostró un predominio del carácter mantecoso, acompañado de leves notas florales, de miel, herbáceas y grasas. Por último, la inoculación secuencial a las 72 horas presentó un perfil más frutal, con descriptores mantecoso y rancio en menor proporción.

Por la variedad de grupos aromáticos, su intensidad y falta defectos aromáticos el mejor perfil lo tiene la inoculación secuencial de las 24 horas, teniendo notas buscadas en vinos blancos e incluso vinos tintos jóvenes. Además, presentó una cinética de fermentación con una corta fase de latencia y producción de CO₂ esperada, teniendo de esta manera un balance entre la producción de etanol y el perfil aromático buscado para diferenciar el producto mientras demuestra tener potencial para ser eficiente fermentativamente.

Conclusiones

A partir de los estudios de crecimiento se identificaron al acetato de 2-feniletilo, el triptofol y al ácido hexanoico como moléculas con potencial de participar en la dinámica de interacción entre *S.cerevisiae* TS28 y *H.vineae* M12/196F. Específicamente el triptofol muestra un cambio de concentración que puede indicar señalización celular y el acetato 2-feniletilo puede evidenciar una interacción sinérgica entre ambas especies. De igual manera los ensayos del efecto sobre la fermentación señalan que estos dos compuestos en concentraciones fisiológicas producidas a las 24 horas por M12/196F favorecerían positivamente la aparición de aromas agradables, a diferencia de la concentración de ácido hexanoico producido a las 48 horas.

El momento óptimo de inoculación de *S.cerevisiae* TS28 es a las 24 horas de fermentación, tras la inoculación de *H.vineae* M12/196F en el tiempo 0, logrando el mejor balance entre producción de aromas deseables y una fermentación alcohólica eficiente.

Perspectivas

Los hallazgos obtenidos en este estudio abren diversas líneas de investigación que permitirán profundizar en el conocimiento de la regulación genética y metabólica de *H. vineae* en el contexto de la producción de compuestos aromáticos en fermentaciones.

Primeramente, se espera optimizar el protocolo la extracción de ADN para *H. vineae*, secuenciar la cepa utilizada en este estudio y analizar los genes relacionados con rutas metabólicas de compuestos aromáticos. A su vez sería útil para realizar estudios de transcriptómica para confirmar la función de QS de las moléculas estudiadas.

A su vez se podría evaluar el potencial industrial de los compuestos producidos en fermentación mixta dado que muchos tienen aplicaciones en la industria alimentaria y biotecnológica. Un análisis detallado de su producción en distintos escenarios fermentativos permitirá determinar su posible uso como saborizantes o aditivos industriales, de manera similar a la acetoina, un compuesto ampliamente utilizado en la industria de alimentos. Para ello, se podrían llevar a cabo pruebas de fermentación a escala piloto y caracterización química de los compuestos producidos.

Difusión

En el marco de esta tesis, el proyecto de investigación se presentó en los siguientes congresos en formato de póster impreso.

- XV Congreso Nacional de Microbiología / V Encuentro Nacional de Jóvenes Investigadores de Microbiología. Montevideo, Uruguay (2024).
- 45° Congreso Mundial de la Viña y el Vino. Dijon, Francia (2024).

Referencias bibliográficas

- [1] Varriano J. Wine: A Cultural History. Reaktion Books; 2022.
- [2] Vinos de Mesa: Descubre el Significado y Tipos de Estos Vinos. 2024 [accessed 2025 Apr 22]. <https://blog.borderio.com/vinos-de-mesa-descubre-el-significado-y-tipos-de-estos-vinos/>
- [3] Algieri B, Iania L, Leccadito A, Meloni G. Message in a bottle: Forecasting wine prices. Journal of Wine Economics. 2024 [accessed 2025 Apr 22];19(1):64–91. <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-wine-economics/article/message-in-a-bottle-forecasting-wine-prices/F70912BEC776577B80CF738D8FA8F6D0>. doi:10.1017/jwe.2024.3
- [4] Storchmann K. Wine Economics. Journal of Wine Economics. 2012 [accessed 2025 Apr 22];7(1):1–33. https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1931436112000089/type/journal_article. doi:10.1017/jwe.2012.8
- [5] Babor TF, Casswell S, Graham K, Huckle T, Livingston M, Rehm J, Room R, Rossow I, Sornpaisarn B. *Alcohol: No Ordinary Commodity* —a summary of the third edition. Addiction. 2022 [accessed 2025 Apr 22];117(12):3024–3036. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/add.16003>. doi:10.1111/add.16003
- [6] acde_td_andderson_2024_10.
- [7] Oenobrand. Oenobrand. [accessed 2025 Apr 22]. <https://oenobrand.com/>
- [8] We specialize in the development, production, and marketing of microorganisms and their derivatives. - Lallemand Inc. 2023 May 11 [accessed 2025 Apr 22]. <https://www.lallemand.com/en/>
- [9] Presentación | OIV. [accessed 2025 Mar 12]. <https://www.oiv.int/index.php/es/quienes-somos/presentacion>
- [10] OIV_2024_World_Wine_Production_Outlook_1.pdf. [accessed 2025 Mar 12]. https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_2024_World_Wine_Production_Outlook_1.pdf
- [11] (13) Can wine be considered a luxury commodity? | LinkedIn. [accessed 2025 Apr 22]. <https://www.linkedin.com/pulse/can-wine-considered-luxury-commodity-carlo-galimberti-tfkkf/>
- [12] Premium Wine Market Segmentation, Size, & Growth Report By 2029. [accessed 2025 Apr 22]. <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-premium-wine-market>
- [13] 2024_OIV_April_PressConference_PPT.pdf. [accessed 2025 Mar 11]. https://www.oiv.int/sites/default/files/2024-04/2024_OIV_April_PressConference_PPT.pdf
- [14] Carrau FM. The emergence of a new Uruguayan wine industry. Journal of Wine Research. 1997 [accessed 2025 Mar 7];8(3):179–185. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09571269708718118>. doi:10.1080/09571269708718118
- [15] Enoturismo_ESP-ING_7mar2019.pdf. [accessed 2025 Mar 8]. https://uruguaynatural.com/wp-content/uploads/2023/02/Enoturismo_ESP-ING_7mar2019.pdf

- [16]Carrau F, Boido E. Levaduras para enología de mínima intervención: microbiota del terruño y diferenciación de sabores. *INVESTIGACIÓN Y CIENCIA*. 2024.
- [17]González-Barreiro C, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015 [accessed 2025 Mar 10];55(2):202–218.
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.650336>.
 doi:10.1080/10408398.2011.650336
- [18]www.areaw3.com A-. INAVI - ¿Qué es INAVI? INAVI. [accessed 2025 Mar 7].
<https://www.inavi.com.uy/que-es-inavi/>
- [19]Decreto. [accessed 2025 Mar 10]. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/315-1994/26>
- [20]Decreto N° 283/993. [accessed 2025 Mar 7]. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-originales/283-1993>
- [21]www.areaw3.com A-. INAVI - Estadísticas. INAVI. [accessed 2025 Mar 10].
<https://www.inavi.com.uy/estadisticas/>
- [22]El enoturismo irrumpe con fuerza en Uruguay. *National Geographic*. 2023 Jul 19 [accessed 2025 Mar 8]. <https://www.nationalgeographicla.com/viajes/2023/07/el-enoturismo-irrumpe-con-fuerza-en-uruguay>
- [23]Camillo AA, Kim WG. An Assessment of the Competitive Position of the Emergent Uruguayan Wine Industry: A Preliminary Netnographic Baseline Study. *Beverages*. 2021 [accessed 2025 Mar 7];7(2):26. <https://www.mdpi.com/2306-5710/7/2/26>. doi:10.3390/beverages7020026
- [24]Fandos C, Flavián C. Intrinsic and extrinsic quality attributes, loyalty and buying intention: an analysis for a PDO product. *British Food Journal*. 2006 [accessed 2025 Apr 22];108(8):646–662. <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/00070700610682337/full/html>. doi:10.1108/00070700610682337
- [25]Bolha A, Blaznik U, Korošec M. Influence of intrinsic and extrinsic food attributes on consumers' acceptance of reformulated food products: A systematic review. *Slovenian Journal of Public Health*. 2020 [accessed 2025 Apr 22];60(1):72–78.
<https://www.sciendo.com/article/10.2478/sjph-2021-0011>. doi:10.2478/sjph-2021-0011
- [26]Malekpour M, Yazdani M, Rezvani H. Investigating the relationship between intrinsic and extrinsic product attributes with customer satisfaction: implications for food products. *British Food Journal*. 2022 [accessed 2025 Apr 22];124(13):578–598.
<https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/BFJ-02-2022-0097/full/html>.
 doi:10.1108/BFJ-02-2022-0097
- [27]Pu D, Shan Y, Wang J, Sun B, Xu Y, Zhang W, Zhang Y. Recent trends in aroma release and perception during food oral processing: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2024 [accessed 2025 Apr 22];64(11):3441–3457.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2022.2132209>.
 doi:10.1080/10408398.2022.2132209
- [28]Capone S, Tufariello M, Francioso L, Montagna G, Casino F, Leone A, Siciliano P. Aroma analysis by GC/MS and electronic nose dedicated to Negroamaro and Primitivo typical Italian Apulian wines. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013 [accessed 2025 Feb 11];179:259–269.

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400512011793>.
doi:10.1016/j.snb.2012.10.142

- [29] Fariña L, Villar V, Ares G, Carrau F, Dellacassa E, Boido E. Volatile composition and aroma profile of Uruguayan Tannat wines. *Food Research International*. 2015 [accessed 2025 Mar 10];69:244–255. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914008175>. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.029
- [30] Carrau FM, Medina K, Farina L, Boido E, Henschke PA, Dellacassa E. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research*. 2008 [accessed 2025 Mar 10];8(7):1196–1207. <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x
- [31] Ferreira V, de-la-Fuente-Blanco A, Sáenz-Navajas M-P. A New Classification of Perceptual Interactions between Odorants to Interpret Complex Aroma Systems. Application to Model Wine Aroma. *Foods*. 2021 [accessed 2025 Apr 29];10(7):1627. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/7/1627>. doi:10.3390/foods10071627
- [32] Ruiz J, Kiene F, Belda I, Fracassetti D, Marquina D, Navascués E, Calderón F, Benito A, Rauhut D, Santos A, et al. Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019 [accessed 2025 Mar 10];103(18):7425–7450. <http://link.springer.com/10.1007/s00253-019-10008-9>. doi:10.1007/s00253-019-10008-9
- [33] Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition*. Handbook of Enology. 1.
- [34] Francis I I., Newton J I. Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2005 [accessed 2025 Mar 10];11(2):114–126. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00283.x>. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00283.x
- [35] Pretorius IS, Høj PB. Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2005 [accessed 2025 Mar 10];11(2):83–108. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00281.x>. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00281.x
- [36] Jordão AM, Vilela A, Cosme F. From Sugar of Grape to Alcohol of Wine: Sensorial Impact of Alcohol in Wine. *Beverages*. 2015 [accessed 2025 Mar 8];1(4):292–310. <https://www.mdpi.com/2306-5710/1/4/292>. doi:10.3390/beverages1040292
- [37] Rivero-Pérez MD, Muñoz P, González-Sanjosé ML. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*. 2008 [accessed 2025 Mar 10];46(8):2815–2822. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691508002524>. doi:10.1016/j.fct.2008.05.014
- [38] Black C a., Parker M, Siebert T e., Capone D I., Francis I I. Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2015 [accessed 2025 Mar 10];21(S1):582–600. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajgw.12186>. doi:10.1111/ajgw.12186
- [39] 346bb91b94f57f26d3e293b52fc0059a83b273cf.pdf. [accessed 2025 Apr 22]. <https://www.inavi.com.uy/uploads/vinedo/346bb91b94f57f26d3e293b52fc0059a83b273cf.pdf>

- [40]Khan N, Fahad S, Naushad M, Faisal S. Grape Production Critical Review in the World. SSRN Electronic Journal. 2020 [accessed 2025 Apr 22]. <https://www.ssrn.com/abstract=3595842>. doi:10.2139/ssrn.3595842
- [41]Morata A. White Wine Technology. Academic Press; 2021.
- [42]Bellincontro A, De Santis D, Botondi R, Villa I, Mencarelli F. Different postharvest dehydration rates affect quality characteristics and volatile compounds of Malvasia, Trebbiano and Sangiovese grapes for wine production. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2004 [accessed 2025 Mar 10];84(13):1791–1800. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.1889>. doi:10.1002/jsfa.1889
- [43]Morata A. Red Wine Technology. Academic Press; 2018.
- [44]Jolly NP, Varela C, Pretorius IS. Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. FEMS yeast research. 2014;14(2):215–237. doi:10.1111/1567-1364.12111
- [45]Peynaud E, Domerco S. A Review of Microbiological Problems in Wine-Making in France. American Journal of Enology and Viticulture. 1959 [accessed 2025 Mar 12];10(2):69–77. <http://www.ajevonline.org/lookup/doi/10.5344/ajev.1959.10.2.69>. doi:10.5344/ajev.1959.10.2.69
- [46]Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra A-S, Hatziloukas E. Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications. AIMS Microbiology. 2020 [accessed 2025 Mar 7];6(1):1–31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7099199/>. doi:10.3934/microbiol.2020001
- [47]Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology. 2010 [accessed 2025 Mar 10];109(1):13–24. <https://academic.oup.com/jambio/article/109/1/13/6719906>. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x
- [48]Albergaria H, Francisco D, Gori K, Arneborg N, Gírio F. Saccharomyces cerevisiae CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-Saccharomyces wine-related strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010 [accessed 2025 Mar 17];86(3):965–972. <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2409-6>. doi:10.1007/s00253-009-2409-6
- [49]Swiegers JH, Pretorius IS. Yeast Modulation of Wine Flavor. In: Advances in Applied Microbiology. Vol. 57. Elsevier; 2005. p. 131–175. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216405570059>. doi:10.1016/S0065-2164(05)57005-9
- [50]Swiegers J h., Bartowsky E j., Henschke P a., Pretorius I s. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research. 2005 [accessed 2025 Mar 10];11(2):139–173. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x
- [51]Borren E, Tian B. The Important Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to the Aroma Complexity of Wine: A Review. Foods. 2020 [accessed 2025 Mar 10];10(1):13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7822458/>. doi:10.3390/foods10010013
- [52]Padilla B, Gil JV, Manzanares P. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. Frontiers in Microbiology. 2016;7:411. doi:10.3389/fmicb.2016.00411

- [53] Medina K, Boido E, Fariña L, Gioia O, Gomez ME, Barquet M, Gaggero C, Dellacassa E, Carrau F. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*. 2013 [accessed 2025 Mar 10];141(3):2513–2521. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613005025>. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.056
- [54] Mateo J, Maicas S. Application of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine-Making Process. *Fermentation*. 2016 [accessed 2025 Mar 10];2(3):14. <https://www.mdpi.com/2311-5637/2/3/14>. doi:10.3390/fermentation2030014
- [55] Vilela A. Non-Saccharomyces Yeasts and Organic Wines Fermentation: Implications on Human Health. *Fermentation*. 2020 [accessed 2025 Mar 7];6(2):54. <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/2/54>. doi:10.3390/fermentation6020054
- [56] Varela C. The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(23):9861–9874. doi:10.1007/s00253-016-7941-6
- [57] Giorello F, Valera MJ, Martin V, Parada A, Salzman V, Camesasca L, Fariña L, Boido E, Medina K, Dellacassa E, et al. Genomic and Transcriptomic Basis of *Hanseniaspora vineae*'s Impact on Flavor Diversity and Wine Quality Julia Pettinari M, editor. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019 [accessed 2025 Mar 10];85(1):e01959-18. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01959-18>. doi:10.1128/AEM.01959-18
- [58] Fermivin VINEAE. Oenobrand. [accessed 2025 Mar 10]. <http://oenobrand.com/product/yeast/fermivin-yeast/vineae/>
- [59] Valera MJ, Olivera V, Boido E, Dellacassa E, Carrau F. Wine Aroma Characterization of the Two Main Fermentation Yeast Species of the Apiculate Genus *Hanseniaspora*. *Fermentation*. 2021 [accessed 2025 Mar 10];7(3):162. <https://www.mdpi.com/2311-5637/7/3/162>. doi:10.3390/fermentation7030162
- [60] Carrau F, Dellacassa E, Boido E, Medina K, Valera MJ, Fariña L, Perez G, Martin V, Alvarez-Valin F, Balestrazzi L. Biology and physiology of *Hanseniaspora vineae* : metabolic diversity and increase flavour complexity for food fermentation. *FEMS Yeast Research*. 2023 [accessed 2025 Mar 10];23:foad010. <https://academic.oup.com/femsyr/article/doi/10.1093/femsyr/foad010/7033425>. doi:10.1093/femsyr/foad010
- [61] Lleixà J, Martín V, Portillo MDC, Carrau F, Beltran G, Mas A. Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*. 2016 [accessed 2025 Mar 10];7. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00338/abstract>. doi:10.3389/fmicb.2016.00338
- [62] Martín V, Valera MJ, Medina Rland K, Dellacassa E, Schneider R, Boido E, Carrau F. Application of *Hanseniaspora vineae* to improve white wine quality. 2022. p. 99–115. doi:10.1016/B978-0-12-823497-6.00004-1
- [63] Manual de practicas 2024 red.
- [64] Berthels N, Cordero R, Bauer F, Thevelein J, Pretorius I. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*. 2004 [accessed 2025 Mar 10];4(7):683–689. <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1016/j.femsyr.2004.02.005>. doi:10.1016/j.femsyr.2004.02.005

- [65]Schreier P, Jennings WG. Flavor composition of wines: A review. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1979 [accessed 2025 Mar 10];12(1):59–111. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408397909527273>. doi:10.1080/10408397909527273
- [66]Scanes KT, Hohnann S, Prior BA. Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 1998 [accessed 2025 Mar 12];19(1):17–24. <https://www.journals.ac.za/sajev/article/view/2239>. doi:10.21548/19-1-2239
- [67]Rapp A, Mandery H. Wine aroma. *Experientia*. 1986 [accessed 2025 Mar 10];42(8):873–884. <http://link.springer.com/10.1007/BF01941764>. doi:10.1007/BF01941764
- [68]Ehrlich F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1907 [accessed 2025 Mar 10];40(1):1027–1047. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cber.190704001156>. doi:10.1002/cber.190704001156
- [69]Hazelwood LA, Daran J-M, van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson JR. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008 [accessed 2025 Mar 10];74(8):2259–2266. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.02625-07>. doi:10.1128/AEM.02625-07
- [70]Maarse H. Volatile Compounds in Foods and Beverages.
- [71]Restrepo S, Espinoza L, Ceballos A, Urtubia A. Production of Fatty Acids during Alcoholic Wine Fermentation under Selected Temperature and Aeration Conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2019 [accessed 2025 Mar 10];70(2):169–176. <http://www.ajevonline.org/lookup/doi/10.5344/ajev.2018.18030>. doi:10.5344/ajev.2018.18030
- [72]Valera MJ, Olivera V, Boido E, Dellacassa E, Carrau F. Wine Aroma Characterization of the Two Main Fermentation Yeast Species of the Apiculate Genus *Hanseniaspora*. *Fermentation*. 2021 [accessed 2025 Mar 10];7(3):162. <https://www.mdpi.com/2311-5637/7/3/162>. doi:10.3390/fermentation7030162
- [73]Díaz-Maroto MC, Schneider R, Baumes R. Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005 [accessed 2025 Mar 10];53(9):3503–3509. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf048157o>. doi:10.1021/jf048157o
- [74]Viana F, Gil J, Genoves S, Valles S, Manzanares P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*. 2008 [accessed 2025 Mar 10];25(6):778–785. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008000841>. doi:10.1016/j.fm.2008.04.015
- [75]Olivera V, Valera MJ, Boido E, Schneider R, Dellacassa E, Carrau F. Mixed Cultures of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*: Nutrient Effects on Growth, Fermentation, and Wine Aroma Profile. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2024 [accessed 2025 Mar 18];75(2):0750025. <http://www.ajevonline.org/lookup/doi/10.5344/ajev.2024.24025>. doi:10.5344/ajev.2024.24025
- [76]Barbosa C, Ramalhosa E, Vasconcelos I, Reis M, Mendes-Ferreira A. Machine Learning Techniques Disclose the Combined Effect of Fermentation Conditions on Yeast Mixed-Culture Dynamics and Wine Quality. *Microorganisms*. 2022 [accessed 2025 Apr 22];10(1):107. <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/1/107>. doi:10.3390/microorganisms10010107

- [77] Medina K, Boido E, Dellacassa E, Carrau F. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2012 [accessed 2025 Mar 12];157(2):245–250. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512002607>. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012
- [78] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*. 1994 [accessed 2025 Mar 12];176(2):269–275. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>. doi:10.1128/jb.176.2.269-275.1994
- [79] Jagtap S, Bedekar A, Rao C. Quorum Sensing in Yeast. 2020. doi:10.1021/bk-2020-1374.ch013
- [80] Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi – a review. *Medical Mycology*. 2012 [accessed 2025 Mar 10];50(4):337–345. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>. doi:10.3109/13693786.2011.652201
- [81] Avbelj M, Zupan J, Raspor P. Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016 [accessed 2025 Mar 10];100(18):7841–7852. <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7758-3>. doi:10.1007/s00253-016-7758-3
- [82] Martín Russo V. *Hanseniaspora vineae*: caracterización y su uso en la vinificación. 2016 [accessed 2025 Mar 10]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/24325>
- [83] WL Nutrient Agar (Dehydrated). [accessed 2025 Mar 10]. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM0309B>
- [84] Modificaciones producidas por la fermentación maloláctica en la. studylib.es. [accessed 2025 Mar 10]. <https://studylib.es/doc/4698954/modificaciones-producidas-por-la-fermentación-maloláctica...>
- [85] Biotage. ISOLUTE® ENV+. [accessed 2025 Mar 13]. <https://www.biotage.com/isolute-env>
- [86] (PDF) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. ResearchGate. [accessed 2025 Mar 10]. https://www.researchgate.net/publication/283650275_Identification_of_Essential_Oil_Components_by_Gas_ChromatographyQuadrupole_Mass_Spectroscopy
- [87] McLafferty FW. *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. New York : Wiley; 1988. http://archive.org/details/wiley_nbs_registry0003mcla
- [88] McLafferty FW. *Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th edition with NIST 2005 Spectral Data*. Software edition. Wiley; 2005.
- [89] *Mass Spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds*, 3rd Edition. Wiley Science Solutions. [accessed 2025 Mar 10]. <https://sciencesolutions.wiley.com/solutions/technique/gc-ms/mass-spectra-of-flavors-and-fragrances-of-natural-and-synthetic-compounds-3rd-edition/>
- [90] LabSolutions CS : SHIMADZU (Shimadzu Corporation). [accessed 2025 Mar 10]. <https://www.shimadzu.com/an/products/software-informatics/software-option/labsolutions-cs/index.html>
- [91] Sigma-Aldrich. [accessed 2025 Mar 10]. <https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/products?msocid=34e477d88c3a694c3eee64a78d5168b9>

- [92]AG TT. Magellan™ - Data Analysis Software. [accessed 2025 Mar 10].
<https://lifesciences.tecan.com/software-magellan>
- [93]Jung PP, Christian N, Kay DP, Skupin A, Linster CL. Protocols and Programs for High-Throughput Growth and Aging Phenotyping in Yeast. PLOS ONE. 2015 [accessed 2025 Mar 17];10(3):e0119807. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119807>. doi:10.1371/journal.pone.0119807
- [94]STATISTICA 7.0 Download - statist.exe. [accessed 2025 Mar 10].
<https://statistica.software.informer.com/7.0/>
- [95]DNA | DNA Extraction and Purification Kits | QIAGEN. [accessed 2025 Mar 10].
<https://www.qiagen.com/us/product-categories/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification>
- [96]GreenSafe Premium. [accessed 2025 Mar 10]. <https://www.nzytech.com/en/mb13201-greensafe-premium/>
- [97]TraverUser. HOME - Familia Traversa. 2019 [accessed 2025 Mar 13].
<https://grupotraversa.com.uy/>
- [98]Cavallaro G. Determinacion de nitrogeno asimilable. [accessed 2025 Mar 10].
https://www.academia.edu/6736655/Determinacion_de_nitrogeno_asimilable
- [99]Starmer WT, Lachance M-A. Chapter 6 - Yeast Ecology. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editors. The Yeasts (Fifth Edition). London: Elsevier; 2011. p. 65–83.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521491000069>. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00006-9
- [100] Sci-Hub | De Novo Synthesis of Benzenoid Compounds by the Yeast *Hanseniaspora vineae* Increases the Flavor Diversity of Wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(22), 4574–4583 | 10.1021/acs.jafc.5b05442. [accessed 2025 Mar 3]. <https://sci-hub.st/10.1021/acs.jafc.5b05442>
- [101] Sarsan S, Pandiyan A, Rodhe A, Jagavati S. Synergistic Interactions Among Microbial Communities. 2022. p. 1–37. doi:10.1007/978-981-16-5617-0_1
- [102] Vilela A. Non-Saccharomyces Yeasts and Organic Wines Fermentation: Implications on Human Health. Fermentation. 2020 [accessed 2025 Mar 10];6(2):54.
<https://www.mdpi.com/2311-5637/6/2/54>. doi:10.3390/fermentation6020054
- [103] Pinhal S, Ropers D, Geiselmann J, de Jong H. Acetate Metabolism and the Inhibition of Bacterial Growth by Acetate. Journal of Bacteriology. 2019;201(13):e00147-19.
doi:10.1128/JB.00147-19
- [104] Bisson LF. Stuck and Sluggish Fermentations. American Journal of Enology and Viticulture. 1999 [accessed 2025 Mar 10];50(1):107–119.
<http://www.ajevonline.org/lookup/doi/10.5344/ajev.1999.50.1.107>.
doi:10.5344/ajev.1999.50.1.107
- [105] Borrull A, López-Martínez G, Poblet M, Cordero-Otero R, Rozès N. New insights into the toxicity mechanism of octanoic and decanoic acids on *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 2015 [accessed 2025 Mar 17];32(5):451–460.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.3071>. doi:10.1002/yea.3071

- [106] Legras JL, Erny C, Le Jeune C, Lollier M, Adolphe Y, Demuyter C, Delobel P, Blondin B, Karst F. Activation of Two Different Resistance Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* upon Exposure to Octanoic and Decanoic Acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010 [accessed 2025 Mar 17];76(22):7526–7535. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01280-10>. doi:10.1128/AEM.01280-10
- [107] BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. [accessed 2025 Mar 18]. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [108] Gallo A, Roman T, Paolini M, Cappello N, Guzzon R, Carrau F, Schneider R, Larcher R. Aroma Features of *Hanseniaspora vineae* Hv205 Wines in Sequential and Co-Inoculation Strategies. *Fermentation*. 2024 [accessed 2025 Mar 18];10(4):191. <https://www.mdpi.com/2311-5637/10/4/191>. doi:10.3390/fermentation10040191
- [109] Romano P, Suzzi G. Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996 [accessed 2025 Mar 15];62(2):309–315. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.62.2.309-315.1996>. doi:10.1128/aem.62.2.309-315.1996
- [110] xiao-lu-2014-generation-of-acetoin-and-its-derivatives-in-foods.pdf. Google Docs. [accessed 2025 Mar 15]. https://drive.google.com/file/d/1gS7j_mFPxPNq4-_cdvyKY7qT8oCSFZK8/view?usp=embed_facebook
- [111] Lara Fernández L. Influencia de diferentes levaduras en el aroma de vinos y bebidas espirituosas [doctoralThesis]. *Química analítica e alimentaria*; 2018. <https://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/handle/11093/1036>
- [112] Sunao M, Ito T, Hiroshima K, Sato M, Uehara T, Ohno T, Watanabe S, Takahashi H, Hashizume K. Analysis of Volatile Phenolic Compounds Responsible for 4-vinylguaiacol-like Odor Characteristics of Sake. *Food Science and Technology Research*. 2016 [accessed 2025 Mar 15];22(1):111–116. https://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/22/1/22_111/_article. doi:10.3136/fstr.22.111

Anexos

Anexo 1.

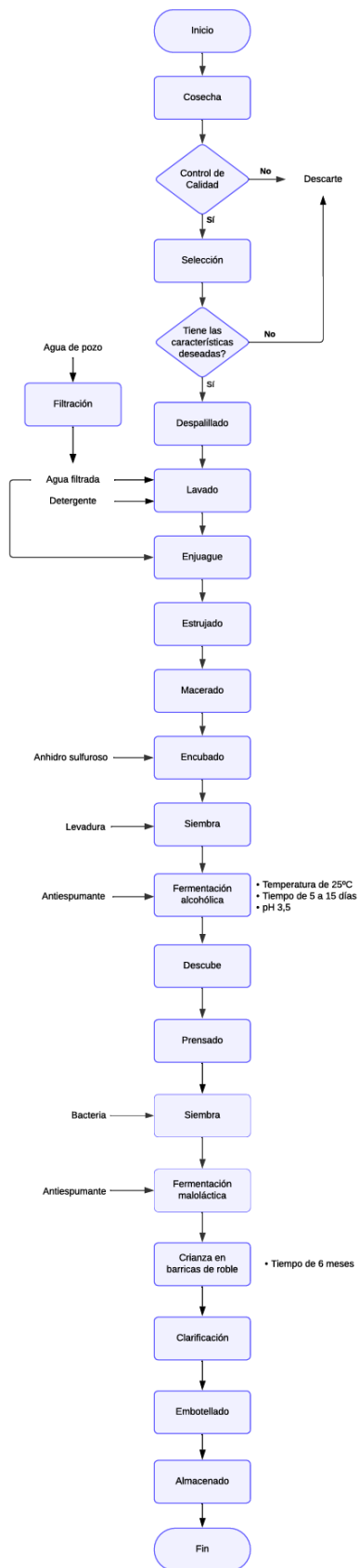


Figura 1. Diagrama de flujo de la vinificación.

Anexo 2. Cinética fermentativa y recuento de levaduras

Ecuación 1. CO₂ liberado



$$180 \text{ g/mol} = 46 \text{ g/mol} + 44 \text{ g/mol}$$

$$C_6H_{12}O_6 \text{ en simil mosto} = 200 \text{ g/L}$$

$$\frac{200 \text{ g/L}}{180 \text{ g/L}} = 1,1$$

$$2 * 44 \text{ g/mol} * 1,1 = 96,8 \text{ g/L} = 9,68 \text{ g en } 100 \text{ mL}$$

Ecuación 2. Cálculo de cél/mL

$$n^\circ \text{ de levaduras contadas} \cdot 25 \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10^3$$

Ecuación 3. Cálculo de ufc/mL

$$\frac{n^\circ \text{ de levaduras contadas} \cdot \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de siembra}}$$

Anexo 3. Cuantificación de compuestos identificados por GC-MS

Ecuación 4. Concentración de compuestos (µg/L)

$$\frac{[\text{estandar}] \cdot \text{área del compuesto}}{\text{área del estandar}} \cdot \frac{0,0001 \cdot 1000000 \cdot 1000}{\text{volumen extraído}}$$

Tabla 6. Concentraciones de compuestos producido por *H.vineae* M12/196F durante las 24, 48 y 72 horas de fermentación, cuantificados por GC-MS.

Compuesto (µg/L)	24 horas	48 horas	72 horas
Acetato 2-feniletilo	252,5 ± 26,9	1420,2 ± 146,	3272,1 ± 721,6
Alcohol 2 feniletílico	2750,7 ± 240,5	4909,6 ± 389,4	7110,6 ± 109,4
Acetato de tirosol	386,1 ± 11,4	1056,9 ± 7,7	2448,7 ± 188,1
Tirosol	123,5 ± 44,4	366,3 ± 18,7	458,7 ± 48,1
Acetato de triptofol	4111,8 ± 224,0	7334,3 ± 812,5	9102.2 ± 1179,3
Triptofol	33,4 ± 12,1	258,7 ± 11,2	15.5 ± 35,2
Alcohol bencílico	26,8 ± 3,1	28,2 ± 2,2	49,1 ± 7,3

Ácido hexanoico	5,5 ± 1,1	20,5 ± 4,2	511 ± 10,3
Ácido octanoico	35,4 ± 6,2	68,1 ± 11,8	152,8 ± 43,1
Ácido decanoico	123,3 ± 14,3	146,5 ± 16,2	598,1 ± 51,4

Anexo 4. Microplacas

Ecuación 5. Volumen a pesar para soluciones

$$C_i . V_i = C_f . V_f$$

Anexo 5. Caracterización fisicoquímica del mosto y fermentación

Tabla 6. Densidad a 15°C, concentración de azúcar y alcohol probable.

Densidad (g/L)	Azúcar (g/L)	Alcohol probable (% vol.)	Densidad (g/L)	Azúcar (g/L)	Alcohol probable (% vol.)	Densidad (g/L)	Azúcar (g/L)	Alcohol probable (% vol.)
1049	100	5,9	1073	164	9,6	1097	228	13,4
1050	103	6,0	1074	167	9,8	1098	231	13,6
1051	106	6,2	1075	170	10,0	1099	234	13,8
1052	108	6,3	1076	172	10,1	1100	236	13,9
1053	111	6,5	1077	175	10,3	1101	239	14,1
1054	114	6,7	1078	178	10,5	1102	242	14,3
1055	116	6,8	1079	180	10,6	1103	244	14,4
1056	119	7,0	1080	183	10,8	1104	247	14,6
1057	122	7,2	1081	186	10,9	1105	250	14,7
1058	124	7,3	1082	188	11,0	1106	252	14,9
1059	127	7,5	1083	191	11,2	1107	255	15,0
1060	130	7,6	1084	194	11,4	1108	258	15,2
1061	132	7,8	1085	196	11,5	1109	260	15,3
1062	135	7,9	1086	199	11,7	1110	263	15,5
1063	138	8,1	1087	202	11,9	1111	266	15,7
1064	140	8,2	1088	204	12,0	1112	268	15,9
1065	143	8,4	1089	207	12,2	1113	271	16,0
1066	146	8,6	1090	210	12,3	1114	274	16,2
1067	148	8,7	1091	212	12,5	1115	276	16,3
1068	151	8,9	1092	215	12,6	1116	279	16,4
1069	154	9,0	1093	218	12,8	1117	282	16,6
1070	156	9,2	1094	220	12,9	1118	284	16,7
1071	159	9,3	1095	223	13,1	1119	287	16,9
1072	162	9,5	1096	226	13,3	1120	290	17,1

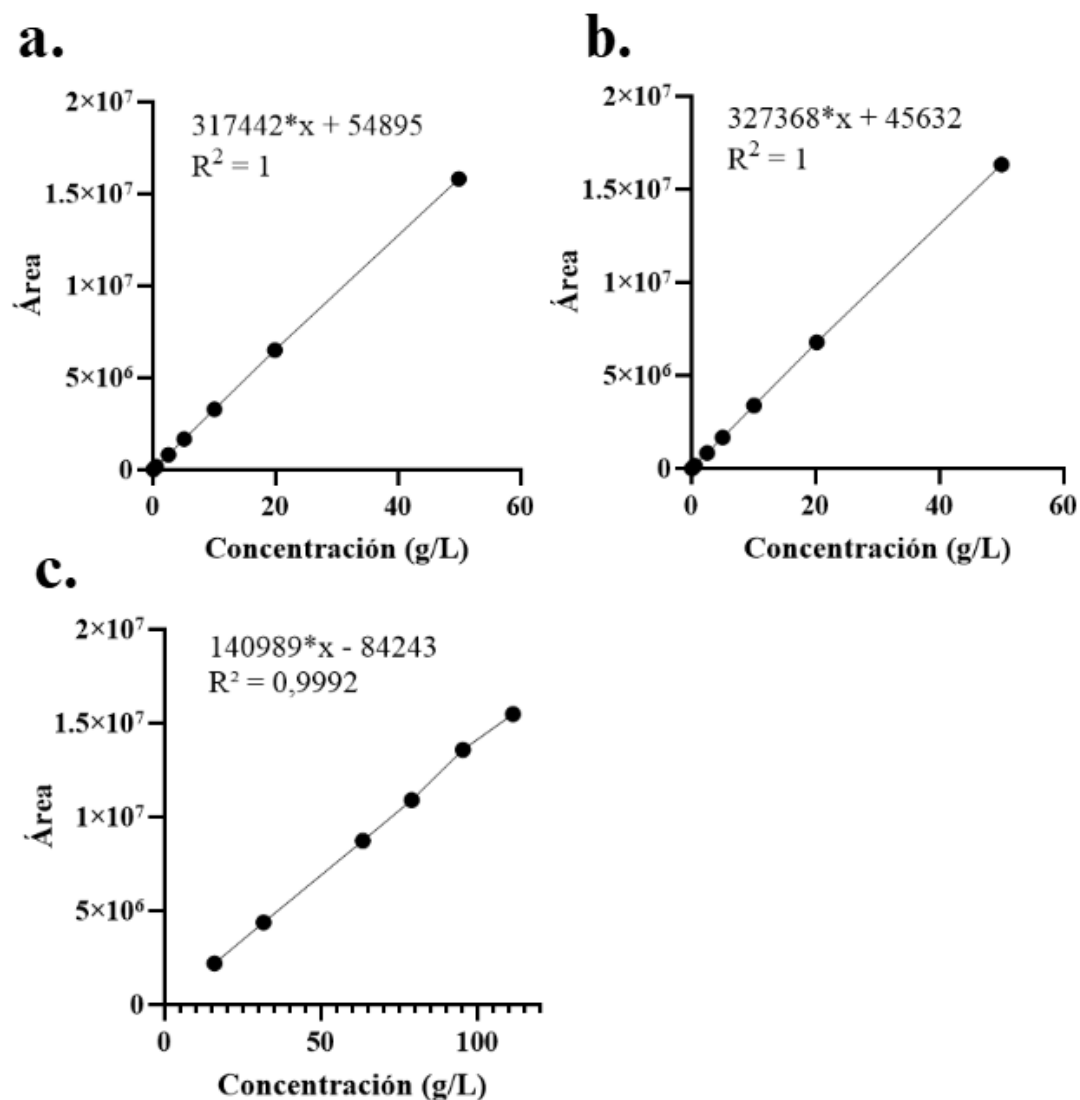


Figura 1. Curva de calibración para HPLC. **a.** Glucosa **b.** Fructosa **c.** Etanol

Anexo 6. Efecto de compuestos volátiles sobre el crecimiento.

Tabla 7. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **acetato 2-feniletilo** producido a las **24 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	1	0	0	1
3C	1	1	0	0	2
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	1	1	0	0	2
M522	1	1	0	0	2

OO30	1	0	0	0	1
OO35	0	0	1	1	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	1	1	0	0	2
T02/19F	1	0	0	0	1
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	1	0	1	1	3

Tabla 8. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de acetato 2-feniletilo producido a las 48 horas por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	0	0	1	1
3C	0	1	0	0	1
ALG804	1	0	0	0	1
KU1	1	1	1	1	4
M522	0	0	0	0	0
OO30	1	1	0	0	2
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Saccharomyces</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	1	1	2

Tabla 9. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de acetato 2-feniletilo producido a las 72 horas por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	0	0	0	1
3C	1	1	1	1	4
ALG804	0	0	0	0	0
KU1	1	1	0	0	2

M522	0	0	0	0	0
OO30	1	1	0	0	2
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	1	0	0	1
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	1	0	0	0	1

Tabla 10. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **alcohol 2-feniletílico** producido a las **24 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	0	0	0	1
3C	0	0	0	0	0
ALG804	1	1	1	1	4
KU1	1	1	0	0	2
M522	0	0	0	1	1
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	1	1	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	-1	-1	-1	-1	-4
TE11/48F	0	1	1	0	2
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	1	0	0	1
AWRI1280	0	0	1	0	1
AWRI3579	0	1	1	0	2

Tabla 11. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **alcohol 2-feniletílico** producido a las **48 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	0	0	0	1
3C	0	0	0	0	0
ALG804	1	1	1	1	4

KU1	1	1	0	0	2
M522	0	0	0	1	1
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	1	1	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	-1	0	-1	0	-2
T02/25F	1	1	0	0	2
TE11/48F	0	0	0	1	1
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 11. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de alcohol 2-feniletílico producido a las 72 horas por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	0	0	0	1
3C	0	0	0	0	0
ALG804	1	1	1	1	4
KU1	1	1	0	0	2
M522	0	0	0	1	1
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	1	1	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	0	1	0	2
T02/25F	1	1	0	0	2
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	1	1	-1	0	1
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 12. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de tirosol producido a las 24 horas por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	1	0	1	2
3C	1	1	0	0	2

ALG804	1	1	0	0	2
KU1	1	1	0	0	2
M522	1	1	0	0	2
OO30	1	1	0	0	2
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	-1	0	-1	-1	-3
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 12. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **tirosol** producido a las **48 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	1	-1	1	1
3C	1	1	0	0	2
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	1	1	0	0	2
M522	1	1	0	0	2
OO30	0	0	0	0	0
OO35	1	1	0	0	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	-1	0	0	-1
T02/25F	-1	0	0	0	-1
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	-1	0	0	-1
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 13. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **tirosol** producido a las **72 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	0	1	3

3C	1	1	1	1	4
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	1	1	0	0	2
M522	1	1	0	0	2
OO30	1	1	0	0	2
OO35	1	1	0	1	3
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	1	0	0	2
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	-1	0	0	-1
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 14. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de acetato de tirosol producido a las 24 horas por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	-1	0	1
3C	1	1	-1	-1	0
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	0	1	0	0	1
M522	0	1	0	0	1
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	1	0	0	2
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	-1	0	0	-1
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 15. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de acetato de tirosol producido a las 48 horas por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
-------------------------------	------------------------------	---------------------------------	--------------------------	-----------------------	---------

TS28	1	1	-1	0	1
3C	0	-1	-1	-1	-3
ALG804	0	0	0	0	0
KU1	0	1	1	0	2
M522	0	1	0	0	1
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	1	0	0	2
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	-1	0	0	-1
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 16. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **acetato de tirosol** producido a las **72 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	0	0	2
3C	0	0	-1	-1	-2
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	0	0	0	0	0
M522	0	0	0	0	0
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	1	0	0	2
T02/25F	0	1	1	0	2
TE11/48F	0	1	0	0	1
T02/05F	1	1	1	1	4
T02/19F	0	1	1	0	2
AWRI1280	0	1	0	0	1
AWRI3579	0	0	1	1	2

Tabla 17. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **triptofol** producido a las **24 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	0	0	2
3C	0	0	-1	-1	-2
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	0	0	0	0	0
M522	0	0	0	0	0
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	1	0	0	2
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	1	1	2
T02/05F	1	1	1	1	4
T02/19F	1	1	1	1	4
AWRI1280	1	1	1	1	4
AWRI3579	1	1	1	1	4

Tabla 18. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **triptofol** producido a las **48 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	0	0	0	0
3C	0	0	0	0	0
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	0	0	0	1	1
M522	0	0	0	0	0
OO30	0	0	0	0	0
OO35	1	1	0	0	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	1	0	0	2
T02/25F	0	1	1	0	2
TE11/48F	0	1	0	1	2
T02/05F	1	1	1	1	4
T02/19F	0	1	1	0	2
AWRI1280	0	1	0	0	1
AWRI3579	1	1	1	1	4

Tabla 19. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **triptofol** producido a las **72 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	0	0	2
3C	1	1	0	0	2
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	1	1	0	0	2
M522	1	1	0	0	2
OO30	0	0	0	0	0
OO35	1	1	0	0	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	1	1	0	2
AWRI1280	0	1	1	0	2
AWRI3579	1	0	0	0	1

Tabla 20. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **acetato de triptofol** producido a las **24 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	-1	0	-1	-1	-3
3C	1	1	0	0	2
ALG804	0	1	-1	-1	-1
KU1	1	1	0	1	3
M522	1	1	0		2
OO30	1	1	1	1	4
OO35	1	1	0	0	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	-1	-1	-1	-1	-4
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	0	-1	-1	-2
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 21. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **acetato de triptofol** producido a las **48 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	0	-1	-1	-2
3C	0	1	0	0	1
ALG804	0	0	0	0	0
KU1	1	1	0	1	3
M522	0	0	0	0	0
OO30	0	0	0	0	0
OO35	1	1	0	0	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	-1	-1	0	0	-2
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	1	1
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	1	-1	-1	1
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 22. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **acetato de triptofol** producido a las **72 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	0	-1	-1	-2
3C	0	1	0	0	1
ALG804	0	0	-1	-1	-2
KU1	1	1	-1	-1	0
M522	0	0	0	0	0
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	-1	-1	-2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	1	1
T02/19F	0	0	0	0	2
AWRI1280	0	0	-1	-1	-2
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 22. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **alcohol bencílico** producido a las **24 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	-1	-1	0	0	-2
3C	0	0	0	0	0
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	1	0	0	0	1
M522	0	0	1	1	2
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	1	1	1	4
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	1	1	0	0	2
T02/05F	1	1	0	0	2
T02/19F	1	1	1	1	4
AWRI1280	1	1	0	0	2
AWRI3579	1	1	0	0	0

Tabla 23. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **alcohol bencílico** producido a las **48 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	1	0	0	1
3C	1	1	0	0	2
ALG804	1	1	0	0	2
KU1	0	0	0	0	0
M522	0	0	1	1	2
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	1	0	1	3
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	1	1	0	0	2
T02/05F	1	1	0	0	2
T02/19F	1	1	0	0	2
AWRI1280	1	1	0	0	2
AWRI3579	1	1	0	0	2

Tabla 24. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **alcohol bencílico** producido a las **72 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	0	0	2
3C	1	1	0	0	2
ALG804	0	1	0	0	1
KU1	0	0	0	0	0
M522	0	0	0	0	0
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	1	1	1	1	4
T02/25F	0	1	0	0	1
TE11/48F	1	1	0	0	2
T02/05F	1	1	0	0	2
T02/19F	1	1	1	1	4
AWRI1280	1	1	0	0	2
AWRI3579	1	1	0	0	2

Tabla 25. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido hexanoico** producido a las **24 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	-1	-1	1
3C	1	1	-1	-1	1
ALG804	1	1	-1	-1	1
KU1	-1	1	-1	-1	-1
M522	1	1	-1	-1	1
OO30	0	0	0	0	0
OO35	1	1	-1	-1	1
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 26. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido hexanoico** producido a las **48 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	-1	-1	-1	-1	-4
3C	0	0	-1	-1	-2
ALG804	0	0	-1	-1	-2
KU1	-1	0	-1	-1	-3
M522	0	0	-1	-1	-2
OO30	-1	0	0	0	-1
OO35	0	0	-1	-1	-2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 27. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido hexanoico** producido a las **72 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	1	0	0	1
3C	1	1	-1	-1	0
ALG804	0	0	-1	-1	-2
KU1	-1	0	-1	-1	-3
M522	0	0	-1	-1	-2
OO30	0	0	0	0	0
OO35	0	0	-1	-1	-2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 28. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido octanoico** producido a las **24 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	0	0	0	0
3C	0	0	0	0	0
ALG804	0	0	0	0	0
KU1	0	0	0	0	0
M522	0	0	1	0	1
OO30	0	0	-1	1	0
OO35	0	0	0	0	0
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	0	0	0	0	0
T02/19F	0	0	0	0	0
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 29. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido octanoico** producido a las **48 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	0	0	2
3C	1	1	0	0	2
ALG804	0	1	0	0	1
KU1	0	0	0	0	0
M522	1	1	0	0	2
OO30	1	1	0	0	2
OO35	0	1	0	0	1
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	0	0	0
T02/05F	1	1	0	0	0
T02/19F	0	0	-1	-1	-2
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 30. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido octanoico** producido a las **72 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	0	0	2
3C	0	1	0	0	1
ALG804	0	0	0	0	0
KU1	0	0	0	0	0
M522	1	1	-1	-1	0
OO30	1	1	0	-1	1
OO35	0	1	0	0	1
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	1	0	1	2
T02/25F	0	1	0	0	1
TE11/48F	1	0	0	0	1
T02/05F	1	1	0	0	2
T02/19F	0	0	-1	-1	-2
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 30. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido octanoico** producido a las **72 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	1	1	0	0	2
3C	0	1	0	0	1
ALG804	0	0	0	0	0
KU1	0	0	0	0	0
M522	1	1	-1	-1	0
OO30	1	1	0	-1	1
OO35	0	1	0	0	1
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	1	0	1	2
T02/25F	0	1	0	0	1
TE11/48F	1	0	0	0	1
T02/05F	1	1	0	0	2
T02/19F	0	0	-1	-1	-2
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 31. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido decanoico** producido a las **24 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	1	-1	-1	-1
3C	1	1	0	0	2
ALG804	1	1	1	1	4
KU1	1	1	1	1	4
M522	1	1	1	1	4
OO30	1	1	1	1	4
OO35	1	1	1	1	4
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	1	1	2
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	-1	-1	-2
T02/05F	0	0	-1	-1	-2
T02/19F	0	0	-1	-1	-2
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 32. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido decanoico** producido a las **48 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	1	-1	-1	-1
3C	1	1	0	0	2
ALG804	1	1	1	1	4
KU1	1	1	1	1	4
M522	1	1	0	0	2
OO30	0	0	0	0	0
OO35	1	1	0	0	2
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	-1	-1	-2
TE11/48F	1	0	-1	-1	-2
T02/05F	0	0	-1	-1	-2
T02/19F	0	0	-1	-1	-2
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

Tabla 33. Puntuación de cada parámetro de crecimiento en presencia de la concentración de **ácido decanoico** producido a las **72 horas** por *H.vineae* M12/196F sobre cepas de *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*.

Cepas de <i>Saccharomyces</i>	Tiempo máximo de crecimiento	Duración de la fase de latencia	Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Puntaje
TS28	0	0	0	0	0
3C	0	1	0	0	1
ALG804	0	1	0	0	1
KU1	0	1	0	0	1
M522	0	0	0	0	0
OO30	0	0	0	0	0
OO35	1	0	0	0	1
Cepas de <i>Hanseniaspora</i>					
M12/196F	0	0	0	0	0
T02/25F	0	0	0	0	0
TE11/48F	0	0	-1	-1	-2
T02/05F	-1	-1	-1	-1	-4
T02/19F	0	0	-1	-1	-2
AWRI1280	0	0	0	0	0
AWRI3579	0	0	0	0	0

