

Laura CABRERO MUÑOZ

**Condicionantes de la fermentación alcohólica sobre la
realización de la fermentación maloláctica: ácido linoleico,
ácido γ -aminobutírico e inoculación secuencial con
*Torulaspora delbrueckii***

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Dirigido por Cristina Reguant Miranda y Nicolas Rozès

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Investigación enológica

Facultad de Enología



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona, España
2020**

Título del trabajo: Condicionantes de la fermentación alcohólica sobre la realización de la fermentación maloláctica: ácido linoleico, ácido γ -aminobutírico e inoculación secuencial con *Torulaspora delbrueckii*.

Autor: Laura Cabrero Muñoz.

Bajo la dirección de: Cristina Reguant Miranda y Nicolás Rozès.

Dirección: Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Grupos de investigación Biotecnología Microbiana de los Alimentos (BMA) y Biotecnología Enológica (BE). Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, 43007 Tarragona, España.

Correo electrónico: lauracabrero97@gmail.com

Palabras clave: ácido linoleico (C18:2), ácido γ -aminobutírico (GABA), *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Oenococcus oeni*.

Keywords: linoleic acid (C18:2), γ -aminobutyric acid (GABA), *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Oenococcus oeni*.

Agradecimientos

Quisiera agradecer esta modesta tesis a varias personas e instituciones que me han enseñado tanto los conocimientos teóricos para poder desarrollar la redacción del Trabajo de Fin de Máster, como la manera de aplicarlos en la práctica.

En primer lugar, gracias a la Universitat Rovira i Virgili y, más concretamente, a la Facultat d'Enologia, por darme la oportunidad de estudiar el Máster en Bebidas Fermentadas y por permitirme llevar a cabo este trabajo, culminando así con mi especialización en la rama de Investigación Enológica.

A Nicolas Rozès y a Cristina Reguant Miranda, tutores de este proyecto, por guiarme durante estos meses y resolverme todas y cada una de las dudas que me han ido surgiendo a lo largo de este tiempo, que no han sido pocas.

A Candela Ruiz de Villa, doctoranda de la facultad, por su infinita paciencia conmigo, así como por sus consejos y por acompañarme cuando lo he necesitado en la parte experimental del proyecto.

Quisiera mostrar también mi gratitud a mis compañeros de especialidad, por el apoyo mutuo a lo largo de este largo curso y por haber compartido agobios, incertidumbres y logros desde octubre. Sobre todo, a ti, Luis; porque, aunque el vino ya no me sepa como antes, desde que me lo bebo contigo capto mejor los matices y lo disfruto muchísimo más.

Y, en último lugar y como ya parece ser tradición, no sólo quisiera agradecer, sino también dedicar este trabajo a mis padres, a mi hermano y a mis abuelos. Por el apoyo moral y económico, por ser la piedra angular de todos mis éxitos. Espero que este sea el penúltimo de todos los triunfos que estén por venir, y que sigamos celebrándolos juntos. Gracias por absolutamente todo.

Índice

1. Resumen	1
1.1 Abstract	2
2. Introducción	3
2.1 Elaboración del vino	3
2.1.1 Fermentación alcohólica (FAL)	3
2.1.2 Fermentación maloláctica (FML)	5
2.2 Uso de no- <i>Saccharomyces</i> en enología	6
2.3 Co-inoculación y fermentación secuencial	7
2.4 Factores nutricionales adicionados al mosto	8
2.4.1 Ácido γ -aminobutírico (GABA)	8
2.4.2 Ácido linoleico (C18:2)	9
3. Justificación y objetivos	11
4. Materiales y métodos	12
4.1 Microorganismos utilizados	12
4.2 Medios de cultivo para recuentos y	12
4.2.1 YPD	12
4.2.2 MRS	12
4.3 Mosto y fermentaciones	13
4.3.1 Mosto sintético	13
4.3.2 Condiciones de FAL y FML	13
4.4 Análisis de los parámetros enológicos	14
4.4.1 Medida del pH	14
4.4.2 Densidad	14
4.4.3 Determinación de concentración de azúcares (Gluc – Fruc) y otros compuestos del vino: ácido L-málico, acético y cítrico.	14
4.5 Análisis de los ácidos grasos (AG) totales	15
4.6 Análisis estadístico	15

5. Resultados y discusión.....	15
5.1 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre las fermentaciones alcohólicas	16
5.1.1. Fermentaciones con <i>S. cerevisiae</i> QA23	16
5.1.2. Fermentaciones secuenciales con <i>T. delbrueckii</i> (Biodiva) y <i>S. cerevisiae</i> QA23	17
5.2 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre las fermentaciones malolácticas	18
5.3 Acidez del vino: pH y compuestos secundarios	21
5.3.1 pH	21
5.3.2 Compuestos secundarios: ácido acético y ácido cítrico.....	22
5.4 Ácidos grasos totales de las levaduras	24
5.4.1. Incorporación de C18:2 en las células de <i>S. cerevisiae</i>	24
5.4.2. Ácidos grasos saturados e insaturados.....	26
5.4.3 Ácidos grasos de cadena media (AGCM).....	26
6. Conclusiones.....	29
6.1 Conclusions.....	30
Bibliografía.....	31
Anexo.....	35

1. Resumen

El vino es el producto resultante de la fermentación parcial o completa del mosto de uva, cuya composición química condiciona la realización de los dos procesos metabólicos que han de producirse para la consecución del producto final: la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica.

En este trabajo se ha estudiado la influencia de aditivos como el ácido linoleico (C18:2) y el ácido γ -aminobutírico (GABA), así como el efecto de la inoculación secuencial de una no-*Saccharomyces* comercial (Biodiva, *T. delbrueckii*) sobre el desarrollo de la fermentación alcohólica realizada por la cepa QA23 (*S. cerevisiae*), y su incidencia sobre la realización de la FML de los vinos obtenidos por dos cepas de *O. oeni* (VP41 y PSU-1).

Los principales resultados mostraron que la suplementación del mosto sintético con C18:2 y GABA sí afectó a todo el proceso fermentativo, favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las levaduras e incrementando el rendimiento de la FAL, pudiendo llegar incluso a ser complementarios entre ambos. En cuanto los efectos en desarrollo de la FML, los datos no fueron del todo concluyentes, ya que en la mayoría de los casos no se consiguió finalizar esta segunda fermentación, y el arranque y mantenimiento del proceso fueron complicados. Además, para ambas fermentaciones el efecto fue diferente en función de las cepas utilizadas.

Por último, cabe destacar también el hecho de que la situación actual ha dificultado mucho el análisis de todos los parámetros, por lo que los resultados del estudio han sido parciales.

Palabras clave: ácido linoleico (C18:2), ácido γ -aminobutírico (GABA), *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Oenococcus oeni*.

1.1 Abstract

Wine is the product resulting from the partial or complete fermentation of the grape must, whose chemical composition conditions the realization of the metabolic processes that must be happened you for the achievement of the final product: the alcoholic and malolactic fermentation.

In this project, it has been studied the influence of additives such as linoleic acid (C18:2) and γ -aminobutyric acid (GABA), as well as the effect of the sequential inoculation of a commercial non-*Saccharomyces* strain (Biodiva, *T. delbrueckii*) on the development of alcoholic fermentation carried out by the QA23 strain (*S. cerevisiae*), and its effect on the performance of MLF of wines obtained by two *O. oeni* strains (VP41 and PSU-1).

The main results showed that the supplementation of the synthetic must with C18:2 and GABA did affect the whole fermentative process, favoring the growth and development of the yeasts and increasing the performance of the FAL, being able even to be complementary between both. As for the effects of MLF on development, the data were not entirely conclusive, since in most cases this second fermentation was not completed, and the start and maintenance of the process was complicated. In addition, for both fermentations the effect was different depending on the strains used.

Finally, it should also be noted that the current situation has made it very difficult to analyze all the parameters, so the results of the study have been partial.

Keywords: linoleic acid (C18:2), γ -aminobutyric acid (GABA), *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Oenococcus oeni*.

2. Introducción

2.1 Elaboración del vino

De acuerdo con la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), el vino es, exclusivamente, la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva. Su contenido en alcohol adquirido no puede ser inferior a 8,5% vol.

No obstante, teniendo en cuenta las condiciones del clima, del suelo o de la variedad, de factores cualitativos especiales o de tradiciones propias de ciertas regiones, el grado alcohólico total mínimo podrá ser reducido a 7% vol. por una legislación particular en la región considerada (OIV, 2016).

El proceso de elaboración del vino está conformado por cinco etapas básicas: vendimia, despalillado y estrujado, fermentación, clarificación, crianza y embotellado. Su producción es compleja a nivel bioquímico por la transformación del mosto en vino. Sin embargo, también lo es desde un punto de vista microbiológico, ya que además de levaduras también pueden estar implicadas bacterias.

El proceso metabólico clave que tiene lugar es la fermentación alcohólica, cuyos productos y otros compuestos sintetizados provocan cambios importantes en las características organolépticas del producto final. La fermentación maloláctica se produce después de la fermentación alcohólica y además de reducir la acidez del vino, le confiere un ajuste a nivel sensorial (aroma) y le da estabilidad microbiológica (Hui y Özgül, 2012).

2.1.1 Fermentación alcohólica (FAL)

Consiste en la transformación de los azúcares del mosto (principalmente glucosa y fructosa) en etanol y CO₂. Sin embargo, Hui y Özgül (2012) añaden que se trata de una reacción más compleja debido a que también tienen lugar muchos otros procesos químicos, bioquímicos y físico-químicos, haciendo posible que el mosto de uva se transforme finalmente en vino.



Figura 2.1 Reacciones enzimáticas de la FAL (Biologuías, 2018).

Además de etanol, se forman compuestos secundarios (alcoholes superiores, diacetilo, acetoína, etc.) que son producidos durante la fermentación alcohólica, fruto del metabolismo de las levaduras. Estos dotarán al vino de complejidad a nivel organoléptico. Al comienzo del proceso de vinificación se pueden encontrar diversas especies de levaduras presentes de forma natural en el mosto: destacan *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Candida* en las primeras etapas. También hay presencia de *Pichia*, que prevalece en las fases intermedias, pero es *Saccharomyces cerevisiae* la que predomina debido a su alta resistencia a concentraciones elevadas de etanol (Moreno-Arribas y Polo, 2008).

La biodiversidad que hay en el mosto depende de diversos factores, tales como la variedad de uva, el grado de madurez en el momento de la vendimia y condiciones edafoclimáticas entre otros. El continuo contacto de dichos microorganismos con las uvas y el mosto durante todo el proceso pueden provocar una fermentación alcohólica espontánea.

Moreno-Arribas y Polo (2009) señalan que, sin embargo, el arranque y posterior continuidad de la fermentación por parte de estas levaduras pueden verse afectados por diversos factores que pueden alterar el normal desarrollo de la fermentación (elevada concentración de azúcar, carencias nutricionales, temperatura, microorganismos antagonistas y niveles de oxígeno). Por ello, en la vinificación industrial se emplea levadura seca activa (LSA), cuya producción se basa en una propagación de levaduras previamente seleccionadas en el laboratorio y su posterior secado. Son, en definitiva, levaduras adaptadas a los estreses propios de la inoculación y del proceso de fermentación, y se rehidratan antes de ser utilizadas (Balmaseda A. , 2017). Se inoculan poblaciones de $2 - 3 \cdot 10^6$ cél/ml y actúan como starters, cuya función última es garantizar que la fermentación tiene lugar (Gutiérrez, 2018).

La fermentación alcohólica finaliza cuando los azúcares han sido consumidos casi por completo, habiéndose transformado en etanol. Es decir, cuando la concentración residual de glucosa y fructosa es de entre 2 – 5 g/l.

2.1.2 Fermentación maloláctica (FML)

También recibe el nombre de transformación maloláctica o segunda fermentación, y es la transformación del ácido L-málico que está presente de forma natural en la uva, en ácido L-láctico y CO₂ por acción de bacterias lácticas (BL), destacando *Oenococcus oeni* (Renouf, 2013). Desde el punto de vista metabólico consiste en una descarboxilación donde el principal beneficio es la desacidificación del vino. Este proceso permite generar ATP por la entrada de protones vía la ATP-sintasa en un medio en el que prácticamente no hay azúcares. Se define como una transformación enzimática porque las bacterias que la llevan a cabo poseen el enzima maloláctico, y resulta una etapa indispensable en la elaboración de vinos tintos y de vinos blancos o rosados con acidez muy elevada (Bordons y Reguant, 2013).

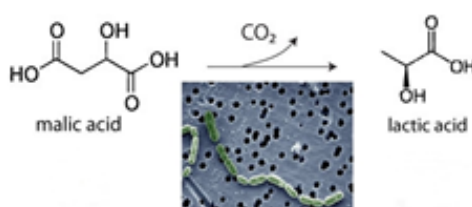


Figura 2.2 Reacción enzimática de la FML (Sotiriou, 2016).

Según Renouf (2013), este proceso tiene lugar porque después de la transformación de los azúcares en alcohol y CO₂ por las levaduras durante la FAL, el vino resultante es un producto ácido e inestable desde el punto de vista microbiológico. Por ello, la FML tiene un doble interés desde el punto de vista enológico: una disminución de la acidez y del verdor del producto, con el fin de conseguir un vino redondeado y con una estabilidad microbiana.

De acuerdo con Hui y Özgül (2012), otro aspecto fundamental de dicha transformación enzimática es el hecho de que induce modificaciones de la calidad organoléptica del vino ligadas a los metabolismos bacterianos secundarios. Numerosos estudios concluyen que la FML afecta al aroma y otorga al vino de complejidad, en función del tipo de BL y del propio vino.

Este proceso aumenta los aromas afrutados y a mantequilla, reduciendo los aromas herbáceos. El incremento del aroma afrutado viene dado por la formación de ésteres por parte de las BL del vino. La acentuación de notas a mantequillas se produce por el aumento de diacetilo formado durante la metabolización del citrato por estas mismas bacterias. Por otro lado, la disminución de aromas herbáceos es consecuencia del catabolismo de los aldehídos (Liu, 2002). Asimismo, se ha asociado la FML con la

síntesis de otros aromas característicos, como florales, dulces, ahumados, a vainilla, etc. Según Liu (2002), la consecución de un producto redondeado y con un retrogusto más persistente en el tiempo puede estar relacionado con la formación y liberación al vino de polioles y polisacáridos (aumentan la viscosidad) por parte de las bacterias lácticas. Estos productos pueden aumentar la sensación de cuerpo en los vinos y si son polimerizados con los taninos de la uva y la madera, pueden reducir la astringencia, dando lugar a su vez a sabores más complejos.

Tras la FML, Hui y Özgül (2012) afirman que la concentración de nutrientes será menor y este factor es lo que prevendrá el crecimiento de otros microorganismos. Además, durante este proceso, en algunos casos las bacterias lácticas sintetizan compuestos antimicrobianos (bacteriocinas). Sin embargo, algunos estudios han reportado que son pocas las BL de origen enológico las que son capaces de sintetizar estas sustancias, y en caso de que ocurra, las concentraciones que se encuentran en el vino ya terminado son bajas (Navarro et al., 2000).

2.2 Uso de no-*Saccharomyces* en enología

La elaboración de vino no se trata de un proceso estéril. Además de *S. cerevisiae* y *O. oeni*, en el vino hay muchas más cepas pertenecientes a diferentes especies de levaduras (no-*Saccharomyces*) y bacterias que también pueden contribuir a las características organolépticas finales del vino (Morata, 2018).

Algunas de las levaduras no-*Saccharomyces* pueden emplearse para corregir defectos del vino o mejorar su complejidad organoléptica porque tienen mayor actividad enzimática que *Saccharomyces*, siendo capaces de transformar algunos componentes del mosto. Esto puede suponer una mejora de los aspectos tecnológicos y de la calidad aromática del vino. Incluso algunas de ellas rinden cantidades bajas de compuestos indeseables (acetoína, ácido acético, acetato de etilo, etc.), como *Metschnikowia spp.*, *Starmerella bacillaris*, *Pichia kluyveri* o *Zygosaccharomyces bailli*, que han sido estudiadas y se ha visto que han producido reducciones de etanol de hasta 1,6 % (v/v) (Castrillo et al., 2019). Por este motivo, se ha planteado su uso con el objetivo de reducir la acidez volátil del vino mediante la co-inoculación de estas con *Saccharomyces* en cultivos mixtos o de forma secuencial (Guasch i Torres et al., 2015).

Torulaspora delbrueckii es la levadura no-*Saccharomyces* más utilizada y fue una de las primeras en ser comercializada. De acuerdo con Guasch i Torres et al. (2015), se caracteriza por una elevada capacidad de fermentación, baja producción de glicerol y

otros compuestos indeseables ya mencionados. Utilizada en fermentaciones mixtas o secuenciales con *S. cerevisiae*, puede contribuir también a la corrección de ciertos defectos como la acidez volátil.

Además, varios estudios han demostrado que su actividad β -glucosidasa realza el aroma del vino, ya que modula los niveles de norisoprenoides, terpenoles y lactonas por la hidrólisis de sus precursores. *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* destacan por aumentar la intensidad del aroma, incrementando el dulzor del vino, y disminuyendo la astringencia y los aromas herbáceos.

Sin embargo, el crecimiento de *T. delbrueckii* puede verse afectado por la presencia de *S. cerevisiae* como consecuencia de la interacción indirecta entre ambas levaduras (competición por sustrato) (Petruzzi et al., 2017).

2.3 Co-inoculación y fermentación secuencial

Moreno-Arribas y Polo (2009) indican que el proceso de vinificación conlleva dos procesos bioquímicos explicados anteriormente: la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica, donde *S. cerevisiae* es el principal microorganismo responsable del desarrollo de la FAL y *O. oeni* es el responsable de la FML.

La fermentación inoculada es aquella que se realiza con levaduras –y bacterias– comerciales seleccionadas, con el fin de garantizar la transformación del mosto en vino y la consecución de esto en un tiempo reducido. En el caso de las levaduras seleccionadas empleadas para inocular, se escogen en base a sus capacidades fermentativas y a la producción de metabolitos secundarios (Balmaseda, 2017).

En cuanto a la inoculación con bacterias seleccionadas, existen diferentes momentos en los que se puede realizar, como la co-inoculación, que se lleva a cabo en el mosto al principio de la FA y poco después de añadir la levadura; la inoculación a 2/3 de la FAL (inoculación temprana) y la inoculación una vez completada la FAL (inoculación secuencial) (du Toit, 2014).

Según Du Toit (2014), la co-inoculación permite un desarrollo más rápido de la FML en comparación con la inoculación secuencial. Además, a nivel sensorial, los vinos producidos por co-inoculación se caracterizan por estar mejor integrados y presentar armonía desde fases tempranas. Los aromas son más afrutados, presentan más cuerpo y tienen un manifiestan un mayor equilibrio. En cambio, los vinos que son fruto de una FML secuencial son más mantecosos (mayor producción de diacetilo) y presentan un

regusto a frutos secos. Asimismo, de acuerdo con la autora, los niveles de aminas biógenas son superiores debido a la aparición de flora indígena.

2.4 Factores nutricionales adicionados al mosto

2.4.1 Ácido γ -aminobutírico (GABA)

Son varias las fuentes de nitrógeno que están presentes en el mosto, incluyendo iones amonio y aminoácidos libres, cuya concentración depende de la variedad de uva, momento de la vendimia, clima y método de cultivo. El contenido total de nitrógeno en el mosto oscila entre 60 y 2400 mg/l, pero sólo algunas de estas fuentes de nitrógeno pueden ser metabolizadas por *S. cerevisiae* en condiciones vónicas. La concentración de nitrógeno asimilable por las levaduras (YAN) afecta a la eficiencia de la fermentación del vino porque su duración está relacionada con la disponibilidad del mismo. Bajas concentraciones limitan la producción de biomasa y afectan a la cinética del catabolismo de azúcares, y puede incluso llegar a causar fermentaciones lentas (Bach et al., 2009).

Pese a que el amonio y los aminoácidos suponen la mayor fuente de YAN en el mosto (a excepción de la prolina en condiciones enológicas), cabe destacar también la presencia de GABA, que es un aminoácido que no se incorpora en las proteínas; no obstante *S. cerevisiae* tiene la capacidad para utilizarlo como fuente de nitrógeno. Se trata de un aminoácido no proteico de cuatro carbonos que actúa como el mayor neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. Es producido principalmente por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), que cataliza la descarboxilación irreversible del L-glutamato a GABA (Kim et al., 2009).

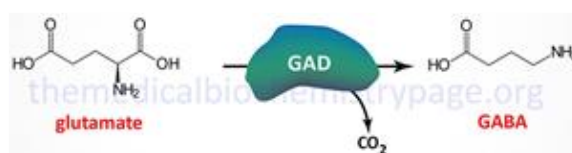


Figura 2.3: Síntesis de GABA (King, 2020).

Este aminoácido tiene diversas funciones fisiológicas tanto en plantas, animales y humanos, y, por ello, se han desarrollado fármacos y alimentos funcionales haciendo uso de este. Aunque está disponible en muchas frutas y en tejidos de las plantas, Kim et al. (2009) afirman que las concentraciones en las que se encuentra de forma natural son bajas (0.03 – 2.00 $\mu\text{mol/g}$ de producto fresco). Sin embargo, pueden verse aumentadas como respuesta a varios estímulos (choque térmico, estimulación mecánica, hipoxia y

fitohormonas) (Shelp et al., 2009). Según Kim et al. (2009), se ha estudiado la producción en masa de GABA utilizando bacterias lácticas (BL) y levaduras (*S. cerevisiae*), así como la fortificación de bebidas alcohólicas debido a los beneficios que aporta este aminoácido en la salud. Sin embargo, se ha verificado que raramente *S. cerevisiae* puede producirlo, pero sí es capaz de utilizarlo como fuente de nitrógeno no proteico (ver Anexo, Figura 1). Estudios demuestran que las concentraciones de GABA en mosto van de 50 a 250 mg/L, y su utilización durante la fermentación será mayor o menor en función de las características genéticas de las cepas de levaduras.

Bach et al. (2009) indican que también se ha probado que la presencia de este aminoácido en el mosto tiene un efecto positivo en la producción de metabolitos como el ácido succínico, y en las cinéticas de fermentación, por lo que es importante tener en cuenta las cantidades en las que se encuentra para un óptimo control de este proceso y de la acidez del vino.

2.4.2 Ácido linoleico (C18:2)

El mosto es un medio rico y complejo que contiene al menos 200 g/L de azúcares y diversos metabolitos de la uva, incluyendo ácidos orgánicos e inorgánicos, así como ácidos grasos en cuyas concentraciones varían de ng/L a g/L, y nunca son superiores a 2,8 g/l. Aunque se han hecho diferentes estudios para determinar el rol de los compuestos mayoritarios del mosto durante la fermentación, no se ha profundizado demasiado en la función de los lípidos presentes en este medio. Sin embargo, el papel que desempeñan estos compuestos traza no debe ser ignorado porque son de gran importancia en el metabolismo de las levaduras y su concentración inicial en el mosto afecta en el desarrollo de la fermentación y en la síntesis de productos finales en el vino, tales como ácidos orgánicos e inorgánicos, cuyas cantidades se reducen. (Casu et al., 2016).

Aunque *S. cerevisiae* y otras cepas de levadura no son capaces de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (como el C18:2) durante su crecimiento, sí pueden incorporarlos cuando estos ácidos están presentes en el medio, ya sea de forma natural o por suplementación (ver Anexo, Figura 2) (Redón et al., 2009). Los compuestos lipídicos participan en muchos procesos celulares, tales como diferenciación celular, actuar de suplemento energético y muerte celular. Estas moléculas son esenciales para el mantenimiento de la estructura celular, sobre todo cuando comienza la producción de etanol durante la FAL (Pinu et al., 2019).

Los ácidos grasos insaturados (AGI) representan el porcentaje mayoritario de lípidos totales en uvas, de los cuales, el ácido linoleico (C18:2) es el más abundante en el mosto.

Los AGI son factores esenciales para el crecimiento de *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica porque contribuyen al mantenimiento funcional de la membrana celular y ayudan a la adaptación de la levadura (en condiciones de hipoxia) a los estreses del proceso fermentativo (temperatura, etanol, etc.). Además, tienen una influencia directa en la producción de compuestos volátiles (incluyendo ácidos grasos de cadena media y ésteres correspondientes) porque regulan la formación del precursor acil-CoA y la expresión de genes relacionados (Liu et al., 2018).

Casu et al. (2016) sostienen que varios estudios han demostrado que un aumento de la concentración de ácido linoleico, además de incrementar de manera considerable los compuestos aromáticos del producto final, reducen los etil ésteres de ácidos grasos de cadena media (C6 – C12) producidos por las levaduras, cambian también la actividad metabólica de *S. cerevisiae* y aumentan su viabilidad.

Sin embargo, cabe destacar también que en las etapas prefermentativas puede oxidarse y producir por reacciones enzimáticas alcoholes y aldehídos de seis átomos de carbono (hexanal, hexenal o hexanol). Estos compuestos, aunque normalmente se encuentran en concentraciones inferiores a su umbral de percepción, pueden potenciar el olor y sabor herbáceo de los vinos. Los niveles de concentración de estos aldehídos y alcoholes dependen de la variedad de la uva y de su grado de maduración, así como de la temperatura, del tiempo que esté el mosto en contacto con los hollejos y de los tratamientos prefermentativos como por ejemplo la maceración pelicular (Ostiz, 2016).

3. Justificación y objetivos

El vino es una bebida fermentada altamente consumida y apreciada globalmente. Es, además, complejo y está dotado de matices que le otorgan una gran personalidad a nivel sensorial.

Debido a ello, numerosos son los estudios que se han realizado y que actualmente se llevan a cabo para una innovación y mejora del producto final, mediante la optimización su proceso más determinante: la fermentación. Tanto los microorganismos empleados como las condiciones de la materia prima (mosto), de la fermentación, y la interacción de estos tres factores entre sí juegan un papel crucial en la elaboración de este producto. No obstante, no se conoce demasiado la influencia que pueda llegar a tener el uso de determinados factores nutricionales o de crecimiento tanto para las levaduras como para las bacterias lácticas.

Debido a esto, el presente trabajo tiene un doble objetivo: por un lado, el estudio de la influencia de la adición en mosto de C18:2 y ácido γ -aminobutírico en el proceso fermentativo y, más concretamente, en la optimización del desarrollo de la fermentación maloláctica. Y, por otro lado, además tiene como fin estudiar la influencia de la inoculación secuencial tanto en la integración de los aditivos en las levaduras utilizadas, como en el desarrollo de la FAL y su efecto también en el proceso maloláctico.

4. Materiales y métodos

4.1 Microorganismos utilizados

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo son los que se muestran en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1 Microorganismos empleados para la elaboración de vino sintético.

Microorganismos	Especie	Cepa
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lallemand Lalvin QA23
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Lallemand Biodiva
Bacterias lácticas	<i>Oenococcus oeni</i>	PSU-1 (ATCC BAA-331)
	<i>Oenococcus oeni</i>	Lallemand Lalvin VP41

4.2 Medios de cultivo para recuentos

4.2.1 YPD

El agar YPD (yeast-peptone-dextrose) se utilizó para mantener y desarrollar levaduras encargadas de llevar a cabo la fermentación alcohólica (FAL): *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*.

La fórmula para su preparación es la siguiente:

- 2% (p/v) de glucosa (Panreac, Barcelona, España)
- 2% (p/v) de peptona (Panreac)
- 1% (p/v) de extracto de levaduras (Difco, España).
- 2% (p/v) de agar (Panreac).

4.2.2 MRS

El agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) se trata de un medio selectivo que proporciona los nutrientes necesarios para un crecimiento óptimo de lactobacilos, sobre todo para cepas cuyo desarrollo es deficiente en otros medios ya existentes. (Condalab, 2019). Este medio se empleó para el cultivo de *O. oeni*.

La fórmula seguida para la preparación del medio MRS fue la siguiente:

- 55 g/l de MRS (caldo) (Scharlab, Barcelona, España).
- 5 g/l de fructosa (Panreac).
- 4 g/l de ácido DL-málico (Sigma, Barcelona, España).
- 20 g/l de agar (Panreac).

Tras la dilución de todos los ingredientes y tanto para YPD como para MRS, el medio se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 20 minutos y se vertió el contenido en placas de Petri y se dejó enfriar para su solidificación.

4.3 Mosto y fermentaciones

4.3.1 Mosto sintético

Para la elaboración del mosto sintético se realizó una dilución de los primeros reactivos en agua destilada: azúcares (110 g/l de glucosa y 110 g/l de fructosa), ácidos (5 g/l de L-tartárico, 2 g/l de L-málico y 0,5 g/l cítrico) y sales (50 mg/l de NH₄Cl). Una vez disueltos, se adicionaron los compuestos nitrogenados (10 mg/l de aminoácidos, 50 mg/l de GABA).

Una vez obtenida una mezcla homogénea se ajustó el pH del mosto hasta alcanzar el valor deseado (3,5), utilizando NaCl y HCl en función de si había que disminuir o aumentar su acidez, respectivamente. Finalmente, se enrasó con agua destilada hasta obtener el volumen requerido, y se filtró en condiciones de esterilidad.

Una vez se obtuvo el mosto estéril, se le añadieron los aditivos pertinentes:

- **Ácido linoleico (5900 de Sigma):** se utilizó ácido linoleico unido a ciclodextrina (encapsulado) para que su dilución en el mosto fuese más fácil. Por tanto, la concentración de C18:2 íntegro fue de 15 mg/l.
- **GABA (Sigma):** se añadieron 50 mg/l (6,79 mgN/l) más para doblar su concentración en determinadas muestras; es decir, para tener 100 mg/L, lo que, sumado a los 50 mg/l de GABA inicial, supuso una cantidad total de nitrógeno añadido en GABA de 13,58 mg de nitrógeno/l.

4.3.2 Condiciones de FAL y FML

- **Fermentación alcohólica:** se realizó por inoculación de *S. cerevisiae* en algunas muestras y mediante inoculación secuencial en otras. Para este último caso, primero se inoculó Biodiva (*T. delbrueckii*) y 48h después, QA23 (*S. cerevisiae*).

Todas las levaduras empleadas fueron LSA's, por lo que previamente a su inoculación fue necesario un proceso de rehidratación para que la fase de latencia de estos microorganismos fuera menor y reducir así el tiempo de fermentación. La rehidratación tuvo lugar a 37°C para *S. cerevisiae* y a 30°C para *T. delbrueckii*, y la duración en ambos casos fue de media hora.

La densidad de población a inocular en el mosto sintético fue de $2,5 \cdot 10^6$ cél/ml para ambas especies y la temperatura a la que se llevaron a cabo las fermentaciones fueron de 22°C. Además, los fermentadores se mantuvieron en continua agitación (120 rpm).

- **Fermentación maloláctica:** se hizo en tubos de fondo cónico (Falcon, Barcelona, España) con un volumen útil de 30 ml metidos en una estufa sin agitación a 20°C. Antes de inocular en el vino las bacterias lácticas (BL) se realizó un preinóculo en tubos con medio MRS líquido y se dejó que crecieran durante 2 días para garantizar una concentración inicial de $2 \cdot 10^7$ cél/ml.

4.4 Análisis de los parámetros enológicos

4.4.1 Medida del pH

La determinación del pH se realizó por potenciometría, utilizando un pH-metro de mesa Crison Basic 20 (Barcelona, España). Se midió el pH del vino una vez terminada la FAL, y del mismo al final de la FML.

4.4.2 Densidad

El seguimiento de la densidad fue diario y la medida de este parámetro se llevó a cabo haciendo uso de un densímetro portátil Mettler Toledo 30PX (Barcelona, España).

También fue preciso preparar las muestras que iban a medirse. Para ello, se tomó muestra de cada mosto y se centrifugaron a 7000 rpm durante 5 minutos, separándose el sobrenadante de las células.

4.4.3 Determinación de concentración de azúcares (Gluc – Fruc) y otros compuestos del vino: ácido L-málico, acético y cítrico.

La determinación de todos parámetros se llevó a cabo mediante el empleo de un analizador enzimático químico automático Miura One (Barcelona, España), con el que se pueden realizar análisis químicos de tipo enzimático, colorimétrico y turbidimétrico de cualquier tipo de vinos y mostos.

Para la preparación de la muestra se tomaron 500 µl de cada tipo de vino y se centrifugó, conservando el sobrenadante de la muestra. Tras colocar las muestras en el equipo se determinó la concentración de los compuestos deseados.

4.5 Análisis de los ácidos grasos (AG) totales

La determinación de los AG totales de las levaduras se hizo por cromatografía de gases (Agilent Technologies, Madrid, España) acoplada a un detector de espectrofotometría de masas. Así, se obtiene el espectro de masas del analito y se puede comparar con las bibliotecas de espectros del equipo.

La muestra a analizar consistió en células de las levaduras que se tomaron del vino (500 µl) a las 48 horas de haber comenzado la FAL. Fueron congeladas y guardadas en tubos de microcentrífuga (Eppendorf Ibérica, Barcelona, España) hasta el momento de su análisis, en el que se pasarían sin resuspender a tubos de vidrio para una posterior una transmetilación, que es un procedimiento que se emplea tanto para romper el enlace éster que une los ácidos grasos a los esqueletos hidrocarbonados de las moléculas que los contienen, como para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME).

La muestra se mezcló con 1 ml de HCl en metanol (1,25 N) y 10 µl de patrón interno (PI) de los ácidos C7 (0,5 g/l) y C 17 (1 g/l) (Sigma) diluidos en hexano. Tras calentarse los tubos a 90°C durante 1 hora en baño seco (Fisher Bioblock Scientific, Aubagne, Francia), se añadieron 300 µl de hexano (Panreac), que fue el solvente de extracción de los AG. Se centrifugaron las muestras durante 5 minutos (3000 rpm) y se obtuvieron dos fases: una superior (AG y hexano), que es la que se inyectó en el cromatógrafo después (3 µl), y otra inferior (fase hidroalcohólica).

Una vez analizadas las muestras, se integraron los picos cromatográficos obtenidos mediante el empleo del software Agilent MSD Chemstation. A partir de la abundancia relativa de cada compuesto identificado (ácidos grasos), se calculó la altura relativa de cada uno de ellos normalizando la altura de cada compuesto entre la altura del PI. La identificación de los ácidos grasos-pudo realizarse utilizando la base comercial de datos NIST05 y dos bases de datos del grupo de investigación LIPIDOME y LIPID.L.

4.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el software XLSTAT (Addinsoft, París, Francia), con el fin de comparar el porcentaje de los distintos ácidos grasos presentes en el mosto a las 48h de haberse iniciado la FAL, con las distintas condiciones de fermentación estudiadas en el experimento. Se hizo la estadística de todos los triplicados que había para cada condición, empleando un análisis de varianza o ANOVA y mediante la utilización del Test de Tukey HSD (Honestly Significant Difference Test), con una significancia de $p < 0,05$. Resultados y discusión

5. Resultados y discusión

Los análisis se realizaron con el fin de observar alguna diferencia destacable en la duración del proceso de fermentación entre las distintas condiciones estudiadas: fermentación con QA23 (*S. cerevisiae*) sin aditivos, con la adición de ácido linoleico (C18:2), adición de GABA y adición de ambos, así como las mismas características para una fermentación secuencial con las cepas QA23 y Biodiva (*T. delbrueckii*).

5.1 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre las fermentaciones alcohólicas

5.1.1. Fermentaciones con *S. cerevisiae* QA23

Como se menciona en el apartado de Materiales y Métodos, el seguimiento de la densidad fue diario y se llevó a cabo con el fin de determinar cuánto tiempo fue necesario para alcanzar una densidad de aproximadamente 990 g/l, con la consecuente transformación del mosto inicial en vino.

En cuanto a la influencia de los aditivos agregados al mosto sintético, se vislumbra que el proceso se ve acelerado considerablemente en aquellos medios que poseen C18:2 y GABA simultáneamente, debido a que el mosto es rico en nutrientes. La Figura 5.1, muestra que las fermentaciones que más tardaron en acabar son aquellas con adición de C18:2 o control (sin aditivos).

Estudios han demostrado que un incremento de la concentración de ácido linoleico favorece el cambio en la composición de la membrana celular de las levaduras, evitando que sufran un shock por la producción de etanol y favoreciendo su viabilidad y crecimiento (Farhana et al., 2019). Sin embargo, el seguimiento de la densidad en el curso de la FAL permitió suponer que, pese a que se garantiza el óptimo desarrollo de las levaduras, la adición de este ácido graso insaturado no afecta al rendimiento de estos microorganismos en la fermentación y, por tanto, no disminuye la duración del proceso. En cuanto al suplemento del mosto con GABA, se observó una clara reducción del tiempo de fermentación para las muestras a las que se le había añadido este compuesto. Se sabe que el nitrógeno juega un papel vital en el rendimiento de la fermentación y como el ácido γ -aminobutírico lo contiene y es asimilable por la levadura, haber aumentado su concentración ha causado un incremento notable en la velocidad del proceso.

No obstante, es la muestra a la que se le ha añadido GABA y C18:2 la que permite concluir que ambos compuestos pueden presentar una función complementaria a la hora de optimizar el proceso. El hecho de que el C12:2 favorezca el crecimiento y la

supervivencia celular, y el GABA contribuya al incremento de la velocidad de fermentación, puede ser el motivo principal por el cual esta muestra haya sido la que haya concluido la FAL en un tiempo menor en comparación con las demás condiciones.

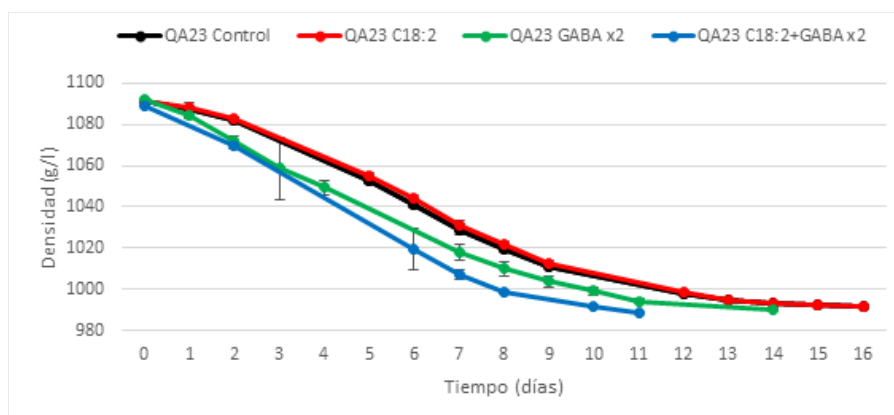


Figura 5.1 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre la fermentación de mosto sintético con *S. cerevisiae* a 22°C.

5.1.2. Fermentaciones secuenciales con *T. delbrueckii* (Biodiva) y *S. cerevisiae*

QA23

En cuanto a la gráfica que muestra la evolución de la densidad en mostos con fermentación secuencial (Figura 5.2) y una vez conocido el rol que pueden tener los aditivos utilizados, se observa que, en comparación con la primera figura, el descenso de la densidad fue más acusado en las primeras 48h del proceso, cuando todavía no se había inoculado la cepa QA23. Sin embargo, a escala global, la FAL finaliza hasta una semana más tarde que en aquellas fermentaciones que no tenían inoculación secuencial.

Observando ambas figuras podemos deducir que en aquellas fermentaciones donde se realizó inoculación secuencial, la cepa Biodiva se impone al inicio del proceso. No obstante, cuando se inocula QA23, la evolución de la gráfica cambia como consecuencia, quizá, de un cambio en la población celular del medio (ver anexo, Tabla 1). Esto se traduce en una competición a nivel de sustrato de ambas cepas, con un predominio a mitad del proceso y al final del mismo de *S. cerevisiae*. Por ello, y pese a que el descenso de la densidad fue en un principio más paulatino en aquellas fermentaciones donde sólo se inoculó *S. cerevisiae*, es en estas donde la FAL fue más rápida. De acuerdo con Guasch i Torres et al. (2015), motivo de esto es también el hecho de que las levaduras no-*Saccharomyces* tienen menor vigor fermentativo y, por ende, realizan la FAL en un mayor tiempo, llegando incluso a presentar dificultades para concluirla (ver Anexo, Tabla 2).

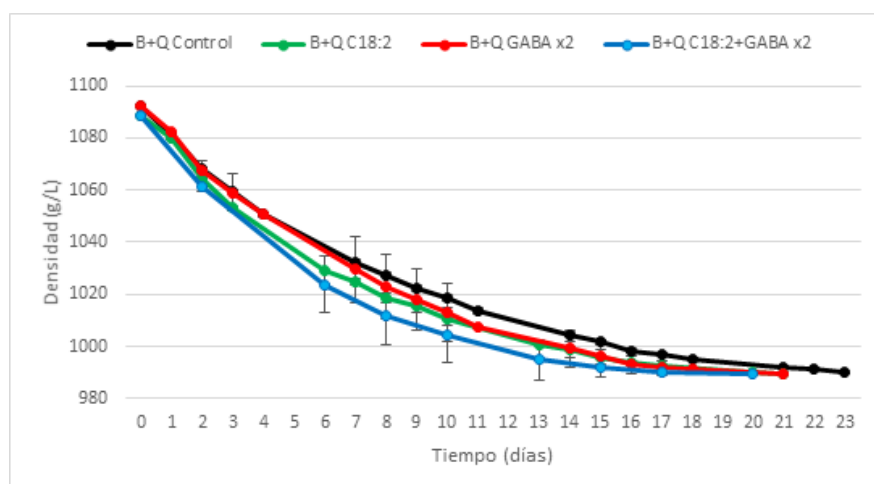


Figura 5.2 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre la fermentación de mosto sintético con inoculación secuencial de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* a 22°C.

5.2 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre las fermentaciones malolácticas

Una vez finalizada la FAL se realizó el seguimiento de la FML.

Para esta segunda fermentación se emplearon dos cepas diferentes de *O. oeni*: PSU-1 y VP41. La inoculación de estas junto con el hecho de tener vinos sintéticos con composiciones químicas diferentes podría haber sido la causa por la cual la velocidad de consumo del ácido málico fue distinta, teniendo un efecto positivo o negativo en la segunda fermentación.

El recuento en placa al inicio (día 0) y al final del proceso (fin FML) permitió observar que aquellas fermentaciones que no terminaron, presentaron una población inicial baja o que directamente no hubo, y un crecimiento final nulo en la gran mayoría de los casos. Hubo alguna excepción en que el crecimiento fue inusualmente bueno (por ejemplo, Q GABA presentó una población final de $1,4 \cdot 10^7$ cél/ml), aunque el proceso no llegase a su fin, pudiendo ser debido a que la composición del medio permitiese el desarrollo de los microorganismos, pero inhibiera su capacidad de transformar ácido L-málico.

En cuanto a las cepas que sí lograron realizar esta segunda fermentación, todas presentaron unos valores de población inicial de entre $1 \cdot 10^6$ y $2,5 \cdot 10^6$ cél/ml (ver Anexo, Tabla 3) que coinciden con la concentración mínima celular a partir de la cual puede desarrollarse la FML.

El seguimiento de la evolución de la concentración de ácido L-málico durante la FML permite identificar el final de dicho proceso: una consumición total o una concentración muy pequeña de este compuesto (entre 0,3 y 0,1 g/l) significa una finalización de la FML. Como se muestra en las Figuras 5.3 y 5.4 la mayoría de fermentaciones acabadas corresponden a aquellas que han sido inoculadas con VP41. Esta se caracteriza por crecer

mejor y más rápido, ya que es altamente tolerante a concentraciones elevadas de etanol. (Krieger y Arnink, 2011) Cabe destacar también que se trata de una de las cepas malolácticas más tolerantes al SO₂ (se sabe también que QA23 y Biodiva producen bajas cantidades de este compuesto). De las 16 fermentaciones diferentes que se presentan, son 7 las que consiguieron finalizar la FML y de ellas, 5 fueron inoculadas con VP41. Además, son las fermentaciones donde sólo se inoculó QA23 en la FAL las que mayor porcentaje de finalización de FML tuvieron (Figura 5.3 y Figura 5.4).

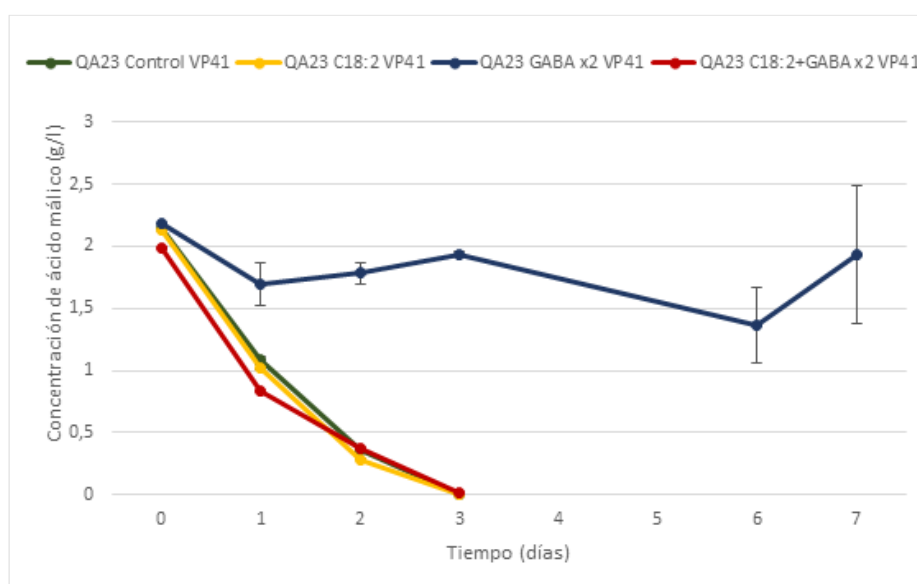


Figura 5.3 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre la FML con VP41 y de mosto sintético con *S. cerevisiae* a 20°C.

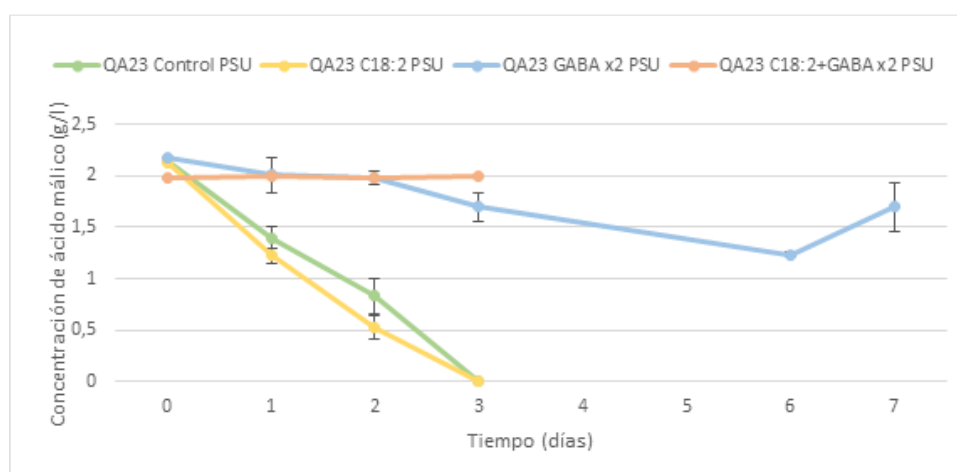


Figura 5.4 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre la FML con PSU y de mosto sintético con *S. cerevisiae* a 20°C.

Asimismo, estudios han demostrado que el crecimiento de la cepa PSU es inferior y más lento en comparación con VP41, y puede ser debido a la producción tanto de etanol como de SO₂ por parte de las levaduras durante la FAL. También, en ciertas fermentaciones el

recuento en placa de la población celular determinó que el crecimiento bacteriano de esta cepa había sido nulo, probablemente debido a la inhibición por la presencia de metabolitos de las levaduras y/o a la eliminación de sustancias para la nutrición de las bacterias (Figura 5.5 y Figura 5.6) (Lallemand, 2013).

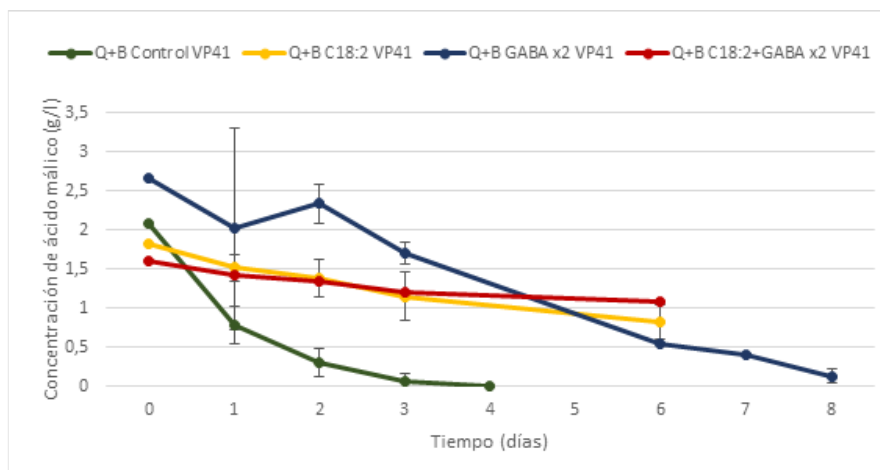


Figura 5.5 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre la FML con VP41 de mosto sintético con *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* a 20°C.

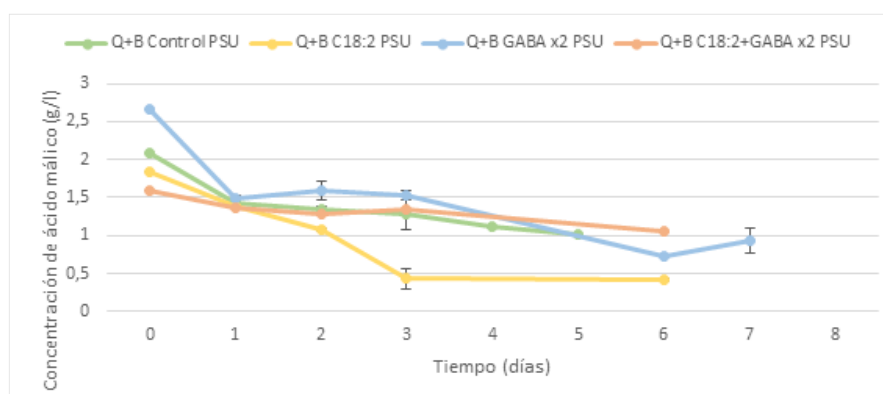


Figura 5.6 Efecto del ácido linoleico y GABA sobre la FML con PSU de mosto sintético con *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* a 20°C.

En general ha podido observarse una difícil inducción de la FML (ver Anexo, Tabla 4 y 5). Probablemente, el hecho de que algunas malolácticas finalizaran y otras terminaran parándose se haya debido al efecto inhibitorio acumulativo de una elevada concentración de etanol (superior al 10%), de un bajo pH en algunas de las réplicas analizadas, o en la incapacidad de las propias cepas de *O. oeni* de utilizar algunos nutrientes. Se ha probado que esto último difiere bastante entre unas cepas y otras (Vasserot et al., 2002).

5.3 Acidez del vino: pH y compuestos secundarios

La acidez es una característica de los vinos y de ello depende gran parte de su equilibrio gustativo. Se puede expresar en forma de concentración de los ácidos presentes (tartárico o acético) o en forma de pH, que ha sido el método seleccionado en este trabajo.

5.3.1 pH

En lo referente al pH, se observan en el siguiente histograma (Figura 5.7) diversas diferencias para cada tipo de fermentación y condiciones. Se produjo un descenso de la acidez en mayor o menor medida en todos los vinos tras la FAL. No obstante, no ocurrió lo mismo en el caso de la FML.

Aunque *O. oeni* es capaz de crecer a pH bajos (3 – 3.9), en estos casos la FML se desarrollará con mayor dificultad y de forma más lenta (Sáez, 2012).

En la Figura 5.7 se ve que las FML realizadas en vinos con pH más elevado (alrededor de pH 3,7) a final de FAL - Q control, Q C18:2, Q+B GABAx2 y Q+B C18:2+GABA x2 – terminaron en todos los casos con la cepa VP41 mientras que con la cepa PSU-1 sólo acabó en la condición con C18:2. En el resto de condiciones que presentaban un pH más bajo, alrededor de 3,5 a final de FAL, sólo se completó la FML con VP41 en las condiciones Q C18:2+GABAx2 y Q+B Control. Estos resultados indican que el efecto del pH habría jugado un papel determinante en la inhibición de la FML. Asimismo, pone de manifiesto la variabilidad de comportamiento en función de la cepa de *O. oeni*.

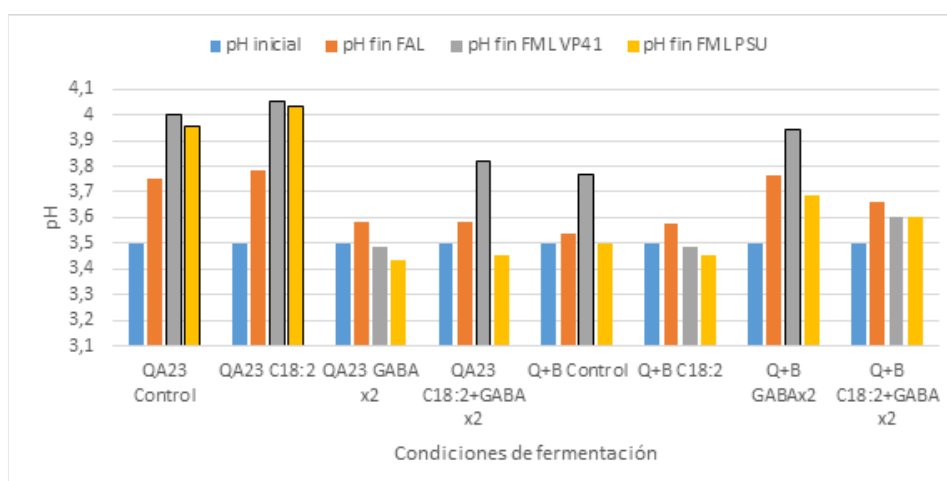


Figura 5.7 Evolución del pH a lo largo de todo el proceso de elaboración de los diferentes vinos sintéticos: pH inicial, tras la FAL y al final de la FML.

En ningún caso la adición de C18:2 y/o GABA ha acelerado la FML respecto a la condición control, con la excepción de la FML con PSU-1 del vino Q+B C18:2, aunque esta fermentación no llegó a finalizar. Así pues, no se ha podido confirmar el potencial efecto positivo de estos compuestos sobre *O. oeni*.

En el caso del ácido linoleico, sólo se observó un potencial efecto activador de la FML para la cepa PSU-1 ya que la única FML que finalizó fue en la condición QA23 C18:2 (uno de los vinos con pH 3,7). Para VP41 no se observaron efectos claros de la adición de ácido linoleico.

Respecto a la adición de GABA, tampoco se obtuvieron resultados concluyentes a pesar de tratarse de una potencial fuente de nitrógeno para *O. oeni*. Considerando los vinos elaborados sólo con QA23, que fueron los que permitieron un mejor desarrollo de la FML en general, las tres únicas condiciones en las que no se desarrolló la FML corresponden a vinos con adición de GABA, pero dichos vinos también tenían un pH más bajo que el control a final de FAL. El menor pH de estos vinos se podría deber a la transformación de GABA en ácido succínico por parte de *S. cerevisiae* durante las etapas más tempranas de la FAL (antes de que haya una cantidad de etanol de 4-5% (v/v)) (Bach et al., 2019; Toukis y Ueda, 1965). Su concentración también depende de la temperatura de fermentación, ya que si es moderada o elevada como ha sido el caso (22°C), se ve favorecida su síntesis (de Lerk, 2010). Además, el ácido succínico se ha descrito como un potencial inhibidor de la enzima maloláctica (Lonvaud-Funel y Strasser de Saad, 1981). Sin embargo, en los vinos en que se usó *T. delbrueckii* no se observó la disminución de pH a final de FAL con la adición GABA. Esto podría deberse a la menor producción de ácido succínico por parte de levaduras *no-Saccharomyces* –como *T. delbrueckii*– que ha sido descrita por diversos autores (Martín-García et al., 2020).

5.3.2 Compuestos secundarios: ácido acético y ácido cítrico

El ácido acético es un producto secundario que puede formarse tanto en la fermentación alcohólica como en la maloláctica, y su presencia en el vino conlleva un aumento de la acidez volátil. En la FAL se sintetiza debido a que una parte del etanol es transformada por las levaduras. En la FML, la formación de este ácido tiene su origen en el metabolismo del citrato, donde el ácido cítrico, se convierte en oxalacetato y se forma ácido acético. Además, la síntesis de oxalacetato da lugar posteriormente a ácido pirúvico, que puede ser transformado en ácido acético también (Reguant, 2019). También se produce ácido acético a partir de los azúcares por las bacterias lácticas heterofermentativas como *O. oeni*.

El siguiente histograma (Figura 5.8) presenta la evolución de los niveles de ácido acético en las tres etapas del proceso. Cabía esperar un mayor incremento de la concentración de éste en aquellos vinos donde la FML había podido concluirse (barras con borde negro). Pese a que en todos los experimentos el aumento del ácido acético ha sido notorio, no ha sido siempre superior en el caso de los en que la FML se concluyó por completo (compárese la barra naranja y gris de la muestra Q+B control, por ejemplo). Se sabe que la presencia de C18:2 (ácidos grasos) permite una reducción de acético, así como en los vinos con fermentación secuencial se esperaba también una síntesis menor de este ácido por la actuación de *T. delbrueckii*. No obstante, no ha sido así del todo, principalmente en el caso de las muestras con adición de C18:2. El pH presenta aquí cierta influencia también, pues en los vinos donde la acidez inicial de la FML (es decir, la acidez final de la FAL) no es muy superior en comparación con el pH del mosto (Figura 5.7), la acidez volátil ha sido menos acusada. Sin embargo y aunque una acidez volátil pequeña (baja concentración de acético) sea favorable para el vino, en este caso es debida a una FML inacabada, lo que se aleja del objetivo principal, que es optimizar este proceso. En cuanto al ácido cítrico, no es consumido hasta que el proceso se encuentra avanzado debido a que las bacterias lácticas presentan mayor preferencia por el ácido málico que por éste (Vijakainen y Laakso, 2000). Sin embargo, en este caso, en todas las muestras analizadas el consumo de ácido cítrico fue total (la concentración inicial fue 0,5 g/l) independientemente de la finalización o no del proceso, lo que supuso un aumento del ácido acético (metabolismo de *O. oeni*). También pudo aumentar la síntesis de este ácido los azúcares residuales (hexosas) de la FAL, pues *O. oeni* al ser heterofermentativa, podría haberlos degradado provocando un picado láctico y dando lugar a ácido acético entre otros compuestos (ácido láctico, etanol, diacetilo, etc.).

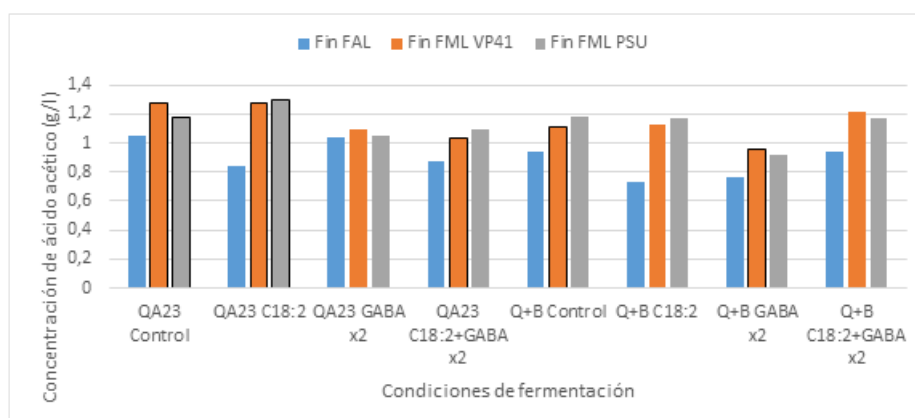


Figura 5.8 Evolución del ácido acético tras la FAL y FML de diferentes vinos sintéticos.

En definitiva, son diversos los factores que podrían haber provocado la inhibición de la FML, por lo que para poder elaborar una conclusión sólida habrían sido necesarios llevar a cabo más ensayos con otras concentraciones de los compuestos estudiados y cepas, así como la posibilidad de realizar más análisis.

5.4 Ácidos grasos totales de las levaduras

En las uvas los ácidos grasos insaturados (AGI) representan el mayor porcentaje de los ácidos grasos totales. Dentro de este grupo, el más abundante es el ácido linoleico (C18:2), seguido de los ácidos oleico (C18:1) y del palmitoleico (C16:1). El mayoritario de los ácidos grasos saturados (AGS) es el ácido palmítico (C16). Sin embargo, la composición inicial de ácidos grasos en mosto depende de los procesos tecnológicos aplicados tanto a las bayas como al mosto (Torija, et al., 2003).

En cuanto a las levaduras empleadas *S. cerevisiae* no puede sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (API). Sin embargo, *T. delbrueckii* y más concretamente Biodiva sí es capaz de sintetizarlos y tiene C18:2 en su membrana.

5.4.1. Incorporación de C18:2 en las células de *S. cerevisiae*

Uno de los objetivos principales del trabajo era averiguar si la adición de ácido linoleico en el mosto podía provocar que este ácido graso fuese incorporado en las levaduras durante la fermentación. Tanto *S. cerevisiae* como *T. delbrueckii* poseen proporciones diferenciadas de ácidos grasos en sus membranas celulares y sobre todo para esta última levadura, que tiene la capacidad de sintetizar el C18:2 (Ruiz de Villa, 2019).

Según Torija et al. (2003), las condiciones de fermentación también producen un efecto en la proporción de los ácidos grasos celulares, los cuales influyen en la capacidad de crecimiento y en la capacidad fermentativa de estos microorganismos. La anaerobiosis en la que tiene lugar FAL inhibe la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados, cuya concentración desciende hasta niveles mínimos y similares en términos generales. Como consecuencia de esto, se produce un incremento de los ácidos grasos saturados y ácidos grasos de cadena media (C6 a C12).

En la Figura 5.9 se muestra el efecto que causaron las distintas condiciones de fermentación en la utilización de los principales ácidos grasos insaturados (C18:1 y C18:2) por las levaduras ya mencionadas:

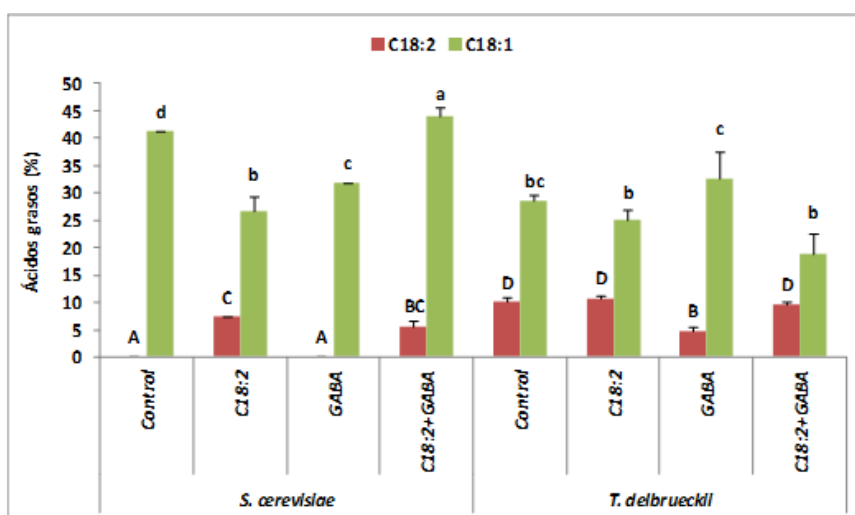


Figura 5.9. Efecto del C18:2 y GABA sobre la composición en C18:2 y C18:1 de las células de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* después 48 h de fermentación a 20°C. Las letras mayúsculas (C18:2) o minúsculas (C18:1) indican diferencias significativas entre condiciones con $p < 0,05$ (Tukey HSD).

Si bien está demostrado que la adición de lípidos tiene un efecto marcado en el crecimiento y en la actividad fermentativa de *S. cerevisiae*, en la Figura 5.9 se puede observar que la incorporación de C18:2 en las células fue mucho menor en las muestras con inoculación secuencial que en aquellas donde dicha levadura se encontraba sola.

En cuanto a los medios con suplemento de C18:2, se observó que la incorporación del mismo no fue completa, quizá como consecuencia de un exceso de este. No obstante, el medio que contenía simultáneamente ambos aditivos fue el que presentó una mayor población celular ($7 \cdot 10^7$ cél/ml) y, como se explicó en apartados anteriores, un tiempo de fermentación más reducido. En cambio, aquel mosto al que sólo se le añadió linoleico fue el que mostró una población más reducida ($4,67 \cdot 10^7$ cél/ml). Esto permitió plantear de nuevo la conjetura de un efecto complementario de sendos compuestos.

En conclusión, se vio que utilización de aditivos no causó un efecto significativo sobre los porcentajes de C18:1 y C18:2. Se puede afirmar también que *S. cerevisiae* sí es capaz de incorporar en sus células el C18:2 cuando este ácido está presente en un medio de cultivo que sea sintético (Redón et al., 2009) o en un mosto de uva (Beltrán, et al., 2006). No obstante, no se supo si también puede hacerlo en el caso de ser empleada esta levadura en fermentación secuencial. Sería interesante de cara al futuro investigarlo. *T. delbrueckii*, como se mencionó antes, ya contiene este ácido graso en su membrana, por lo que es posible que no lo utilizara. Para saberlo, se tendría que analizar también la composición de ácidos grasos a mitad y final de la fermentación.

5.4.2. Ácidos grasos saturados e insaturados

La composición de ácidos grasos de las células depende también de las condiciones de fermentación. La Figura 5.10 muestra el efecto de la adición de GABA y linoleico al porcentaje de AGS y AGI en el mosto sintético.

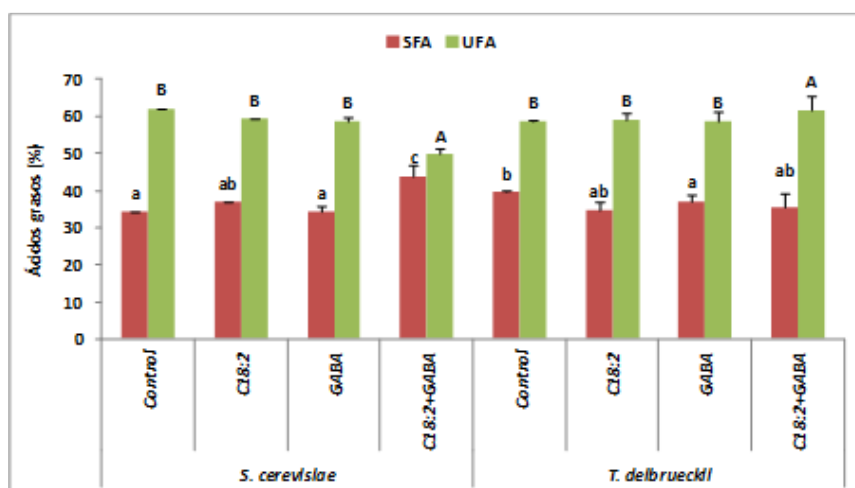


Figura 5.10 Efecto del C18:2 y GABA sobre la composición en ácidos grasos largos saturados (SFA) e insaturados (UFA) de las células de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* después 48 h de fermentación a 20°C. Las letras mayúsculas (UFA) o minúsculas (SFA) indican diferencias significativas entre condiciones con $p < 0,05$ (Tukey HSD).

En la Figura 5.10 se puede observar que en todos los casos hubo una mayor cantidad de AGI (UFA), aunque los porcentajes en su mayoría no difirieron significativamente unos de otros. A rasgos más genéricos la levadura utilizada o la condición del medio no provocó diferencias notorias entre unos mostos y otros.

Teniendo en cuenta que el crecimiento de ambas especies es diferente, se ha demostrado que las condiciones anaerobias afectan menos a *S. cerevisiae* que a *T. delbrueckii*, que necesita un mayor tiempo de adaptación al medio. Este es otro motivo por el cual, en las fermentaciones con inoculación secuencial, se incorporó Biodiva en el mosto en primer lugar, y que sólo estuviera presente en la primera etapa del proceso (Mauricio, Millán, & Ortega, 1998).

5.4.3 Ácidos grasos de cadena media (AGCM)

Los ácidos grasos de cadena media (C6-C12) son volátiles y son producidos por las levaduras durante la fermentación en condición de hipoxia, incrementándose su cantidad a lo largo del proceso. Se trata de, además, compuestos secundarios que contribuyen significativamente al aroma del vino sobre todo cuando son esterificados por alcoholes como el etanol, alcohol amílico, etc. No obstante, en determinados niveles en combinación con el etanol resultante del proceso pueden tener un efecto tóxico en *S.*

cerevisiae al afectar a la fluidez de la membrana celular, disminuyéndola (Bardi et al., 1999; Borull et al., 2015).

Según Torija et al. (2003), cuando la fermentación se desarrolla en condiciones anaeróbicas (vinificación en blanco), estos ácidos grasos se producen en cantidades mayores. En cambio, cuando la fermentación es llevada a cabo en condiciones aerobias o semi-aerobias (vinificación en tinto), la formación de los ácidos grasos de cadena media se reduce mucho y se incrementa la síntesis de AGI.

La Figura 5.11 muestra el porcentaje de AGCM en las células de levaduras a las 48h de haberse iniciado la FAL:

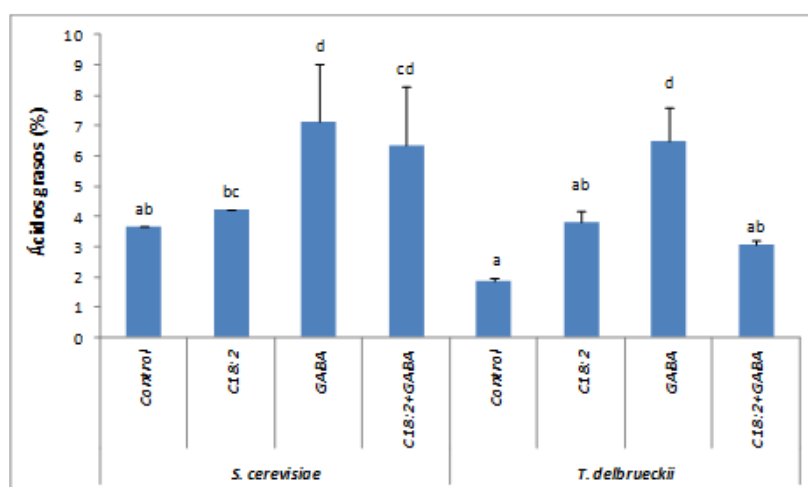


Figura 5.11 Efecto del C18:2 y GABA sobre la composición en ácidos grasos de cadena mediana (MCFA) de las células de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* después 48 h de fermentación a 20°C. Las letras indican diferencias significativas entre condiciones con $p < 0,05$ (Tukey HSD).

A rasgos generales se puede observar que en aquellas muestras donde se produjo adición de GABA (es decir, donde hay un incremento de nitrógeno), tuvo lugar un notable incremento en la cantidad de estos ácidos grasos. Sin embargo, es reseñable también mencionar que los niveles de ácidos grasos de cadena media en las muestras con fermentación secuencial fueron menores. Eso puede deberse a la presencia de *T. delbrueckii*, pues estudios han descrito previamente que produce cantidades insignificantes de estos compuestos (Velázquez Molinero, 2015).

Se ha probado también que el contenido de AGCM depende de la cepa utilizada y de la temperatura de fermentación. En este caso, se puede afirmar que los factores que han influido visiblemente en la síntesis y concentración de estos compuestos han sido la adición de GABA por ser rico en nitrógeno asimilable por la levadura y la inoculación de *T. delbrueckii* en el caso de la fermentación secuencial por ser una cepa poco productora de dichos ácidos grasos. En cuanto a la influencia de *S. cerevisiae*, Torija et al. (2003) señalan que esta levadura sintetiza menor cantidad de AGCM a bajas temperaturas, pero

de haberse llevado a cabo de esta manera, la fermentación habría sido mucho más lenta pudiendo incluso haber llegado a detenerse.

En el Anexo (ver Tabla 6) puede observarse de forma más conceptual un cuadro-resumen del grado de significancia de ANOVA para los factores C18:2 y GABA y su interacción con los AG analizados.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que la adición de C18:2 y GABA sí tienen un efecto destacable a lo largo de todo el proceso de fermentación. El ácido linoleico llega a ser incorporado por *S. cerevisiae*, lo que garantiza su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, es posible que en la fermentación secuencial no sea utilizado por *T. delbrueckii*, pues su membrana celular ya lo contiene. En lo que respecta a *S. cerevisiae* en la fermentación secuencial, habría que hacer un estudio más en profundidad con el objetivo de observar si formando parte de una fermentación secuencial es capaz de incorporar este ácido graso en su membrana.

Por otro lado, el suplemento del mosto con GABA lo enriquece por contener nitrógeno asimilable por las levaduras. Esto se traduce también en un incremento del rendimiento de la FAL. Se ha visto además que el uso conjunto de estos dos aditivos puede ser complementario, pues el ácido linoleico garantiza el crecimiento y desarrollo de las levaduras, mientras que el GABA asegura que la FAL se desarrolle más rápido.

En lo tocante a la FML, los resultados no fueron del todo concluyentes. La adición de linoleico tuvo un potencial efecto activador para la cepa PSU-1 en condición QA23 C18:2, pero no se observó un efecto destacable para el caso de la cepa VP41.

En lo que a la adición de GABA respecta, tampoco los resultados fueron determinantes a pesar de ser una potencial fuente de nitrógeno para *O. oeni*. Cabe destacar que se apreció un menor pH a final de FAL en los vinos inoculados sólo con *S. cerevisiae* con GABA adicionado. El menor pH se podría deber a la conversión de GABA en ácido succínico por parte de *S. cerevisiae* y habría tenido un efecto negativo sobre el desarrollo de la FML en estos casos.

6.1 Conclusions

The results obtained allow us to conclude that the addition of C18:2 and GABA do have a remarkable effect throughout the entire fermentation process. The linoleic acid is incorporated by *S. cerevisiae*, which guarantees its growth and development. Nevertheless, it is possible that in the sequential fermentation it is not used by *T. delbrueckii*, because its cell membrane already contains it. As far as *S. cerevisiae* in sequential fermentation is concerned, a more in-depth study should be made in order to see if it is capable of incorporating this fatty acid in its membrane as part of a sequential fermentation.

On the other hand, supplementing the must with GABA acid enriches it by containing nitrogen that can be assimilated by the yeast. This also results in an increase in the yield of AF. It has also been seen that the combined use of these two additives can be complementary, as linoleic acid ensures the growth and development of the yeast, while GABA ensures that the FAL develops more quickly.

However, MLF results were not entirely conclusive. The addition of linoleic had a potential activating effect for the PSU-1 strain in QA23 C18:2 condition, but no remarkable effect was observed for the VP41 strain.

As far as the addition of GABA is concerned, the results were not conclusive either, despite being a potential source of nitrogen for *O. oeni*. It should be noted that a lower pH was observed at the end of FAL in wines inoculated only with *S. cerevisiae* with GABA added. The lower pH could be due to the conversion of GABA into succinic acid by *S. cerevisiae* and would have had a negative effect on the development of MLF in these cases.

Bibliografía

- Alexandre, H., Grandvalet, C., Guilloux-Bénatier, M., Remize-Barnavon, F., & Tourdot-Maréchal, R. (2008).** *Les bactéries lactiques en oenologie*. París, Francia: Lavoisier.
- Bach, B., Sauvage, F.-X., Dequin, S., & Camarasa, C. (2009).** Role of gamma-aminobutyric acid as a source of nitrogen and succinate in wine. *American society for enology and viticulture*.
- Balmaseda, A. (2017).** Fermentación espontánea y fermentación inoculada del vino. *Aprender de vino*. Consulté le 05 10, 2020, sur <https://www.aprenderdevino.es/fermentacion-espontanea-inoculada/>
- Balmaseda, A. (2017).** Levaduras en la fermentación del vino. *Aprender de vino*. Consulté le 05 10, 2020, sur <https://www.aprenderdevino.es/levadura-fermentacion-vino/>
- Bardi, L., Cocito, C., & Marzona, M. (1999).** Saccharomyces cerevisiae cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in presence of exogenous lipids. *International Journal of Food Microbiology*, 133-140.
- Beltrán, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., & Rozès, N. (2006).** Integration of transcriptomic and metabolomic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Research*, 1-3.
- Berbegal, C., Pardo, I., & Ferrer, S. (2020).** Estrategias para el desarrollo de la fermentación maloláctica para vinos con pH extremos. *Acenología*. Recuperé sur http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/estrategias_desarrollo_fml_cienc174_0220.html
- Biologuías. (2018).** Fermentación: fermentación alcohólica. *Reacción química de la FAL*. Consulté le 4 25, 2020, sur <https://www.biologuias.com/catabolismo/fermentacion/>
- Bordons, A., & Reguant, C. (2013).** Bioquímica de las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica. *Bioquímica del vino*.
- Borull, A., López-Matínez, G., Poblet, M., Cordero-Otero, R., & Rozès, N. (2015).** New insights into the toxicity mechanism of octanoic and decanoic acids on *Saccharomyces cerevisiae*. 451-460.
- Castrillo, D., Rabuñal, E., Neira, N., & Blanco, P. (2019).** Reducción del grado alcohólico del vino mediante levaduras no-Saccharomyces. *Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVGA-AGACAL)*, 293-297.
- Casu, F., Pinu, F., Fedrizzi, B., Greenwood, D., & Villas-Boas, S. (2016).** The effect of linoleic acid on the Sauvignon blanc fermentation by different wine yeasts strains. *FEMS yeast research*.
- Condalab. (2019).** Agar MRS. *Condalab*, 2.
- de Lerk, J.-L. (2010).** *Succinic acid production by wine yeasts*. Stellenbosch: Stellenbosch University.

- du Toit, M. (2014).** Co-inoculación con bacterias enológicas seleccionadas. (L. Wine, Éd.) *The wine expert: información práctica sobre elaboración de vino*, 1-6. Récupéré sur <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2014/09/WE4-Chile.pdf>
- Farhana R., P., Villas-Boas, S., & Matin, D. (2019).** Pre-fermentative supplementation of fatty acids alters the metabolic activity of wine yeasts. *El Sevier*, 1-10.
- Guasch i Torres, J., Busto, O., Mestres i Solé, M., Aceña, L., & Capdevila i Aranda, J. (2015).** *Enología 2015: innovación vitivinícola*. Tarragona, Cataluña, España: Publicaciones Universitat Rovira i Virgili.
- Gutiérrez, J. (2018).** *El papel de la selección de levaduras en la elaboración del vino*. Universidad de Salamanca. Salamanca: Universidad de Salamanca. Récupéré sur [file:///C:/Users/usuario/Downloads/Dialnet-ElPapelDeLaSeleccionDeLevadurasEnLaElaboracionDelV-6573032%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/Dialnet-ElPapelDeLaSeleccionDeLevadurasEnLaElaboracionDelV-6573032%20(2).pdf)
- Hui, H., & Özgü, E. (2012).** *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*. Boca Ratón, Florida, EEUU: Taylor & Francis Group.
- Kim, J., Lee, M., Ji, G., & Lee, Y. H. (2009).** Production of gamma-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International Journal of Food Microbiology*.
- King, M. (2020).** *The biomedical biochemistry page*. Consulté le 4 25, 2020, sur <http://oinanthos.blogspot.com/2016/02/blog-post.html>
- Krieger, S., & Arnink, K. (2011).** Fermentación maloláctica: revisión de las últimas investigaciones sobre inoculaciones simultáneas y posibles combinaciones levadura-bacteria. *Infowine*, 11.
- Lallemand. (2013).** Lalvin VP41: *Oenococcus Oeni*. *Lallemand*, 2. Consulté le 08 16, 2020, sur <catalogapp.lallemandwine.com/uploads/bacteria/docs/65c29a3e10dd5e335017795df7bc0e4f214142d5.pdf>
- Liu, P.-T., Yu, K.-J., Li, Y.-T., Duan, C.-D., & Yan, G. L. (2018).** The content of linoleic acid in grape must influences the aromatic effect of branched-chain amino acids addition on red wine. *Food research international*.
- Liu, S. Q. (2002).** Malolactic fermentation in wine: beyond deacidification. *Journal of applied microbiology*, 589-601.
- Lonvaud-Funel, A., & Strasser de Saad, A. (1981).** Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes. *Applied and Environmental Microbiology*, 357-361.
- Martín-García, A., Balmaseda, A., Bordons, A., & Reguant, C. (2020).** Effect of the inoculation strategy of non-Saccharomyces yeasts on wine malolactic fermentation. *Vine and Wine Open Access Journal*, pp. 101-108.
- Mauricio, J., Millán, C., & Ortega, J. (1998).** Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces*

- cerevisiae and *Torulaspora delbrueckii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 405-410.
- Morata, A. (2018).** *Red wine technology*. Madrid, Madrid, España: Academic Press.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, C. (2008).** *Wine chemistry and biochemistry*. Madrid, Madrid, España: Springer Science & Business Media.
- Navarro, L., Zarazaga, M., Sáenz, J., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2000).** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Journal of applied microbiology*, 44-51.
- OIV. (2016).** *Código interancional de prácticas enológicas*. Consulté le 04 10, 2020, sur <http://www.oiv.int/public/medias/3752/f-code-i-31es.pdf>
- O'Kennedy, K. (2018).** Co-inoculación de levaduras y de mezcla de bacterias seleccionadas. *Enólogos*. Récupéré sur http://www.revistaenologos.es/coinoculaci%C3%B3n-de-levaduras-y-de-mezcla-de-bacterias-seleccionadas_divulgacion-empresarial_4.html
- Ostiz, I. O. (2016).** *Estudio preliminar de la composición volátil y sensorial de las variedades blancas autorizadas en la D.O.Ca Rioja*. Logroño: Universidad de La Rioja. Récupéré sur https://digital.csic.es/bitstream/10261/194515/3/Estudio_preliminar.pdf
- Petruzzi, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M., Bevilacqua, A., Spano, G., & Sinigaglia, M. (2017).** *Microbial resources an enological significance: opportunities and benefits*. Univesita di Foggia, Departamento de ciencia de la agricultura, alimentación y medio ambiente. Bolonia: Universita di Bologna.
- Pinu, F., Villas-Boas, S., & Martín, D. (2019).** Pre-fermentative supplementation of fatty acids alters the metabolic activity of wine yeasts. *Food research international*.
- Ramírez, M., & Velázquez, R. (2018).** *The yeast Torulaspora delbrueckii: an interesting but difficult-to-use tool for winemaking*. Universidad de Extremadura, Departamento de ciencias biomédicas. Badajoz: Universidad de Extremadura. Récupéré sur <https://www.mdpi.com/2311-5637/4/4/94>
- Redón, M., Guillamón, J. M., Mas, A., & Rozès, N. (2009).** Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature. *Europe Food Research and Technology*, 833-840.
- Renouf, V. (2013).** *La fermentation malolactice dans les vins*. París, Francia: Lavoisier.
- Ruiz de Villa, C. (2019).** *Lipidomic and metabolomic tools from colony forming units of wine microorganisms on agar plates*. Tarragona.
- Sáez, P. (2012).** *Urbina vinos*. Consulté le 08 22, 2020, sur <http://urbinavinos.blogspot.com/2012/04/fermentacion-malolactica-del-vino.html>
- Shelp, J., Bown, A., & McLean, M. (2009).** Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in plant science*.
- Sotiriou, P. (2016).** *Μηλογαλακτική Ζύμωση*. Consulté le 4 25, 2020, sur <http://oinanthos.blogspot.com/2016/02/blog-post.html>

- Torija, M. J., Beltrán, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J., Mas, A., & Rozès, N. (2003).** Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 1-10.
- Toukis, G., & Ueda, M. (1965).** The formation of succinic acid during alcoholic fermentation. Dans G. Toukis, & M. Ueda.
- Vasserot, Y., Dion, C., Bonnt, E., Tabary, I., Maujean, A., & Jeandet, A. (2003).** Transport of glutamate in *Oenococcus oeni* 8403. *International Journal of Food Microbiology*, 1-5.
- Velázquez Molinero, R. (2015).** *Estudio de nuevas levaduras killer Saccharomyces cerevisiae y Torulaspora delbrueckii para elaborar vinos tranquilos y espumosos*. Extremadura: Universidad de Extremadura.
- Vijakainen, S. K., & Laakso, S. V. (2000).** The use of malolactic *Oenococcus oeni* (ATCC 39401) for deacidification of media containing glucose, malic acid and citric acid. *European Food Research and Technology*, 438-442.

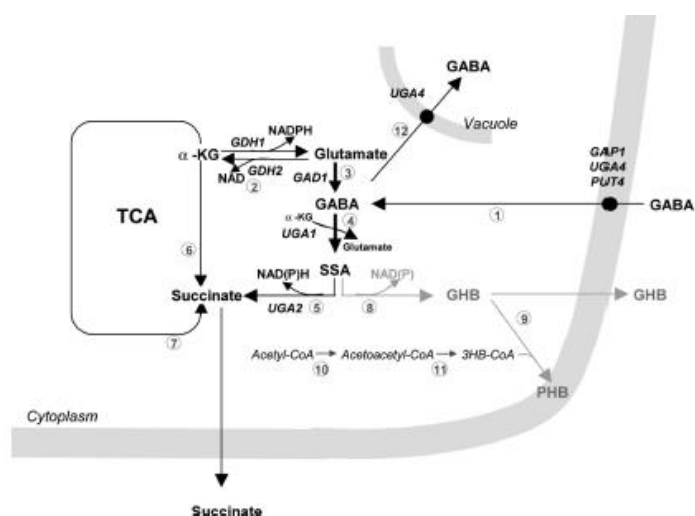


Figura 1. Transporte y metabolización del ácido γ -aminobutírico (GABA) por *Saccharomyces cerevisiae*.

Captación de GABA (flecha 1); formación endógena de GABA a partir de α -KG, que implica un enzima glutamato deshidrogenasa (flecha 2) y GAD1 (flecha 3); conversión de GABA en succinato a través de una transaminasa GABA (flecha 4) y una deshidrogenasa SSA (flecha 5); formación de succinato por oxidativo descarboxilación de α -KG a través del complejo α -KG deshidrogenasa (flecha 6); formación de succinato a través de la rama reductora del ciclo TCA, que implica fumarato reductasa (flecha 7); Reducción de SSA por GHB deshidrogenasa (flecha 8); polimerización de GHB y 3-HB por P (3HB-co-4HB) sintetasa (flecha 9); Formación de 3HB a partir de acetil-CoA que involucra una acetoacetyl-CoA tiasolasa (flecha 10) y una 3HB-CoA deshidrogenasa (flecha 11); e importación vacuolar de GABA (flecha 12). Las rutas metabólicas y los nombres de genes previamente identificados en la levadura se indican con líneas negras. Las rutas metabólicas identificadas en el presente estudio están indicadas por líneas grises (Bach et al., 2009).

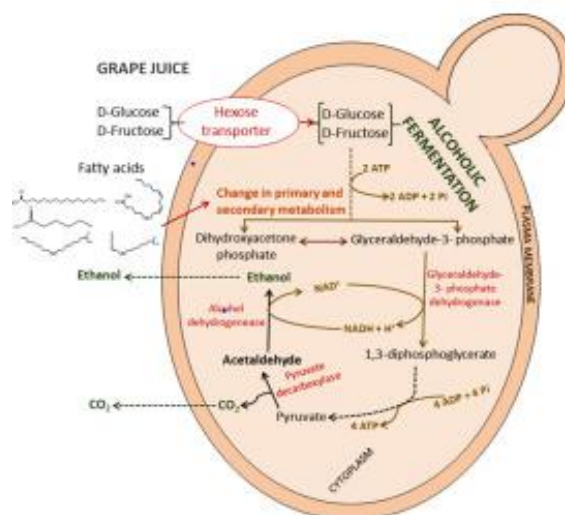


Figura 2. Suplementación pre-fermentativa de ácidos grasos (en este caso, ácido linoleico C18:2) y alteración que provoca en la actividad metabólica de las levaduras del vino (*Saccharomyces cerevisiae*).

Los azúcares (D-glucosa y D-fructosa) entran al medio intracelular a través de una hexosa que actúa como transportador. Se produce la glucólisis, donde los azúcares son transformados en ácido pirúvico. Éste compuesto por acción de una piruvato descarboxilasa se transforma en acetaldehído, liberándose CO₂ al medio. Finalmente, el acetaldehído se convierte en etanol, que es el producto principal de la fermentación alcohólica, gracias a un enzima alcohol deshidrogenasa. El suplemento con ácidos grasos provoca cambios en el metabolismo primario y secundario de la levadura (respiración y fermentación) (Farhana et al., 2020).

Tabla 1. Población (cél/ml) al inicio (día 0) y al final de la FAL en vino sintético a partir de QA23 y Biodiva + QA23 en diferentes condiciones.

	Condición	Población (cél/ml)
QA23	Control	0,00E+00 ± 0,00E+00
	C18:2	5,00E+05 ± 7,07E+05
	x2 GABA	1,00E+06 ± 0,00E+00
	C18:2 + x2 GABA	1,55E+07 ± 7,78E+06
B+Q	Control	0,00E+00 ± 0,00E+00
	C18:2	5,00E+05 ± 5,00E+05
	x2 GABA	1,00E+06 ± 0,00E+00
	C18:2 + x2 GABA	1,55E+07 ± 7,78E+06
QA23 (FIN)	Control	6,00E+07 ± 1,73E+07
	C18:2	4,67E+07 ± 1,53E+07
	x2 GABA	5,67E+07 ± 3,51E+07
	C18:2 + x2 GABA	7,00E+07 ± 3,46E+07
B+Q (FIN)	Control	2,67E+07 ± 5,77E+06
	C18:2	3,33E+06 ± 5,77E+06
	x2 GABA	3,67E+07 ± 1,53E+07
	C18:2 + x2 GABA	0,00E+00 ± 0,00E+00

Tabla 2. Cuadro resumen de los descriptivos de las diferentes condiciones del mosto a lo largo de la FAL con *S. cerevisiae* e inoculación secuencial (*S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*).

Fermentación Alcohólica (FAL)				
Tipo inoculación	Condición	Tiempo total de FAL (días)	V _{FAL} (g/L * día)	Ácido málico (g/L)
<i>S. cerevisiae</i>	Control	16 ± 0 ^a	10,44 ± 0,12 ^a	2,15
	C18:2	16 ± 0 ^a	10,26 ± 0,33 ^a	2,13
	X2 GABA	14 ± 0 ^{ab}	10,9 ± 0,47 ^a	2,18
	C18:2 + x2 GABA	13 ± 0 ^b	11,48 ± 2,75 ^a	1,98
<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Control	23 ± 0 ^a	7,13 ± 0,17 ^a	2,09
	C18:2	20 ± 0 ^b	8,74 ± 2,16 ^a	1,83
	X2 GABA	21 ± 0 ^b	7,57 ± 0,43 ^a	2,65
	C18:2 + x2 GABA	20 ± 0 ^b	9,39 ± 3,14 ^a	1,60

Tabla 3. Población (cél/ml) al inicio de la FML de las cepas VP41 y PSU-1 en vino sintético a partir de QA23 y Biodiva + QA23 en diferentes condiciones.

	Condición	VP41	PSU-1
QA23	Control	3,00E+06 ± 2,83E+06	1,00E+06 ± 0,00E+00
	C18:2	2,50E+06 ± 3,54E+06	1,50E+06 ± 7,07E+05
	x2 GABA	1,40E+07 ± 1,98E+07	0,00E+00 ± 0,00E+00
	C18:2 + x2 GABA	1,00E+06 ± 1,41E+06	0,00E+00 ± 0,00E+00
B+ Q	Control	3,00E+06 ± 2,83E+06	0,00E+00 ± 0,00E+00
	C18:2	5,00E+05 ± 7,07E+05	0,00E+00 ± 0,00E+00
	x2 GABA	4,00E+06 ± 4,24E+06	5,00E+05 ± 7,07E+05
	C18:2 + x2 GABA	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00

Tabla 4. Cuadro resumen de los descriptivos de las diferentes condiciones del vino con *S. cerevisiae* durante la FML con las cepas VP41 y PSU-1.

Fermentación maloláctica (QA23)				
Cepas <i>O. oeni</i>	Condición	Tiempo total de FML (días)	V _{FML} (g/L * día)	Ácido málico (g/L)
VP41	Control	3 ± 0 ^a	0,54 ± 0,01 ^a	0 ± 0 ^b
	C18:2	3 ± 0 ^a	0,51 ± 0,01 ^{ab}	0 ± 0 ^b
	X2 GABA	7 ± 0 ^b	-0,01 ± 0,08 ^c	1,8 ± 0,45 ^a
	C18:2 + x2 GABA	3 ± 0 ^a	0,41 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b
PSU	Control	3 ± 0 ^a	0,7 ± 0,06 ^a	0 ± 0 ^b
	C18:2	3 ± 0 ^a	0,61 ± 0,04 ^{ab}	0 ± 0 ^{ab}
	X2 GABA	7 ± 0 ^a	0,12 ± 0,13 ^{an}	1,64 ± 0,19 ^{ab}
	C18:2 + x2 GABA	3 ± 0 ^a	0,01 ± 0 ^b	1,99 ± 0 ^b

Tabla 5. Cuadro resumen de los descriptivos de las diferentes condiciones del vino con fermentación secuencial (*S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*) durante la FML con las cepas VP41 y PSU-1.

Fermentación maloláctica (B+Q)				
Cepas <i>O. oeni</i>	Condición	Tiempo total de FML (días)	V _{FML} (g/L * día)	Ácido málico (g/L)
VP41	Control	4 ± 0 ^b	0,37 ± 0,06 ^a	0 ± 0 ^b
	C18:2	6 ± 0 ^a	0,17 ± 0,06 ^a	0,88 ± 0,18 ^{ab}
	X2 GABA	8 ± 0 ^a	-0,01 ± 0,58 ^a	0,13 ± 0,02 ^{ab}
	C18:2 + x2 GABA	6 ± 0 ^{ab}	0,11 ± 0 ^a	1,09 ± 0 ^a
PSU	Control	5 ± 0 ^b	0,12 ± 0,01 ^a	1,02 ± 0,01 ^a
	C18:2	6 ± 0 ^a	0,5 ± 0,06 ^a	0,43 ± 0,02 ^a
	X2 GABA	7 ± 0 ^a	-0,02 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,07 ^a
	C18:2 + x2 GABA	6 ± 0 ^{ab}	0,01 ± 0 ^a	1,06 ± 0 ^a

Tabla 6. Grado de significancia del ANOVA de dos factores (C18:2 y GABA) y su interacción en la composición en ácidos grasos celulares, relación ácidos grasos insaturados y saturados y el grado de insaturación. MCFA, ácidos grasos de cadena media; SFA, ácidos grasos de cadena larga saturados, UFA, ácidos grasos de cadena larga insaturados. Valores en negrita indican una diferencia significativa respecto al $p < 0,05$.

	p values		
	Levadura	Condición	Levadura * Condición
MCFA	0,058	< 0,0001	0,039
SFA	0,198	0,0004	< 0,0001
UFA	0,929	< 0,0001	< 0,0001
UFA/SFA	0,070	< 0,0001	0,0009
Grado de Insaturación	< 0,0001	< 0,0001	0,0008

Los resultados de esta tabla muestran que pudo observarse que una inoculación sólo con *S. cerevisiae* o secuencial con *T. delbrueckii* (columna de levaduras) puede inducir diferencias significativas en el grado de insaturación de los ácidos grasos, puesto que el valor resultante es inferior a 0,05. Por otro lado, y en base a los datos obtenidos, se ha visto que un cambio en la composición química del medio (no aditivos, adición de C18:2, GABA y ambos simultáneamente) causa diferencias significativas en todos los parámetros analizados. Esto permite concluir que la variación en la condición del vino provoca una mayor modificación en el porcentaje de ácidos grasos y en el grado de insaturación de los mismos, en comparación con el tipo de levaduras que se inocule. Por último, es necesario hacer hincapié en el hecho de que la condición y la combinación de este factor con el tipo de inoculación (columna de levadura * condición) provoca también un efecto significativo sobre los cinco parámetros analizados.