

**COMBINACIÓN DE ESTRATEGIAS PRE-FERMENTATIVAS Y FERMENTATIVAS
PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE ALCOHOL Y EL pH EN VINOS MALBEC**

MARIA JULIA CATELEN

DIRECTOR: Dr. Martin Leandro Fanzone

CODIRECTOR: Dra. Yolanda Paola Maturano

TESIS PRESENTADA PARA CUMPLIR CON LOS REQUISITOS DEL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN VITICULTURA Y ENOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

Facultad de Ciencias Agrarias

JULIO 2022

DEDICATORIA

Dedico esta tesis al tiempo. A los tiempos difíciles vividos en el año 2020 y el 2021, que se llevaron a muchos seres queridos que me siguen acompañando pero que han generado que crezca como persona. Años que pusieron a prueba la educación, la salud, la sociedad pero que han generado un debate muy enriquecedor que me y nos fortalece cada día.

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su perspectiva científica y humana han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.

A mi director Martin Fanzone y a mi codirectora Paola Maturano por su orientación, soporte, acompañamiento y la discusión crítica que me permitieron un buen aprovechamiento del trabajo realizado y la anhelada finalización y presentación de esta tesis.

Quiero agradecer a las instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis. Al Instituto Estación Experimental Agropecuaria Mendoza - Nacional de Tecnología Agropecuaria– (EEA - INTA) por brindarme el espacio, el soporte, el tiempo y las personas que me han apoyado mucho en mi carrera académica. A Santiago Sari, Aníbal Catania, María Mestre, Mariana Combina, Viviana Jofré, y todas las personas que trabajan allí y que me han compartido su conocimiento. Así como a María González-Miret de la Universidad de Sevilla, a Fabio Vázquez del CONICET y Yolanda Maturano del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de San Juan. A la Universidad Nacional de Cuyo que me abrió las puertas al mundo científico que ha logrado cautivarme. Agradezco la pasión de sus profesionales por lo que enseñan y transmiten.

A Grupo Peñaflores por haberme introducido al mundo vitivinícola y haberme permitido acceder al mundo científico y al conocimiento que el espacio de la maestría abre a quienes trabajamos en la industria del vino.

A mi familia, pareja y amigos que prestaron su tiempo y orejas para canalizar todas las emociones y sentimientos que este trabajo despertó en mí. Gracias por estar siempre.

RESUMEN

Los vinos actuales que presentan elevado grado alcohólico y alto pH, son resultado de la preferencia por parte de los consumidores de vinos de color intenso, con aromas a fruta madura y de gran cuerpo. Adicionalmente, en algunas de las regiones vitivinícolas, las condiciones climáticas en los últimos años han provocado un importante retraso en la fecha de vendimia para lograr una adecuada madurez fenólica en las variedades de uva tinta. En consecuencia, se han evidenciado problemáticas de índole microbiológico, tecnológico, sensorial y económico en los vinos que presentan dichas características.

El presente estudio tuvo como objetivo brindar una alternativa tecnológica a esta problemática, combinando el *blend* de vinos obtenidos de uva con distintos momentos de cosecha y la inoculación de levaduras regionales, para reducir simultáneamente el grado alcohólico y el pH de los vinos Malbec, sin alterar su calidad química y sensorial. Con este fin, se utilizaron uvas Sauvignon Blanc cosechadas al inicio de la etapa de madurez (2017), con 10 °Brix, para obtener un vino de alta acidez y bajo contenido alcohólico (RV), el cual fue utilizado en un *blend* con uvas Malbec que alcanzaron su madurez fenólica, a los 24 °Brix. Las uvas Malbec se cosecharon en dos momentos diferentes: al alcanzar 22 °Brix (1C) y 24 °Brix, (2C). De la 2C, se reemplazó una parte del jugo de uva con RV como estrategia para la reducción de alcohol (2RV). Se obtuvieron, de esta forma, nueve vinos por triplicado que incluyeron, mostos 1C, 2C, 2RV con tres estrategias fermentativas: Co, Co-inoculación de levaduras autóctonas *Hanseniaspora uvarum* BHu9/*Saccharomyces cerevisiae* BSc114; BSc114, levadura regional *S. cerevisiae* BSc114; y EC1118, levadura comercial *S. cerevisiae* EC 1118. Se encontró que los vinos 2RV, fermentados con diferentes cepas de levadura, mostraron niveles similares de fenoles totales, taninos, antocianinas y pigmentos poliméricos que los vinos control (2C). En todos los casos, estos vinos presentaron mayor potencial fenólico que los vinos de 1C. A su vez, los vinos 2RV presentaron 1,4% v/v menos de alcohol que los vinos 2C, logrando también una disminución de 0,3 unidades de pH. Los tratamientos combinados con cepas regionales, especialmente como monoinóculo (2RV–NS), fueron los más efectivos en la reducción de ambos parámetros, mostrando concentraciones más altas de taninos, antocianos y saturación de color, sin afectar la calidad sensorial, en términos de intensidad de aromas y sensación en boca.

PALABRAS CLAVES

Vinos de alcohol reducido

Levaduras regionales

Blend de vinos

Compuestos fenólicos

Análisis sensorial

ABSTRACT

Present-day wines that have a high alcohol content and pH are the result of consumer preference for wines with intense color, ripe fruit aromas, and full-bodied mouthfeel. Additionally, in some of the wine-growing regions, weather conditions in recent years have caused a significant delay in the harvest date to get adequate phenolic maturity in red grape varieties. Consequently, microbiological, technological, sensory and economic problems have been evidenced in wines with these characteristics.

The aim of this study was to provide a technological alternative to this problem, combining the blending of wines obtained from grapes at different harvest points and the inoculation of native yeasts, to simultaneously reduce the alcoholic content and the pH of Malbec wines without changing the chemical and sensory quality. For this purpose, Sauvignon Blanc grapes harvested at the beginning of the maturity stage (2017) with 10 °Brix, were used to obtain a high acidity, low alcohol content wine (RV), which was blended with Malbec grapes that reached their phenolic maturity. Malbec grapes were harvested at two different times: at 22 °Brix (1C) and 24 °Brix (2C). From 2C, a part of the grape juice was replaced with RV as a strategy for alcohol reduction (2RV). Thus, nine wines were obtained in triplicate that included 1C, 2C, 2RV with three fermentation strategies: Co, co-inoculation of native yeasts *Hanseniaspora uvarum* BHu9/*Saccharomyces cerevisiae* BSc114; BSc114, native yeast *S. cerevisiae* BSc114; and EC1118, commercial yeast *S. cerevisiae* EC 1118. It was found that 2RV wines, fermented with different yeast strains, showed similar levels of total phenolics, tannins, anthocyanins and polymeric pigments than control wines (2C). In all cases, these wines presented higher phenolic potential than the 1C wines. At the same time, the 2RV strategy produced wines with 1.4% v/v less alcohol than the 2C wines, also achieving a pH of 0.3 units less. Combined treatments with native strains, especially as single inoculum (2RV– BSc114), were the most effective in reducing both parameters, showing higher concentrations of tannins, anthocyanins and color saturation, without affecting sensory quality, in terms of aromas and mouthfeel intensity.

KEY WORDS

Low-alcohol wines

Native yeasts

Vintages blending

Phenolic compounds

Sensory analysis

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN.....	iii
PALABRAS CLAVES	iv
ABSTRACT	v
KEY WORDS	vi
INDICE	vii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Antecedentes.....	1
1.1. Vinos desequilibrados. Aumento del alcohol en vinos.....	1
1.2. Calentamiento global como factor adicional.....	2
1.3. Consecuencias del desequilibrio.....	3
1.4. Alternativas tecnológicas	5
1.4.1. Desarrollo Vitícola	6
1.4.1.1. Nuevas vides, clones y portainjertos.....	6
1.4.1.2. Nuevas zonas de producción.....	7
1.4.2. Prácticas vitícolas.....	8
1.4.2.1. Deshoje	8
1.4.2.2. Aumento de carga.....	9
1.4.2.3. Riego precosecha.....	10
1.4.2.4. Reguladores de crecimiento	10
1.4.2.5. Cosecha temprana.....	11
1.4.3. Practicas prefermentativas	11
1.4.3.1. Dilución.....	11
1.4.3.2. Tratamientos enzimáticos	12
1.4.3.3. Blending de mostos.	12

1.4.3.4. Remoción de azúcar por filtración de membrana.....	13
1.4.4. Practicas fermentativas y posfermentativas.....	13
1.4.4.1. Levaduras de baja productividad de etanol.....	13
1.4.4.2. <i>Blend</i> de vinos.....	16
1.4.4.3. Métodos físicos:.....	16
1.4.4.3.1. Membranas de filtración.....	17
1.4.4.3.2. Columnas de cono giratorio:.....	18
2. Formulación y fundamentación.....	19
3. Hipótesis de trabajo.....	21
3.1. Hipótesis General.....	21
3.2. Hipótesis Específicas.....	21
4. Objetivos.....	21
4.1. Objetivo General.....	21
4.1. Objetivos Específicos.....	22
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1. Microorganismos para la fermentación alcohólica.....	23
2. Material vegetal.....	23
3. Cosecha.....	23
4. Elaboración del “vino verde”.....	24
5. Vinificaciones y diseño experimental en bodega.....	24
6. Seguimiento Microbiológico de las fermentaciones.....	26
7. Determinaciones analíticas y sensoriales.....	26
7.1. Parámetros analíticos generales de uvas y vinos.....	26
7.2. Determinación de parámetros fenólicos generales:.....	27
7.3. Determinación de compuestos fenólicos individuales:.....	27
7.4. Análisis sensorial descriptivo:.....	28
7.5. Análisis estadístico de los datos:.....	29
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
1. Crecimiento de las levaduras y cinética fermentativa.....	31

2. Parámetros analíticos generales de los vinos Malbec	35
3. Parámetros fenólicos generales de los vinos	38
4. Color del vino	41
5. Perfil antociánico de los vinos Malbec	45
6. Análisis sensorial descriptivo	52
IV.CONCLUSIONES.....	56
V.BIBLIOGRAFÍA	58

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1: Resumen de estrategias tecnológicas para reducción de grado alcohólico y pH en vino.....	5
TABLA 2.1. Descriptores generados por el panel para describir vinos con formulaciones de referencia.....	29
TABLA 2.2: Resumen de variables a analizar.....	30
TABLA 3.1. Parámetros analíticos generales de los vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de la vinificación.	37
TABLA 3.2. Valores de probabilidad (ANOVA de dos factores) para estrategias prefermentativas (TPF) y fermentativas (TF) para los parámetros globales fenólicos y el color en vinos Malbec.....	41
TABLA 3.3. Perfil de antocianinas no aciladas de vinos Malbec obtenidas aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de vinificación.	46
TABLA 3.4. Perfil de antocianinas acetiladas de vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de vinificación.	47
TABLA 3.5. Perfil de antocianinas cinamoiladas de vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de la vinificación.	49
TABLA 3.6. Perfil de piranoantocianinas tipo vitisina (A, B) de vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de vinificación.	50
TABLA 3.7. Perfil de aductos de hidroxifenil-piranoantocianinas y flavanol-antocianinas de vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de vinificación.....	51
TABLA 3.8. Valores probables (ANOVA de dos factores) para el tratamiento prefermentativo (TPF) y el fermentativo (TF) de antocianinas, piranoantocianinas (PA) y aductos directos en vinos Malbec.	52
TABLA 3.9. Perfil sensorial de vinos Malbec obtenidos aplicando estrategias prefermentativas (TPF) y fermentativas (TF) de vinificación.	53

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1:** Evolución de alcoholes mínimos de acuerdo con las resoluciones de alcoholes mínimos del año emitidas por el INV (Argentina). Fuente: resoluciones INV 1997/2021 para alcoholes mínimos del año. 2
- FIGURA 2.1.** Diseño experimental del ensayo. Combinación de estrategias prefermentativas y fermentativas. (13% ALC y 14,5% ALC hacen referencia al alcohol potencial de los mostos).25
- FIGURA 3.1.** Evolución de las poblaciones de levadura (Log UFC/mL) y producción de CO₂ (g/L) durante la fermentación de vinos Malbec obtenidos aplicando estrategias prefermentativas y fermentativas de vinificación: (a) 1C-EC1118, (b) 1C-NS, (c) 1C-Co, (d) 2C-CS, (e) 2C-NS, (f) 2C-Co, (g) 2RV-CS, (h) 2RV-NS y (i) 2RV-Co.....34
- FIGURA 3.2.** Parámetros fenólicos globales de vinos Malbec obtenidos aplicando estrategias prefermentativas y fermentativas de la vinificación. Letras diferentes para cada grupo de barras indican diferencias significativas (prueba Tukey HSD, $p < 0,05$).39
- FIGURA 3.3.** Parámetros CIELAB de vinos Malbec. (A) (a^*b^*) Diagrama; Chroma (C^*_{ab}) es un vector que une el punto (ubicación del vino) con el origen de coordenadas; hue (h_{ab}) es el ángulo de este vector. (B) Luminosidad (L^*).....42
- FIGURA 3.4.** Diferencias de color (ΔE^*_{ab}), con la contribución relativa de luminosidad, croma y tonalidad ($\% \Delta^2L$, $\% \Delta^2C$, $\% \Delta^2H$), entre vinos Malbec obtenidos aplicando diferentes tratamientos prefermentativos y fermentativos con diferentes cepas de levadura.....43
- FIGURA 3.5.** Perfil de antocianinas y pigmentos derivados de vinos Malbec obtenidos aplicando estrategias prefermentativas y fermentativas de la vinificación. Letras diferentes para cada grupo de barras indican diferencias significativas por ANOVA de dos factores (prueba Tukey HSD, $p < 0,05$).44
- FIGURA 3.6.** Análisis de componentes principales (ACP) de datos sensoriales descriptivos de vinos Malbec evaluados por un panel entrenado ($n = 12$). (A) mapa del factor vino. (B) atributos sensoriales con elipses de confianza del 95 % basadas en la distribución multivariada de la prueba de Hotelling ($p < 0,05$).55

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

1.1. Aumento del contenido alcohólico y vinos desequilibrados.

El contenido alcohólico de los vinos ha aumentado en los últimos años (Godden *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2010). De acuerdo con Bodenave *et al.* (2013) el tenor azucarino juega un rol crucial en la calidad del vino porque en gran parte determina el contenido alcohólico del vino y provee los precursores para otros compuestos y regula su síntesis. Adicionalmente, el cambio climático en curso afecta la fisiología de la vid y, en consecuencia, la calidad y tipicidad del vino (Schultz, 2000).

En este aspecto algunos países productores de vino han registrado en las últimas décadas un incremento en la concentración de azúcar en las bayas al momento de cosecha (Longo *et al.*, 2017). En el caso de los vinos californianos, el contenido azucarino ha subido desde valores cercanos a 21,4 °Brix en 1980 a 23,3 °Brix en 2008 (Alston *et al.*, 2013). Es decir, que este incremento del 11% del tenor azucarino se tradujo en un aumento de contenido alcohólico de los vinos resultantes (Alston *et al.*, 2013). Para el caso de los vinos de Australia, la concentración media de alcohol de los vinos tintos fue en aumento de 12,4% en 1984 a 14,5% en 2005, manteniéndose por encima de 14% desde 2006. Para vinos blancos y rosados se evidenció la misma tendencia (Godden *et al.*, 2015). En cuanto al contexto argentino, para el 2000 el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) fijó las concentraciones mínimas de alcohol para vinos en 11,6% , basándose en los muestreos de uva de la cosecha. Durante esa década se notó la misma curva de aumento de los contenidos de azúcar y, por lo tanto, de alcoholes obtenidos en vinos blancos y tintos, alcanzando 12% en 2010. En los años siguientes el incremento se enfatizó y en 2020 el alcohol mínimo para vinos tintos fue de 13,2% y para blancos y rosados 12,8% (Figura 1.1).

Ésta marcada tendencia se ha producido como consecuencia de las respuestas del mercado a la preferencia por parte de los consumidores de vinos de color intenso, aromas a fruta madura y de gran cuerpo (Varela, 2015; Zamora, 2016; Godden *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2010;). De esta forma los enólogos y agrónomos se han orientado a la producción de uvas maduras alcanzando un punto adecuado de madurez fenólica o tecnológica en la que los vinos obtenidos posean buena estructura y complejidad aromática (Kontoudakis *et al.*, 2011), lo cual conlleva una extensión por sobre el punto de madurez industrial, generándose un importante desfase entre la relación azúcar/acidez y la madurez óptima cualitativa de las uvas.

De este modo se enfatiza la tendencia hacia vinos desequilibrados de alta graduación alcohólica (Rolle *et al.*, 2018), baja acidez y pH elevados (Jones *et al.*, 2005).

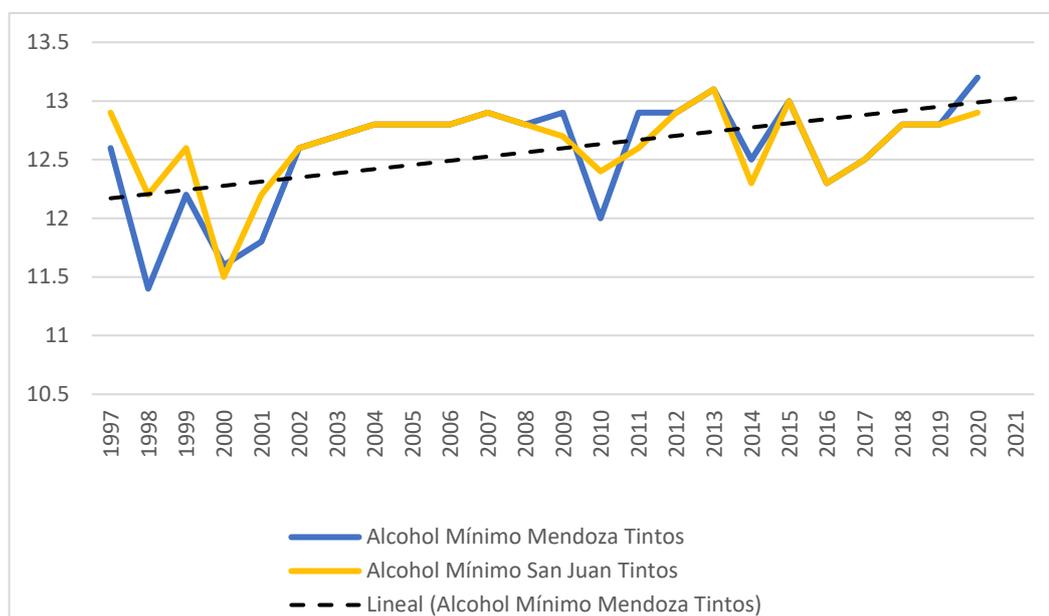


FIGURA 1.1: Evolución de alcoholes mínimos de acuerdo con las resoluciones de alcoholes mínimos del año emitidas por el INV (Argentina). Fuente: resoluciones INV 1997/2021 para alcoholes mínimos del año.

1.2. Calentamiento global como factor adicional

Adicionalmente a las tendencias del mercado y a las preferencias de los consumidores, el calentamiento global no hace más que acentuar un importante desfasaje entre los puntos de madurez (Mira de Orduña, 2010). De acuerdo con Keller (2010) y van Leeuwen (2016), el aumento de las temperaturas producirá un adelanto del proceso fenológico de la vid. Es decir, adelanto de las fechas de floración, envero y cosecha. La floración temprana implicaría un periodo de maduración en épocas más calurosas del año. De esta forma la uva cosechada tendrá mayor concentración de azúcar, y menor concentración de ácidos y antocianos, entre otros. Aunque el ácido tartárico de la uva sea más estable ante los cambios de temperaturas, el ácido málico se degrada más fácilmente durante la maduración, por lo que disminuye su concentración (Martínez *et al.* 2016) y, en consecuencia, aumenta el pH. Este contexto derivará en un cambio químico cualitativo de la composición de las uvas cosechadas, y, por lo tanto, de los vinos resultantes (Mozell *et al.*, 2014).

1.3. Consecuencias del desequilibrio

Altas concentraciones de azúcar en las uvas que derivan en vinos con alta graduación alcohólica pueden conducir a problemas de índole microbiológico, tecnológico, sensorial y económicos.

Desde el punto microbiológico, contenidos elevados de etanol pueden provocar fermentaciones detenidas o enlentecidas (Gil *et al.*, 2013). Las altas concentraciones de azúcares en los mostos inhiben el comienzo de la fermentación porque saturan los receptores proteicos de las levaduras, así también como generan un ambiente estresante para estos organismos provocando desvíos (subproductos de la fermentación no deseados) en los procesos de fermentación (Ferreira *et al.*, 2006). Por otro lado, en caso de que la fermentación alcohólica se desarrolle sin problemas, al alcanzar ciertas concentraciones de etanol, las levaduras mueren intoxicadas (Coulter *et al.*, 2008) dejando concentraciones elevadas de azúcares residuales, lo cual implica un riesgo dado que otros microorganismos, tales como levaduras y bacterias contaminantes, pueden prosperar y alterar irreversiblemente al producto.

Por otro lado, valores elevados de pH en los vinos implican ciertos problemas a nivel del color, de la conservación y de la estabilidad microbiológica del vino. En primer lugar, la problemática respecto al color surge de que al pH de la mayoría de los vinos las formas antociánicas (catión flavilium – de coloración roja-, base quinoidal- azul-, hemiacetal – incolora-, chalcona – incolora-) se encuentran en equilibrio (Fanzone, 2012), pero éste varía cuando el pH cambia. Las formas antociánicas coloreadas disminuyen al aumentar el pH de los vinos, pues se favorece la forma incolora hemiacetal, que deviene en una reducción del color del vino (Dangles *et al.*, 2018; Fanzone, 2012, Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Respecto a la conservación y estabilidad microbiológica, en la industria vitivinícola suelen controlarse con la adición de anhídrido sulfuroso ya que posee actividad antioxidante y antiséptica. Agregado al mosto o vino, su función antiséptica dependerá de su fracción libre y, en particular, de la molecular que varía en función del pH (Ribereau Gayon *et al.*, 2006). La fracción molecular, y con mayor poder antimicrobiano, será mayor cuanto menor sea el pH: a pH 3.3 habrá un 3,13% de anhídrido molecular, mientras que a pH 3,8 será solo del 1% (Beech *et al.*, 1979). De esta forma habrá mayor riesgo de deterioro microbiológico a pH más elevados, sobre todo si estos valores no se controlan a comienzos de la fermentación alcohólica, en ausencia de etanol, conducen al aumento de la contaminación microbiana (Renouf *et al.*, 2007), permitiendo el desarrollo de microorganismos no deseados que producirán desvíos organolépticos desde etapas tempranas, tales como formación

de aminas biógenas o fenoles volátiles (Mira de Orduña *et al.*, 2010). En cuanto a la conservación, el vino se vuelve más sensible a procesos oxidativos cuando su pH es más elevado, pues incide sobre el potencial oxido reductivo del vino (Martinez *et al.*, 2016). De acuerdo a Paladino *et al.*, (2008) a mayor pH, mayor riesgo de oxidación del vino durante su conservación; adicionalmente, el pH condiciona el equilibrio entre las distintas fracciones de dióxido de azufre, siendo que a menor concentración de su forma libre y molecular el vino tendrá menor protección ante la oxidación.

En cuanto al aspecto sensorial, se debe tener en cuenta que el alcohol es el compuesto volátil más abundante del vino y juega un rol importante organolépticamente. Su concentración afecta la experiencia sensorial ya que interactúa con otros compuestos como los aromas – disminuyendo o aumentando su contribución al perfil aromático del vino - (Goldner *et al.*, 2009) y los taninos (Fontoin *et al.*, 2008). Además, aumenta la percepción de la viscosidad y el cuerpo y altera la de la astringencia, la acidez, el dulzor del vino (Fischer *et al.* 1994, Kutyna *et al.*, 2010; Contreras *et al.*, 2014). Adicionalmente, el alcohol induce la sensación de calor en el paladar (Jordao *et al.* 2015) y contribuye a aumentar la sensación de amargor (Noble, 1998). Los niveles elevados de etanol en los vinos pueden alterar la calidad sensorial de los mismos debido a un efecto de enmascaramiento de algunos componentes volátiles (Fischer *et al.*, 1994; Le Berre *et al.*, 2007; Wilkinson *et al.*, 2013) como los alcoholes superiores, ésteres y monoterpenos (Robinson *et al.* 2009; Frost *et al.* 2015) sobre todo cuando la temperatura de servicio es elevada (Gil *et al.* 2013). Es decir, que afecta de manera global la percepción del *flavour* del vino.

Otro aspecto negativo para los vinos de alta graduación alcohólica es el aspecto económico, puesto que en algunos países aplican impuestos cuando los niveles de etanol superan ciertos límites, lo cual repercute en el precio final del producto (Gil *et al.*, 2013; Contreras *et al.*, 2014). Este caso queda ejemplificado en el impuesto aplicado por el *Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau* (TTB) del gobierno de Estados Unidos al vino dependiendo su graduación alcohólica (TTB, 2021), en donde los vinos que superan el 14% de alcohol pagan 50 centavos de dólar más por galón, concentración fácilmente alcanzada en vinos de zonas cálidas (Mira de Orduña *et al.*, 2010). Por otro lado, en la actualidad se vincula la ingesta de alcohol y su consumo en exceso con efectos nocivos para la salud humana (Evans, 2013; Groenbak, 2009). Las altas graduaciones alcohólicas en las etiquetas desestimulan a los consumidores. Algunos estudios mencionan que los consumidores lo tienen en cuenta si van a conducir después de beber, pues buscan disminuir los efectos adversos del alcohol y para consumir más sin los efectos de un vino con mayor contenido de alcohol (Saliba *et al.*, 2013).

1.4. Alternativas tecnológicas

En respuesta a esta problemática, se han propuesto diversas alternativas tecnológicas con el fin de disminuir la concentración de etanol en los vinos obtenidos, así como para reducir su pH. Schmitt y Christmann (2019) clasificaron estas estrategias en desarrollo de vides, prácticas de viñedo, prácticas microbiológicas y enológicas:

TABLA 1.1: Resumen de estrategias tecnológicas para reducción de grado alcohólico y pH en vino.

DESARROLLO VITÍCOLA	Nuevas vides, clones y portainjertos	Duchene <i>et al.</i> , 2010, 2012, 2020; Torregrosa <i>et al.</i> ,2017; Clingeleffer <i>et al.</i> , 2011.; Gutiérrez-Gamboa <i>et al.</i> , 2019, 2020; Cohen <i>et al.</i> , 2012; van Leeuwen <i>et al.</i> , 2017; Carimi <i>et al.</i> , 2011; Peiró <i>et al.</i> , 2018, planteo Jakab <i>et al.</i> , 2013
	Nuevas zonas de producción	Schultz, 2000; Gutiérrez-Gamboa <i>et al.</i> , 2018
	Sistemas de conducción	Reynolds <i>et al.</i> , 1996; Mandelli <i>et al.</i> , 2008; Poni <i>et al.</i> , 2009; Giacosa <i>et al.</i> , 2015; Van Leeuwen, 2010
PRÁCTICAS VITÍCOLAS	Deshoje	Stoll <i>et al.</i> , 2010, 2013; Whiting, 2010; Paliotti <i>et al.</i> , 2013; Poni <i>et al.</i> , 2013, 2014; Filipetti <i>et al.</i> , 2015; Zufferey <i>et al.</i> , 2012; O'Brien <i>et al.</i> , 2021; Molitor <i>et al.</i> , 2011, Hed <i>et al.</i> , 2014
	Aumento de la carga por planta	Ford, 2007; Novello <i>et al.</i> , 2013; Kliewer y Dokoozlian, 2005; Cus, 2004.
	Riego precosecha	Fernandez <i>et al.</i> , 2013; Novello <i>et al.</i> , 2013; Mendez <i>et al.</i> , 2011
	Reguladores de crecimiento	Böttcher <i>et al.</i> , 2010; Symons, 2005; Hendgen <i>et al.</i> , 2021; Han <i>et al.</i> ,2004.
	Cosecha temprana	Bidon <i>et al.</i> , 2013, 2014
PRÁCTICAS PRE-FERMENTATIVAS	Dilución	Harbertson <i>et al.</i> , 2009; Varela <i>et al.</i> , 2015; Schelezi <i>et al.</i> , 2020; Schmitt <i>et al.</i> , 2019
	Tratamientos Enzimáticos	Petkova <i>et al.</i> , 2020; Bijela, 2011; Varela <i>et al.</i> , 2015; Pickering <i>et al.</i> , 1999a y b, 2001; Botezatu <i>et al.</i> , 2021
	Blending de mostos	Coetzee, 2021; Varela <i>et al.</i> , 2015
	Remoción de azúcar por filtración de membrana	Salgado <i>et al.</i> , 2015; Schmitt <i>et al.</i> , 2019; Garcia-Martin <i>et al.</i> , 2010
PRÁCTICAS FERMENTATIVAS Y POS-FERMENTATIVAS	Levaduras de baja productividad de etanol	Mestre <i>et al.</i> , 2016, 2017; Torija <i>et al.</i> , 2003; Ribereau Gayon <i>et al.</i> , 2006; Zamora, 2016; Varela <i>et al.</i> , 2015; Heux <i>et al.</i> , 2006; Kutyna <i>et al.</i> , 2010; Dequin <i>et al.</i> , 1999; Cuello <i>et al.</i> ,2017; Molina-Espeja, 2020; Arroyo-Lopez <i>et al.</i> (2010); Abalos <i>et al.</i> , 2011; Tilloy <i>et al.</i> , 2014; Zambonelli <i>et al.</i> , 1989; Azzolini <i>et al.</i> , 2012; Giovani <i>et al.</i> , 2012; Contreras <i>et al.</i> , 2014; Quirós <i>et al.</i> , 2014; Maturano <i>et al.</i> , 2012, 2019
	Blend de vinos	Kontoudakis <i>et al.</i> , 2011; Schelezki <i>et al.</i> , 2018; Piccardo <i>et al.</i> , 2019
	Métodos físicos: membranas de filtración (ósmosis inversa, nanofiltración, pervaporación, pertracción evaporativa, diálisis, destilación vacío)	Pickering, 1996, 2000; Carnacini <i>et al.</i> , 1989; Chinaud <i>et al.</i> , 1991; Marignetti <i>et al.</i> , 1992, Heux <i>et al.</i> , 2006; Gil <i>et al.</i> , 2013; Diban <i>et al.</i> , 2008, 2013; Mangindaan <i>et al.</i> , 2018; Schmitt <i>et al.</i> , 2019; Lisanti <i>et al.</i> , 2013; Margallo <i>et al.</i> , 2015; Schobinger <i>et al.</i> , 1986; Gomez-Plaza <i>et al.</i> ,1999; Petrozziello <i>et al.</i> , 2019
	Columnas de conos giratorios	Coviar 2017; Diban <i>et al.</i> , 2013; Schmitt <i>et al.</i> , 2019; Gonzalez-Huerta, 2006; Puigjaner <i>et al.</i> , 2020; Conidi <i>et al.</i> , 2020

1.4.1. Desarrollo Vitícola

Considerando que el calentamiento global puede alterar las prácticas de la vitivinicultura actual en los países productores y potenciales productores, se estudiaron y se siguen estudiando nuevas variedades de vid, clones y portainjertos capaces de retardar la acumulación de azúcares (Duchene *et al.*, 2012) o de controlar la relación entre ácidos orgánicos y potasio y las concentraciones de potasio totales, considerando que estas actúan como controladores de acumulación de azúcares (Duchene *et al.*, 2020).

1.4.1.1. Nuevas vides, clones y portainjertos.

Frente a las condiciones previamente mencionadas, los pies, genotipos y variedades que mantienen el potencial agua del tallo en las condiciones de calor (o en las condiciones del calentamiento global) así como las variedades hisohídricas, pueden disminuir la acumulación de azúcares y aumentar la de ácidos en la planta (Torregrosa *et al.*, 2017; Clingeleffer *et al.*, 2011.; Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2019).

Por otro lado, Duchene *et al.* (2020) realizaron un estudio sobre la posibilidad de orientar la selección de vides que se adapten al cambio climático, afirmando que es posible crear genotipos de vid con alta acidez por baya como resultado de altas concentraciones de ácido tartárico y bajas concentraciones de potasio, considerando que la baja cantidad de este catión puede ser útil para controlar la acumulación excesiva de azúcar, aunque sugieren más investigaciones al respecto.

Van Leeuwen *et al.* (2017) plantean que la heterogeneidad genética entre variedades ha sido explorada a través de la selección clonal, pero en el contexto del vino del siglo XX las plantas se han seleccionado buscando la maduración temprana y altos niveles de azúcar en baya en respuesta a la demanda del mercado (Cohen *et al.*, 2012; van Leeuwen *et al.*, 2017). Por lo que los clones del siglo XXI deberían ser seleccionados con el criterio opuesto, esto hace que el estudio de la heterogeneidad intravarietal sea considerado de gran importancia para elegir clones mejor adaptados a las nuevas necesidades que pueda haber en el futuro (Duchêne *et al.*, 2010; Carimi *et al.*, 2011; Peiró *et al.*, 2018). Así, el estudio de biotipos o clones que dentro de una misma variedad naturalmente ofrecen menor concentración de azúcar en la uva podría solucionar el problema de la obtención de vinos con elevada graduación alcohólica (Carimi *et al.*, 2011; Peiró *et al.*, 2018). En coincidencia con este planteo Jakab *et al.* (2013) plantean la posibilidad de encontrar dentro de las colecciones locales, que han quedado relegadas por no cumplir con las tendencias de mercado

previas, individuos que respondan positivamente a los retos que presentan tanto los cambios en las preferencias de los consumidores como los desafíos que presenta el cambio climático, de tal forma que se produzca una reelección y revalorización de variedades y clones previamente apartadas. Así, plantearon un ensayo en tres vendimias de características antagónicas: húmeda con retraso de cosecha, una con lluvias y temperaturas promedio, y una muy seca con temperaturas elevadas, donde analizaron la respuesta de las colecciones de la Universidad de Pecs (Hungría) con 1500 variedades diferentes. Las variedades autóctonas evidenciaron un comportamiento más adecuado para mitigar los efectos del cambio climático, como menor acumulación de azúcares.

En relación con los pies o portainjerto, hay estudios que discrepan. Van Leuween *et al.* (2019) y Cochetel *et al.* (2019) afirman que los pies influyen la variedad injertada y los pies tolerantes a la sequía hacen que las variedades sean capaces de crecer y rendir cuando el agua es limitada. Además, Martínez de Toda (2019) y Van Leuween (2017) aseguran que tienen una leve influencia en la fenología y se estima puede retrasar entre 2 y 6 días la madurez. De todas formas, menciona que los datos son escasos y son casi todos relacionados a las condiciones edafoclimáticas de la planta. Apoyándose en esta aseveración sugiere que respecto al estrés térmico en viticultura debería considerarse la selección de pies 110 Richter, 140-Ruggeri y 1103 Paulsen que se adaptan bien a estas condiciones.

Por otro lado, Harbertson y Keller (2012) estudiaron el efecto del material vegetal (vides de pie franco y diferentes combinaciones de variedad/portainjerto) sobre varios parámetros tanto en mosto como en vino, entre los cuales se encontraban sólidos solubles, acidez total, pH y polifenoles. Concluyeron que el portainjerto generaba pocas diferencias para dichos parámetros tanto en fruta como vino; mientras que los factores dominantes eran el vástago y luego, en menor medida, la añada (aunque esta última afectó significativamente la concentración de azúcares). Las plantas sin injertar presentaron mayor pH que las injertadas.

1.4.1.2. Nuevas zonas de producción

Otra alternativa consiste en la implantación de viñedos en nuevas zonas de producción (Schultz, 2000), la elección correcta del sistema de conducción, la orientación de hileras, el marco de plantación, (Reynolds *et al.*, 1996; Mandelli *et al.*, 2008; Poni *et al.*, 2009; Giacosa *et al.*, 2015). La ubicación resulta decisiva, ya que la acumulación de azúcar en la uva se retrasa en lugares fríos comparado con zonas más cálidas (Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2018). Por lo que implantar en zonas más frías

podría ser una solución lógica. La altitud y la latitud juegan un rol importante en esta toma de decisión, ya que a medida que aumenta la primera disminuye la temperatura y que el cambio climático está alterando la segunda, generando nuevas regiones potenciales de implantación. En lo que se refiere al sistema de conducción, orientación y marco de plantación se plantea una nueva perspectiva en la que se busque una menor exposición a la luz solar para obtener menor concentración de azúcar (Van Leuween, 2010), aunque estas variables, en general, tienen menos impacto estadísticamente significativo que la altitud (Gutierrez Gamboa *et al.*, 2020). Sin embargo, el inconveniente de estas opciones radica en el tiempo e inversión requeridos para su concreción.

1.4.2. Prácticas vitícolas

Desde el área vitícola se han evaluado diferentes prácticas que se adecuan a esta tendencia y a mitigar los efectos del cambio climático procurando disminuir la concentración de azúcar en la baya sin alterar el resto de los componentes, incluyendo los ácidos orgánicos (con el objetivo de disminuir el pH y mantener alta la acidez total). Dentro de las prácticas culturales en viñedo se encuentran la reducción del área foliar, el aumento de la carga por planta, el sombreado de racimos, la irrigación precosecha, la aplicación de antitranspirantes y la cosecha temprana. Estas técnicas parecen entregar buenos resultados y son aceptables pero los mismos son muy heterogéneos debido a suelos, clima, variedades, entre otros (Zamora, 2016). Adicionalmente, se están estudiando estrategias de desarrollo y selección de variedades, clones y portainjertos; aunque el inconveniente de estas opciones radica en el tiempo e inversión requeridos para su concreción.

1.4.2.1. Deshoje

Puesto que la concentración de azúcar en la baya está principalmente determinada por la relación área foliar/peso de fruta (Stoll *et al.*, 2010) y se considera independiente de la madurez fenólica y aromática (Varela *et al.*, 2015), varios autores han evaluado diferentes estrategias para disminuir su concentración alcanzando el punto de madurez tecnológica. En Riesling, Stoll *et al.* (2010, 2013) evaluaron distintas intensidades de deshoje posfloración tanto mecánica como manual obteniendo resultados positivos al lograr un retraso en la madurez de dos semanas y una reducción en el contenido azucarino del mosto en el tratamiento de poda severa posverano manual (60% de deshoje), frente a un tratamiento de deshoje mecánico, uno de aplicación de antitranspirante y a los tratamientos control. En otros ensayos,

el deshoje del 50% antes del envero en Syrah logró un retraso importante en la acumulación de azúcar sin alterar el rendimiento, pero provocó una disminución en la acumulación de antocianos (Whiting, 2010). En cuanto a deshoje practicado posenvero, se logró disminuir la cantidad de sólidos solubles al momento de cosecha y, aunque en algunos casos no cambió la composición para otros parámetros medidos (Paliotti *et al.*, 2013; Poni *et al.*, 2013), hubo ensayos en los que se vio alterada la composición antociánica con la aplicación de un antitranspirante (disminución del 15%) (Poni *et al.*, 2014) o que con deshoje del 50% en Sangiovese, y habiendo reducido los sólidos solubles un 5% (Filipetti *et al.*, 2015), afectó el rendimiento del año posterior (Zufferey *et al.*, 2012). En ensayos más recientes realizados sobre Cabernet Sauvignon en envero con tres tipos de deshoje no se obtuvieron resultados positivos en cuanto a reducción de concentración de azúcares y, en lo que se refiere a otros compuestos, incluyendo polifenoles y acidez total no fueron concluyentes (O'Brien *et al.*, 2021). Por lo tanto, las prácticas culturales en viñedo orientadas a la reducción de la relación hoja/fruto, han evidenciado numerosas veces buenos resultados, pero de manera inconsistente, lo cual puede conllevar un costo elevado sin lograr el objetivo esperado. Adicionalmente, se considera que, en zonas húmedas donde esta práctica busca además evitar la pudrición en el racimo, es cuestionable ya que podría exponerlo a una posterior susceptibilidad al daño por quemaduras solares (Molitor *et al.*, 2011, Hed *et al.*, 2014).

1.4.2.2. Aumento de carga

El aumento de carga sobre la planta (4 cargadores versus 2 cargadores) y el sombreado de racimos (50% versus 100%) evidenció resultados positivos para reducir la tasa de concentración de azúcar en ensayos llevados adelante en Sauvignon Blanc de Marlborough (Ford, 2007). Mayor carga por planta disminuyó significativamente el área foliar por brote y el grosor de cada brote, lo cual retrasó el inicio del envero y redujo la tasa de acumulación de azúcares en dos semanas. Aunque el pH y la acidez se mantuvieron, hubo variación en otros compuestos como la quercetina, los compuestos aromáticos y el nitrógeno. Novello *et al.* (2013) aseguran que de acuerdo con los estudios realizados por Kliewer y Dokoozlian en 2005, es fácil predecir una reducción de la acumulación del azúcar de bayas en viñedos que tienen un alto rendimiento unitario de uva que a menudo se asocia a una baja relación área foliar/peso de la uva (menos de 0.8 y 0,5 m²/kg, respectivamente, para sistemas de conducción VSP -*vertical shoot pruning*- y canopia dividido). Para esta práctica, Cus (2004) evaluó tres cosechas: en 2001 comprobó que, a mayor

carga, menor concentración de azúcar en baya, pero para los años subsiguientes destacó que no encontró diferencias significativas entre los tratamientos (40, 30 y 20 yemas por vid).

1.4.2.3. Riego precosecha

Una táctica evaluada ha sido la del riego precosecha mediante la cual se demostró que era posible reducir la acumulación de azúcar sin modificar la composición fenólica y calidad del vino en Cabernet Sauvignon (Fernandez *et al.*, 2013), dado que el agua de riego tardía permite reanudar el crecimiento de brotes en el momento central de acumulación de azúcar en la baya, y así fortalecer la fotosíntesis en la nueva vegetación y, por lo tanto, reducir los fotosintatos disponibles para los racimos (Novello *et al.*, 2013). Sin embargo, estudios realizados por Mendez *et al.* (2011) en la Bodega Gallo del Valle Central de California, demostraron que el riego precosecha impactó muy poco en la composición de la fruta, incluyendo la concentración de azúcar, no así la carga, con mayor impacto, y el riego durante la etapa de maduración, que afectaron significativamente la composición de manera global. Otras teorías, sostienen que el riego precosecha diluye los azúcares ya acumulados, pero también se produce el mismo efecto sobre el resto de los compuestos, incluidos los polifenoles. También es importante considerar que, de producirse esta disminución, solo generan reducciones muy leves.

1.4.2.4. Reguladores de crecimiento

Algunos estudios sugieren que la aplicación de reguladores de crecimiento en la zona de racimos o en el área de la canopia pueden resultar útiles para retrasar la acumulación de azúcares. La aplicación de auxinas (ácido 1-naftalenacético) produjo una mejora en la sincronización de acumulación de sólidos solubles en Syrah y la retrasó 10 días, pero finalmente no se detectó una diferencia respecto a los controles (Böttcher *et al.*, 2010). El uso y aplicación de inhibidores de hormonas de maduración natural, como los inhibidores de la biosíntesis de brasinoesteroides, pueden retardar la madurez industrial de la uva (Symons, 2005). La inducción de la senescencia mediante el uso de etefón resultó en mostos de menor concentración de azúcares, pero también repercutió en la concentración de prolina y el rendimiento de la vendimia siguiente, generando la disminución de ambos parámetros (Hendgen *et al.*, 2021). Los estudios presentados por Han *et al.* (2004) de aplicación de reguladores de crecimiento (giberelina, forclorfenurón y ácido abscísico) concluyen que estos tienen poca o ninguna influencia sobre los sólidos solubles totales y la acidez total.

1.4.2.5. Cosecha temprana

Otra alternativa de manejo en viñedo resulta de la cosecha temprana, en la que la uva entrega concentraciones de azúcares menores, con pH más bajos y con mayores valores de acidez total, el enfoque más lógico ante la situación del aumento de la graduación alcohólica. Pero esto resulta decisivo para definir el perfil final sensorial del vino, debido al desbalance entre acumulación de azúcares y madurez fenólica y aromática, pues la falta de madurez de los últimos en dicha etapa produciría vinos amargos y herbáceos (Kontoudakis, 2011; Goold *et al.*, 2017). Estudios realizados sobre el varietal Cabernet Sauvignon con cinco puntos de cosecha diferentes respaldaron esta afirmación, dado que los puntos extremos con 20,3 °Brix y 26 °Brix, conllevaron composiciones polifenólicas y aromáticas diferentes, disminución de isobutil-metoxipirazina, aumento de la concentración de antocianos y disminución neta del tanino total en uva (aumento de la relación tanino de hollejo/tanino de semilla) durante la maduración. Esto luego se reflejó en la concentración alcohólica de los vinos de 11,8 y 15,5%, respectivamente. Asimismo, los taninos y los antocianos aumentaron en los vinos de cosechas más tardías. En este caso la acidez total y el pH no fueron variables para tener en cuenta ya que fueron factores que se ajustaron en el método. Es decir que, se demostraron los cambios significativos que produce esta elección en el punto de madurez sobre el vino resultante. Adicionalmente, se considera que en dicho medio la química de la matriz está influenciada principalmente por la madurez de la uva y secundariamente por el metabolismo de la levadura en respuesta a cambios en la concentración de azúcar del mosto (Bidon *et al.*, 2013, 2014).

1.4.3. Practicas prefermentativas

1.4.3.1. Dilución

En cuanto a las prácticas prefermentativas y de vinificación: se ha descrito la dilución del mosto con agua antes del inicio de la fermentación (Harbertson *et al.*, 2009) como una técnica admisible, pero resulta ser una práctica estrictamente prohibida en la mayoría de los países vitivinícolas, entre ellos Argentina, y puede afectar también la calidad final del producto, ya que se diluyen junto con el azúcar, todos los compuestos presentes en el mosto. En 2020 en Australia y Nueva Zelanda se permitió la adición de un 7% sobre mostos sobremaduros para permitir un buen curso de la fermentación y evitar alcoholes excesivos, produciendo una disminución del alcohol potencial del 1% (Varela *et al.*, 2015), pero esta práctica no es permitida

en Sudáfrica y otros países (Coetzee, 2021; Gardner *et al.*, 2020, Teng *et al.*, 2020). Schelezi *et al.* (2020) sostienen que la dilución del mosto reveló caída de color, así como de los fenoles totales y de las concentraciones de taninos, paralelamente en sus estudios sensoriales se percibieron disminuciones en los atributos sensoriales como la "intensidad del sabor" y el "cuerpo" en relación con otros tratamientos y los testigos, así como la acentuación de estas características en los tratamientos con mayores adiciones de agua. Un aspecto positivo de la práctica es el incremento del volumen final que tiene un buen impacto en termino de ventas (Schmitt *et al.*, 2019).

1.4.3.2. Tratamientos enzimáticos

La capacidad de la enzima glucosa oxidasa de convertir la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, hace que la misma resulte atractiva como alternativa para la reducción de concentración de azúcar en mostos maduros, hasta un 28% si se trata directamente en el jugo (Petkova *et al.*, 2020), ya que evita que la molécula de azúcar se encuentre disponible para la levadura en etapas posteriores (Biyela, 2011). Sin embargo, esta enzima tolera bajas concentraciones de etanol (hasta 1%), requiere condiciones de aireación, produce niveles indeseables de ácido glucónico generando un aumento en la acidez total y reduciendo el pH, de manera que afecta las características sensoriales del vino final (Varela *et al.*, 2015). Además, debido a la producción de compuestos carbonilos que se pueden unir al dióxido de azufre (Pickering *et al.*, 2001), disminuye su acción como antioxidante y antiséptico, derivando en el amarronamiento del mosto y la reducción de los aromas frutales (Pickering *et al.*, 1999a y b). En relación al efecto sobre la acidez y el pH, estudios recientes analizaron su efecto en combinación con enzimas catalasas sobre el varietal Riesling, evidenciando efectos positivos sobre las características sensoriales a la vez que se logra reducir el pH en 0,7 puntos (Botezatu *et al.*, 2021).

1.4.3.3. *Blending* de mostos.

El *blending* consiste en el corte o mezcla entre mostos de baja concentración de azúcar con mostos de uvas más maduras con el fin de ajustar la concentración final de azúcar y, por lo tanto, el grado alcohólico del vino resultante. Se debe tener cuidado de no incrementar las características que aportan los mostos "inmaduros" al *blend*, ya que pueden impactar en el carácter sensorial del vino final (Coetzee, 2021), como por ejemplo la alta acidez, los fenoles inmaduros y *flavour* inmaduros (Varela *et al.* 2015).

1.4.3.4. Remoción de azúcar por filtración de membrana.

A través de la nanofiltración se podría remover parte del azúcar contenido en el mosto sobremaduro. Algunos estudios en mosto, evaluaron nanofiltraciones simples y dobles (teniendo mejores resultados con la doble nanofiltración) obteniendo reducción de hasta 2% en el alcohol de los vinos finales respecto a los controles (Salgado *et al.*, 2015). Sin embargo, es una práctica que no está aprobada por la legislación actual de muchos países, y además posee un alto coste económico, debido a la pérdida de volumen de vino que implica el tratamiento: para reducir 17 g/l, equivalente aproximadamente a 1% de alcohol menos se pierde un 7% del volumen inicial (Schmitt *et al.*, 2019). Además, debe tenerse en cuenta que junto con la disminución del azúcar también podría disminuir significativamente el color y el *flavour* comparado con otros vinos (Garcia-Martin *et al.*, 2010), por lo que se considera que esta técnica sería difícil de aceptar y aplicar (Varela *et al.*, 2015).

Los beneficios de la aplicación de técnicas prefermentativas se ven en la reducción de estrés de las levaduras a comienzos de la fermentación y la reducción de problemas en la cinética fermentativa, tanto alcohólica como maloláctica, que deriva en un manejo eficiente de sistemas fermentantes (Schmitt *et al.*, 2019).

1.4.4. Prácticas fermentativas y posfermentativas.

1.4.4.1. Levaduras de baja productividad de etanol

Por su parte, la intervención durante el proceso fermentativo mediante el uso de levaduras con baja productividad de etanol también ha sido evaluada (Mestre *et al.*, 2016, 2017). *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura más utilizada en la fermentación alcohólica del mosto debido a su tolerancia al estrés y a altas concentraciones de alcohol, así también como al anhídrido sulfuroso (Zamora 2016) y a su alta eficacia en conversión de hexosas a alcohol (Henderson *et al.*, 2012). Algunos estudios han evidenciado que el rendimiento de conversión de azúcares a etanol de dicha especie disminuye cuando la temperatura de fermentación aumenta (Torija *et al.*, 2003; Ribereau Gayon *et al.*, 2006). Sin embargo, las estrategias microbiológicas para reducir el etanol final en vinos, así también como para disminuir el pH, se ha enfocado en redireccionar la mayor parte de la conversión de azúcares del mosto a otros metabolitos diferentes al etanol (Zamora, 2016).

Esta estrategia de reducción de alcohol en vinos se ha abordado desde distintos enfoques: la ingeniería genética ha intervenido en determinados genes involucrados en el metabolismo del carbono para desviar la producción de etanol a otros

metabolitos de interés a la vez que conserva la *performance* fermentativa y los atributos deseables del vino (Varela *et al.*, 2015). Estos incluyen aumento de la producción de glicerol (Heux *et al.*, 2006; Kutyna *et al.*, 2010), ácido glucónico, aumento de la represión de la glucosa de la respiración y alteración de la relación NAD⁺/NADH, de las cuales la primera ha demostrado ser la estrategia más efectiva logrando una reducción de hasta 0,4% v/v (Varela *et al.*, 2015). Por otro lado, la expresión en levadura de vino del gen del lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus casei* también ha resultado en una concentración reducida de etanol (0,24% v/v) al desviar el carbono hacia la producción de ácido láctico, lo que a su vez ha conllevado a una disminución del pH (Dequin *et al.*, 1999). Más recientemente, Cuello *et al.* (2017) demostraron que a través de la inserción de proteínas truncadas en *Saccharomyces cerevisiae* obtuvieron levaduras con menor eficiencia en la producción de alcohol, obteniendo una reducción de hasta 1,89% v/v de etanol respecto al control. Estas estrategias crean un desequilibrio metabólico que puede afectar la calidad final del vino por lo que, para corregir esto, en general se desarrollaron más estrategias de ingeniería genética que reequilibren los productos finales (Molina-Espeja, 2020). Sin embargo, en la actualidad tanto los consumidores como los gobiernos tienen reparos frente a los organismos modificados genéticamente debido a cuestiones de salud y medio ambiente, lo que presenta grandes obstáculos para su aplicación y posterior comercialización (Fleet, 2008; Kutyna *et al.*, 2010).

Otro enfoque ha sido la selección y estrategia de evolución adaptativa: opuesto a la tendencia de reducción del etanol en vinos, la selección natural de *Saccharomyces cerevisiae* ha generado una selección de las especies más fuertes y resistentes, de manera que son las de mayor rendimiento, que ganan el medio a otros microorganismos y que maximizan el uso energético (Varela *et al.*, 2015). De todas formas, algunos estudios han logrado, a través de cruzamientos dentro de la especie, obtener cepas que producen vinos con menor concentración alcohólica (que sus vinos control), como por ejemplo Arroyo-Lopez *et al.* (2010) con el cruzamiento de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, fermentando a baja temperatura y con aumento de la producción de glicerol. Adicionalmente, la selección adaptativa a través de la exposición de las levaduras a condiciones específicas, naturales o no del mundo vitícola, ha logrado influir sobre el metabolismo de dichos organismos para lograr el objetivo planteado: así la adición de furfural puede generar una reducción del 0,6% v/v (Abalos *et al.*, 2011); la de cloruro de potasio genera un estrés osmótico que a través de las generaciones deriva en aumento de la producción de glicerol y, por lo tanto, disminución de la de etanol (hasta 1,3% en Syrah) (Tilloy *et al.*, 2014).

Un enfoque diferente ha sido la utilización de levaduras *no-Saccharomyces*: de acuerdo con Mestre *et al.* (2017) en los últimos años, se ha reevaluado la influencia de las levaduras *no-Saccharomyces* en el proceso de elaboración del vino; se avanzó en el conocimiento de la ecología, bioquímica, fisiología y biología molecular de las levaduras involucradas en la producción del vino y cómo impactan en su composición química y propiedades sensoriales (Pretorius, 2000; Fleet, 2003; Swiegers *et al.*, 2005, Ciani *et al.*, 2010). De esta manera, se puede inferir que la ecología de la fermentación es compleja y el impacto de las levaduras sobre el carácter del vino es más diverso que una simple fermentación de azúcares del mosto (Fleet, 2008, Ciani *et al.*, 2010). A través de los coinóculos *Saccharomyces cerevisiae/no-Saccharomyces* se busca obtener el beneficio de la fermentación espontánea sin los riesgos que puede conllevar el desarrollo sin control de estas levaduras iniciadoras, ya que se ha reportado que las levaduras *no-Saccharomyces*, que normalmente se encuentran presentes en las etapas iniciales de la fermentación alcohólica, pertenecientes a los géneros *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, contribuyen organolépticamente al producto final (Zambonelli *et al.*, 1989), ya sea aportando en *flavour* (Azzolini *et al.*, 2012) o textura (Giovani *et al.*, 2012). El uso de *no-Saccharomyces* para reducir el alcohol en vinos se propuso recientemente (Contreras *et al.*, 2014; Quirós *et al.*, 2014; Mestre *et al.*, 2017), obteniendo vinos de menor graduación alcohólica que los vinos control de monoinóculos de *Saccharomyces cerevisiae*: reducción del 0,9% v/v para Chardonnay y 1,6% para Syrah (Contreras *et al.*, 2014). Esta reducción se debe a que estas especies, en su proceso de respiración pueden oxidar los azúcares presentes en el mosto y/o a que su proceso fermentativo resulta menos eficiente que el de *S.cerevisiae* (Mestre *et al.*, 2017). Dentro de este enfoque se ha estudiado una técnica disponible que es el uso de inóculos controlados (mixtos o secuenciales) de levaduras regionales *no-Saccharomyces* con características específicas que contribuyan a la obtención de vinos con menor graduación alcohólica, pero que al mismo tiempo conserven o mejoren sus características sensoriales: baja productividad de etanol, elevada capacidad fructofílica (en la fruta sobremadura la fructosa excede a la glucosa), resistencia a altas concentraciones iniciales de azúcares y de anhídrido sulfuroso, así como fermentar a bajas temperaturas, soportar estrés oxidativo y no producir impactos organolépticos negativos en el vino final (Mestre *et al.*, 2017; Maturano *et al.*, 2012, 2019). Adicionalmente, Maturano *et al.* (2019) estudiaron las condiciones en las que se obtendrían los mejores resultados, consiguiendo reducciones significativas respecto a los controles (alcohol del control 14.5% (v/v) \pm 0.46 y 13.86% (v/v) \pm 0.06 y 13.76% (v/v) \pm 0.25 para sus coinóculos

de validación de condiciones óptimas de desarrollo), además de impactos sensoriales positivos, tal como plantea Ivit *et al.* (2020) en su *review* sobre el tema.

1.4.4.2. *Blend* de vinos

Varios autores han puesto en práctica el *blend* de vino de baja graduación alcohólica, bajo pH y alta acidez obtenidos de una cosecha prematura o de mostos verdes (en algunos casos a partir de racimos obtenidos del raleo), con un mosto que ha alcanzado la madurez fenólica (Kontoudakis *et al.*, 2011; Schelezki *et al.*, 2018; Piccardo *et al.*, 2019). En algunos casos el uso de carbón activado y bentonita en los mostos verdes asegura la decoloración y desodorización total de este componente. Estas técnicas se implementaron para los cultivares Barbera, Cabernet Sauvignon, Bobal, Merlot, Pinot Noir y Tannat, buscando la reducción de la concentración de alcohol y pH y el aumento natural de la acidez. Los resultados, en todos los casos evidenciaron que no se compromete la composición polifenólica (Schelezki *et al.*, 2018), el tratamiento aumenta el color de los vinos – debido a la disminución del pH y, en consecuencia, el aumento de las formas coloreadas de las antocianinas-, además no se encontraron diferencias significativas a nivel sensorial (entre los *blend* de vinos y vinos control) en las pruebas triangulares llevadas a cabo, mientras que se logró una reducción del alcohol de 0,9% v/v para Cabernet Sauvignon, 1,7% v/v para Merlot, 3% v/v para Bobal (Kontoudakis *et al.*, 2011), 2,8% v/v para Pinot Noir, 1,3% v/v para Tannat (Piccardo *et al.*, 2019), respecto a los vinos control. Los efectos fueron prometedores y de costos económicos aceptables, sin implementación o necesidad de grandes estructuras o maquinarias.

1.4.4.3. Métodos físicos:

Una opción contemplada en etapas posfermentativas es la implementación de métodos físicos y mecánicos sobre el vino para lograr una remoción (parcial o total) del etanol, como ser el uso de membranas de filtración, destilación al vacío o presión atmosférica, resinas de absorción (Pickering, 2000) y ósmosis inversa (Carnacini *et al.*, 1989; Chinaud *et al.*, 1991; Marignetti *et al.*, 1992, Heux *et al.*, 2006). Todas estas técnicas, en general, requieren de una inversión significativa en cuanto a infraestructura de la bodega y se han registrado impactos significativos en la composición del vino y sus atributos sensoriales (Varela *et al.*, 2015; Pickering *et al.*, 1996, Heux *et al.*, 2006). Adicionalmente, en algunas regiones aún no están autorizadas desde el especto legal (Schmitt *et al.*, 2019).

1.4.4.3.1. Membranas de filtración.

Ósmosis inversa (presión transmembrana): en este caso dos soluciones de diferente concentración se separan por una membrana semipermeable, a través de la cual pasarán el alcohol y el agua por ser moléculas pequeñas debido a la presión aplicada sobre la solución concentrada, luego se produce la reducción del alcohol y finalmente se vuelve a unir al concentrado inicial. Con una reducción de alcohol del 2%, se ven afectados significativamente el color y el contenido de polisacáridos en vino tinto sin impactar el resto de los atributos sensoriales (Gil *et al.*, 2013) al comparar con los vinos control. Adicionalmente, es un proceso que requiere presiones de funcionamiento altas para superar la presión osmótica de la bebida, lo cual puede requerir un alto consumo energético (Diban *et al.*, 2013; Mangindaan *et al.*, 2018).

Nanofiltración: se aplica presión sobre el líquido que atraviesa una membrana, como sucede en cualquier filtración. La aplicación de nanofiltración sobre vinos terminados evidencia buenos resultados para reducir la concentración alcohólica, pero con efectos de concentración de hasta el doble que el vino original, sobre los compuestos tales como azúcar, acidez total y extracto (Mangindaan *et al.*, 2018), por lo que se considera que esta práctica sería más sustentable al aplicarse sobre mostos.

Destilación osmótica o pervaporación: (gradiente de presión de vapor): se establece presión de vapor diferencial a través de una membrana hidrófoba. Esta práctica es utilizada normalmente como segundo paso en la osmosis inversa para reducir el alcohol del permeato obtenido del traspaso de la primera membrana (Schmitt *et al.*, 2019). Mediante esta práctica se logra reducir hasta un 5% la concentración de alcohol (Lisanti *et al.*, 2013), sin embargo, se ve afectado considerablemente el perfil sensorial de los vinos, ya que junto con el etanol se pierden los compuestos volátiles libres, afectando el *flavour* y el aroma en relación con los vinos control (Lisanti *et al.*, 2013). La *performance* es mejor cuando el tiempo y la remoción de alcohol es menor (Margallo *et al.*, 2015).

Pertracción evaporativa: de acuerdo con Diban *et al.* (2008) es una tecnología basada en membranas que requiere poca energía. Durante el proceso el vino se hace circular a través de un contactor de membrana de fibra hueca hidrofóbica mientras que una segunda fase (agua) fluye a través del otro lado de la membrana dentro del contactor de fibra hueca. La diferencia de presión parcial de los componentes volátiles, por ejemplo, el etanol, entre ambas fases crea la fuerza impulsora del proceso. De acuerdo con los autores las ventajas radican en que el proceso puede

realizarse a temperatura ambiente, mientras que su consumo energético es bajo debido a que no se requiere presurización del sistema y a que el extractante es barato, puesto que se utiliza agua. Las desventajas que se presentan en ensayos realizados para lograr la reducción del 2% del alcohol se perdieron un 20% de aromas en variedades Garnacha y Xarello (Diban *et al.*, 2013).

Diálisis: el agua proporciona el gradiente de concentración permitiendo que el alcohol fluya desde el vino hacia el agua. Al trabajar a baja temperatura se afecta mínimamente el sabor del vino además de trabajar sin presión, lo cual implica un bajo costo energético (Pickering, 2000). También se ha trabajado la diálisis del vino contra vino desalcoholizado, ya que la diferencia de presión solo es para el alcohol se trabajó la hipótesis de que el resto de los componentes no se vería afectado (Schobinger *et al.*, 1986). Se puede desalcoholizar el vino por completo, separando las fracciones de alcohol, agua y aromas volátiles y reincorporando la fracción volátil al producto desalcoholizado. Esto implica una pérdida significativa de aromas en el producto final (20%).

Destilación en vacío (presión parcial diferencial): se destila el vino usando un flujo continuo y se recupera el vino desalcoholizado y parcialmente desaromatizado, a menor temperatura de trabajo, teniendo menor pérdida de gusto y aromas (Coviar, 2017). Adicionalmente se pierde tanto volumen como alcohol se desea eliminar y se afecta la calidad del producto final ya que se elimina gran parte de los compuestos aromáticos del vino tratado, aunque parte de los aromas se devuelven al vino desalcoholizado (Schmitt *et al.*, 2019). Gomez-Plaza *et al.* (1999) obtuvieron una desalcoholización casi total al tratar un vino de 10.6% (v/v) y concluir el tratamiento al llegar a 0.3% (v/v), estudiando la pérdida de la fracción aromática durante el proceso. Otros estudios realizados por Petrozziello *et al.* (2019) sobre Chardonnay evidenciaron que en el vino desalcoholizado al 3,36% v/v (pérdida de etanol igual al 7,43% v/v, correspondiente a la vigésima y última fracción recondensada de su ensayo realizado en etapas), algunos compuestos volátiles ya no eran detectables ni cuantificables como el acetato de isoamilo, etilhexanoato, hexilacetato, n-hexanol, otros alcoholes con 6 átomos de carbono y octanoato de etilo.

1.4.4.3.2. Columnas de cono giratorio:

Se realiza la extracción de alcohol en dos pasos, primero se remueve la fracción aromática volátil y luego se separa el etanol desaromatizado, para después devolver la fracción aromática al vino desalcoholizado sin aromas. Resulta ser una operación larga, costosa (Coviar 2017) y de alto consumo energético (Diban *et al.*, 2013), cuya

infraestructura y tamaño es de grandes dimensiones lo que hace que sea aplicable solo en grandes plantas (no apropiada para uso móvil). Aunque se podría utilizar con múltiples fines: desalcoholización total, parcial y desulfuración (Schmitt *et al.*, 2019). Al momento se han ensayado desalcoholizaciones parciales -reducción de entre 1 y 2%v/v y hasta 25% de la concentración original- y totales -hasta 0,5%v/v- sin encontrar diferencias sensoriales significativas (Gonzalez-Huerta, 2006; Puigjaner *et al.*, 2020)

Es importante tener en cuenta que las metodologías de desalcoholización físicas, en general se caracterizan por la pérdida no deseada de características sensoriales y compuestos organolépticos, debido a que, generalmente, los compuestos aromáticos y orgánicos muestran afinidad por el etanol; por lo tanto, se eliminan simultáneamente (Conidi *et al.*, 2020). Asimismo, los análisis sensoriales de los estudios realizados evidencian que desalcoholizaciones mayores al 2% generan impactos considerables sobre los atributos sensoriales, puesto que su menor concentración de alcohol (respecto a vinos control) se refleja menor sensación en términos de cuerpo y complejidad (Schmitt *et al.*, 2019).

Rolle *et al.* (2020) en un estudio en el cual compara estrategias para la reducción de alcohol en vinos (adición prefermentativa de mosto tratado con osmosis inversa vs. co-inoculaciones de *no-Saccharomyces-Saccharomyces* vs. desalcoholización del vino mediante membrana) observó resultados negativos respecto a los vinos tratados por membrana ya que se produjo una reducción significativa de la concentración de ésteres (60%) y antocianinas (17%), independientemente del nivel de desalcoholización (hasta 2% v/v), respecto a los controles.

Otras técnicas de reducción de alcohol en vinos menos estudiadas son las resinas de absorción (Schmitt *et al.*, 2019) y el tratamiento con ultrasonido (Martinez-Perez *et al.*, 2020) sobre las cuales es necesario plantear diferentes ensayos con el fin de dilucidar si es útil para su aplicación.

2. Formulación y fundamentación.

Actualmente, la tendencia de consumo de vinos tintos está orientada preferentemente hacia productos con gran estructura, alta intensidad colorante, complejidad aromática y volumen en boca. Esta tendencia ha conducido a cosechas tardías con el fin de asegurar la madurez fenólica de las uvas (Morales *et al.*, 2015). Esta práctica resulta en un marcado incremento en el contenido de azúcares de las uvas, lo cual conlleva a un mayor contenido de etanol y pH en los vinos (Mira de Orduña, 2010).

En la industria del vino se están realizando muchos esfuerzos focalizados en la obtención de vinos con menor graduación alcohólica, pero sin dejar de responder a las exigencias del mercado. Existen antecedentes que reportan diversas estrategias de reducción de etanol, las cuales pueden aplicarse previo al proceso fermentativo o una vez finalizado el mismo. También se han descrito estrategias que intervienen directamente en el proceso de la vinificación (Ozturk *et al.*, 2014; Varela *et al.*, 2015).

Un desafío importante para la industria vitivinícola actual consiste en la obtención de herramientas sencillas, de fácil aplicación, bajo costo e impacto ambiental para la obtención de vinos con menores niveles de etanol, bajo pH y características organolépticas distintivas. En respuesta a esta necesidad, existen diversas estrategias evaluadas por otros autores que podrían aplicarse en el contexto de la industria vitivinícola local. Entre ellas, se puede mencionar el *blending* de cosechas que consiste en el reemplazo de una parte de mosto de uva con elevada concentración de azúcares por un vino con baja graduación alcohólica y pH, sin color ni olor, elaborado a partir de uvas inmaduras cosechadas en enero. Mediante la aplicación de esta técnica se han logrado resultados muy promisorios en distintas variedades tintas, obteniéndose una eficiente reducción de alcohol (2%) y pH (~0,2 unidades) en los vinos, sin modificar significativamente las propiedades sensoriales ni la composición fenólica de los mismos (Kontoudakis *et al.*, 2011; Schelezki *et al.*, 2018, Piccardo *et al.*, 2019).

Por otro lado, la estrategia de Co-inoculación con levaduras regionales *no-Saccharomyces-Saccharomyces* ha sido implementada exitosamente con diversos propósitos tales como reducir la acidez volátil (Salmon *et al.*, 2007; Bely *et al.*, 2008); estimular la producción de glicerol (Ferraro *et al.*, 2000); incrementar la complejidad aromática de los vinos (Clemente-Jiménez *et al.*, 2005; Maturano *et al.*, 2015) así como la intensidad colorante (Escudero-Gilete *et al.*, 2010) y la calidad sensorial (Hopfer *et al.*, 2012; Loira *et al.*, 2015), entre otros. En los últimos años, diversos autores han evaluado y seleccionado levaduras *no-Saccharomyces* con el fin de reducir los niveles de etanol en vinos (Longo *et al.*, 2017; Mestre *et al.*, 2017; Englezos *et al.*, 2015, 2016, Contreras *et al.*, 2015; Canonico *et al.*, 2016); además, se han propuesto diferentes estrategias de Co-inoculación de las levaduras *no-Saccharomyces-Saccharomyces cerevisiae* para tal fin (Ciani *et al.*, 2014; Mestre *et al.*, 2016, 2019; Maturano *et al.*, 2012, 2015a, 2019).

Sin embargo, no se han encontrado antecedentes reportados sobre la combinación de las técnicas mencionadas. Por consiguiente, el presente proyecto se focaliza en evaluar una alternativa tecnológica eficaz para reducir simultáneamente el contenido de alcohol y el pH de vinos tintos, sin alterar la matriz fenólica y aromática

ni los caracteres sensoriales de los mismos. A partir de los resultados obtenidos, se pretende proporcionar una herramienta sencilla y económica a la industria, sin la necesidad de utilizar equipamiento específico, para mitigar en parte el problema generado por el cambio climático.

3. Hipótesis de trabajo.

3.1. Hipótesis general

Mediante la combinación de estrategias prefermentativas (*blending* de cosechas) y fermentativas (inoculación de levaduras regionales *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*) se obtienen vinos Malbec con menores niveles de alcohol y pH, sin modificación significativa de la composición fenólica y atributos sensoriales.

3.2. Hipótesis específicas

El empleo de estrategias prefermentativas y fermentativas combinadas permite reducir significativamente el contenido de alcohol y el pH del producto final.

Los vinos obtenidos mediante la combinación de las estrategias prefermentativas y fermentativas mencionadas poseen una composición fenólica similar a los vinos control.

Los vinos obtenidos mediante la combinación de las estrategias tecnológicas propuestas poseen características organolépticas similares a los vinos control.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la combinación de estrategias tecnológicas prefermentativas (*blending* de cosechas) y fermentativas (inoculación de levaduras regionales *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*) para la reducción de la concentración de etanol y pH, sobre la composición química y las características organolépticas de vinos Malbec.

4.1. Objetivos específicos

Analizar la efectividad de la combinación de estrategias prefermentativas y fermentativas sobre la reducción del contenido de alcohol y pH de vinos Malbec obtenidos a escala piloto.

Determinar la influencia de los tratamientos mencionados sobre la composición fenólica de los vinos obtenidos.

Caracterizar sensorialmente los vinos obtenidos mediante la aplicación de las estrategias tecnológicas mencionadas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos para la fermentación alcohólica

Las estrategias fermentativas propuestas en el estudio consistieron en la utilización de las siguientes cepas de levaduras: cepa regional de *Saccharomyces cerevisiae* BSc114, cepa regional de *Hanseniaspora uvarum* BHu9 y cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (Lalvin, Canadá) – utilizada como control. Las cepas regionales, pertenecientes al cepario de levaduras del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de San Juan, fueron seleccionadas de acuerdo con los estudios realizados por Mestre *et al.* (2017) y se utilizaron siguiendo los protocolos reportados por Maturano *et al.* (2019) y Mestre *et al.* (2016). Por su parte, la fermentación maloláctica de todos los vinos obtenidos fue realizada mediante la inoculación de la cepa comercial VP41 (Lallemand, Canadá), siguiendo los protocolos establecidos por la empresa proveedora de estas.

Se implementaron tres tratamientos como estrategias fermentativas: Co-inoculación de *H. uvarum* BHu9/ *S. cerevisiae* BSc114, levaduras indígenas (Co); *S. cerevisiae* BSc114, levadura indígena (*BSc114*); *S. cerevisiae* EC1118, comercial (EC1118)

Para el tratamiento de Co-inoculación, se siguió el protocolo optimizado y validado en condiciones de laboratorio de Maturano *et al.* (2019), por lo que la cepa BHu9 se inoculó en el momento 0 en una concentración de 5×10^6 cel/ml y, a las 48h se inoculó de manera secuencial la cepa BSc114 en una concentración de 2×10^6 cel/ml. Para los otros tratamientos las levaduras se inocularon 2×10^6 cel/ml en el momento 0.

2. Material vegetal

El ensayo se realizó a partir de uvas cv. Sauvignon blanc y Malbec (*Vitis vinifera* L.) provenientes de viñedos comerciales representativos ubicados en Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina (68°51'O y 33°06'S).

3. Cosecha

Las uvas Sauvignon blanc se utilizaron para la obtención de un vino de baja graduación alcohólica y bajo pH, denominado “vino verde”, el cual se utilizó como estrategia prefermentativa (*blending* de cosechas) para responder a los objetivos planteados. Para ello, se procedió a la cosecha manual de racimos en la etapa de envero con un contenido aproximado de sólidos solubles de 10°Brix (6% v/v de

alcohol potencial) y 20-25 g/L de acidez total. La selección de dicha variedad blanca se justificó, por un lado, para evitar un aporte significativo de compuestos fenólicos, principalmente taninos, al vino verde; y, por otro lado, debido a la disponibilidad de la misma por parte de la empresa colaboradora.

Las uvas Malbec fueron empleadas en el ensayo de aplicación de estrategias tecnológicas combinadas. Para ello, la cosecha se realizó manualmente en dos momentos diferentes. El primero fue con un contenido de sólidos solubles de 22°Brix (grado alcohólico probable ~13%v/v) "1C" -225kg-; y el segundo cuando las bayas alcanzaron una óptima madurez fenólica (~24°Brix) "2C" -450kg- durante la vendimia 2017.

4. Elaboración del "vino verde"

Las uvas Sauvignon blanc fueron prensadas para obtener un jugo y separarlo de las partes sólidas, luego fue sulfitado (100 mg K₂S₂O₅/kg) y encubado en un tanque de acero inoxidable de 100 L (150kg). Después de un determinado tiempo de reposo (20 h), el jugo fue trasvasado a un nuevo tanque donde se inoculó la levadura comercial *S. cerevisiae* EC1118 (200 mg/kg). La fermentación alcohólica se condujo a 18 ± 1°C. Una vez completada esta etapa, el vino fue sulfitado (100 mg K₂S₂O₅/L) y conservado a 3±1°C hasta el momento de su utilización en los tratamientos propuestos. Acidez potencial de 25 g/l y alcohol potencial de 6% v/v.

5. Vinificaciones y diseño experimental en bodega

Todas las vinificaciones de uvas Malbec se realizaron a escala piloto en tanques plásticos de grado alimentario de 25 L de capacidad, siguiendo protocolos estándares establecidos por la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mendoza INTA).

Se aplicó un diseño experimental de 2 factores con 3 niveles por factor, consistente en 9 tratamientos con 3 réplicas (Figura 2.1). El factor "estrategias prefermentativas" estuvo compuesto de los siguientes niveles: uvas Malbec 22°Brix (**1C**), uvas Malbec 24°Brix (**2C**), uvas Malbec 24°Brix con agregado de vino verde (**2RV**). Para llevar a cabo la elaboración de los vinos **2RV**, se procedió específicamente a extraer una fracción determinada del volumen total de jugo y se reemplazó empleando un volumen adecuado del vino de elevada acidez y baja graduación alcohólica (vino verde, Sauvignon blanc). Este volumen fue calculado intentando reproducir el grado alcohólico probable del vino correspondiente al primer

momento de cosecha, con reemplazo de aproximadamente un 20% del mosto por vino verde, siguiendo la metodología propuesta por Kontoudakis *et al.* (2011). Por su parte, el factor “estrategias fermentativas” estuvo compuesto de los siguientes niveles: fermentación alcohólica conducida por inoculación de la levadura comercial EC1118 (**EC1118**), fermentación conducida por inoculación de levadura *S. cerevisiae* regional BSc114 (**BSc114**), fermentación conducida por Co-inoculación de cepas regionales *H. uvarum* BHu9 y *S. cerevisiae* BSc114 (**Co**). Los protocolos de Co-inoculación utilizados fueron los reportados por Mestre *et al.* (2016). De esta forma los tratamientos control estuvieron constituidos por las uvas Malbec del segundo momento de cosecha, inoculadas por la cepa de levadura comercial: **2C-EC1118**.

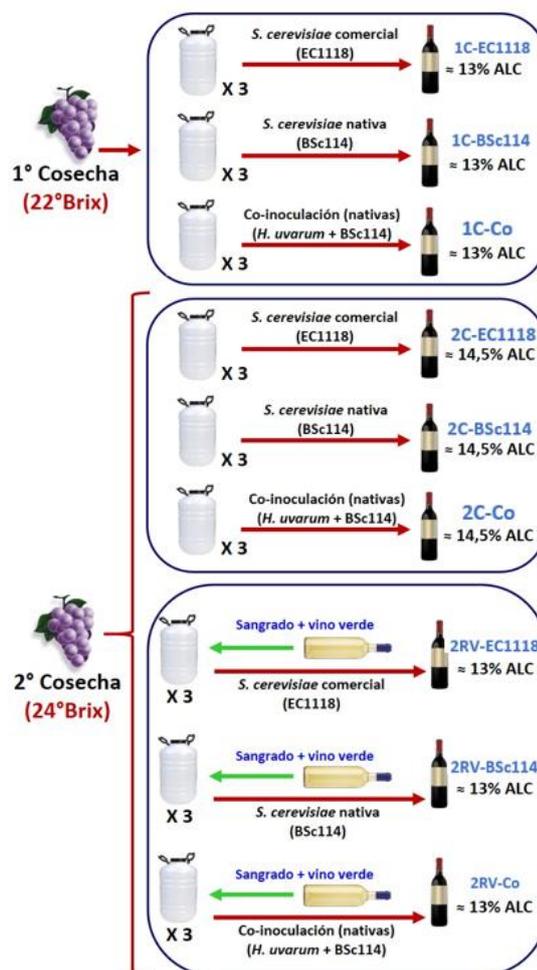


FIGURA 2.1. Diseño experimental del ensayo. Combinación de estrategias prefermentativas y fermentativas. (13% ALC y 14,5% ALC hacen referencia al alcohol potencial de los mostos).

En todos los casos, se procedió al descobajado, molienda, sulfitado (100 mg $K_2S_2O_5/L$) y encubado de las uvas en los tanques mencionados, los cuales fueron

posteriormente inoculados con levaduras seleccionadas de acuerdo con los tratamientos propuestos previamente, y mantenidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta completar la fermentación alcohólica. Se efectuaron dos bazuqueos diarios hasta una densidad de 1,020 g/ml y se ajustó el tiempo de maceración en 14 días. Las vinificaciones fueron controladas diariamente a través de la medición de densidad, temperatura y pérdida de peso de los sistemas fermentantes. Completado el tiempo de maceración, se realizó el descubado e inoculación de bacterias lácticas (VP41, 100 mg/L) para inducir la fermentación maloláctica. Una vez completada esta etapa, se realizó el sulfitado (100 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{L}$) y almacenamiento de los vinos a $3-4^\circ\text{C}$ durante 3-4 semanas para su estabilización tartárica. Finalmente, los vinos terminados fueron embotellados y conservados en posición horizontal ($13-15^\circ\text{C}$, 40-50% de humedad relativa, oscuridad) hasta el momento de análisis.

6. Seguimiento microbiológico de las fermentaciones

El monitoreo de las poblaciones de levaduras se llevó a cabo periódicamente mediante la toma de muestras de todos los sistemas fermentantes. Cada muestra fue sometida a diluciones seriadas y se inocularon en placas de Petri con medio diferencial WLN. Las placas fueron incubadas durante 5-7 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (Pallmann et al., 2001). Estas se utilizaron para comprobar la presencia de las levaduras regionales a través de comparación morfológica con las muestras de estudios anteriores.

7. Determinaciones analíticas y sensoriales

Todas las determinaciones analíticas se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Enología y del Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales de la EEA Mendoza INTA.

7.1. Parámetros analíticos generales de uvas y vinos.

A partir de 100 bayas seleccionadas aleatoriamente en el momento de cosecha de cada réplica de campo, se determinaron parámetros generales (peso y volumen de bayas, peso de hollejos y semillas), contenido de sólidos solubles (brix), pH y acidez titulable (ácido tartárico, g/L), siguiendo los procedimientos descritos por la OIV (2012). Por su parte, en los vinos terminados se determinó acidez titulable (ácido tartárico, g/L), acidez volátil (ácido acético, g/L), pH y contenido de alcohol (% v/v) (OIV, 2012) utilizando un ALPHA FT-IR Wine Analyzer (Bryker Optics, Ettlingen,

Germany) y un Alcoalyzer Wine® (Anton-Para GmbH, Austria). El rendimiento de etanol fue calculado a partir de la relación entre el azúcar necesario (azúcar inicial – azúcar final) en g/L y el porcentaje de etanol producido (%v/v). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

7.2. Determinación de parámetros fenólicos generales:

Las muestras se centrifugaron (11.000 g/ 5 min) y se filtraron por membrana 0.22mm (Microclar, Buenos Aires, Argentina) previo al análisis. Las mediciones de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-visible Model Lambda 25 (Perkin Elmer, Hartford, CT). Se realizó el análisis de fenoles, taninos y antocianos totales, junto con pigmentos poliméricos en vinos, por espectrofotometría UV-Visible (Harbertson *et al.*, 2003; Heredia *et al.*, 2006). Las determinaciones de color en vinos fueron realizadas mediante el sistema CIELAB de colorimetría tri-estímulo (L* para luminosidad, 0 negro y 100 blanco; C* para saturación o pureza; h_{ab} para tono y a* b* para rojo/verde y amarillo/azul respectivamente). Estos parámetros se calcularon a partir de las absorbancias espectrofotométricas utilizando Cromalab® software (Heredia *et al.*, 2004), siguiendo las recomendaciones de la Comisión *Internationale de L'Eclairage* (CIE, 2004). La diferencia de color (ΔE^*_{ab}) se calculó como la distancia Euclídea entre dos puntos en un espacio tridimensional (L*a*b*).

$$\Delta E^*_{ab} (L^*1, a^*1, b^*1; L^*2, a^*2, b^*2) = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

donde $\Delta L^* = L^*1 - L^*2$; $\Delta a^* = a^*1 - a^*2$ and $\Delta b^* = b^*1 - b^*2$. Los parámetros mencionados fueron evaluados a los 2 meses de almacenamiento en botella.

7.3. Determinación de compuestos fenólicos individuales:

La identificación y cuantificación de antocianinas y pigmentos derivados (monoglucósidos, derivados acilados, piranoantocianinas y aductos antociano-flavanol), ácidos fenólicos, flavonoles y dihidroflavonoles en los vinos (post-FML), y su posterior caracterización en cada tratamiento, se realizó por HPLC-DAD (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007; Fanzone, 2012;). Para ello se utilizó un cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer Serie 200 de alto rendimiento equipado con un detector de diodo, una bomba cuaternaria y un auto muestreador (HPLC-DAD; PerkinElmer, Shelton, CT), realizando la separación a 25°C en una columna C18 de fase reversa Chromolith Performance (100 mm x 4,6 mm D.I., 2 µm; Merck, Darmstadt, Alemania) con un

cartucho policía Chromolith (10 mm × 4.6 mm). El gradiente se compuso de un solvente A (agua/ácido fórmico, 90:10, v/v) y un solvente B (acetonitrilo) y se aplicó a un caudal de 1.1ml/min a 22 min y 1,5 mL / min de 22 a 35 min como sigue: 96–85% A y 4–15% B de 0 a 12 min, 85–85% A y 15–15% B de 12 a 22 min, 85–70% A y 15–30% B de 22 a 35 min; seguido de un lavado final con 100% metanol y reequilibrio final de la columna. Se filtraron 2 mL de vino (membrana de nylon de poro de 0.45 µm, Microclar, Buenos Aires, Argentina) y luego 100 µL de éste se inyectaron en la columna. La detección de diodo se realizó en el rango de absorbancias de 210 a 600nm y la cuantificación se realizó a partir la medición del área de los picos a 520nm. La cantidad de antocianinas se expresó usando cloruro de malvidin-3-glucósido como estándar para realizar la curva de calibración ($R^2=0,99$). La identificación y confirmación de los pigmentos de antocianina fueron realizado por HPLC-DAD / ESI-MS como se describe por Blanco-Vega *et al.* (2011).

7.4. Análisis sensorial descriptivo:

Todos los vinos obtenidos fueron evaluados tres meses después del embotellado por un panel capacitado de 12 voluntarios (8 hombres y 4 mujeres) de edad 26 a 48 años, incluidos investigadores y técnicos (EEA Mendoza INTA) con experiencia previa en cata de vinos. Para determinar si había diferencias entre las réplicas de vino de cada tratamiento se realizó un análisis discriminativo (test triangular). No se encontraron diferencias significativas entre las réplicas, por lo que se realizó un test sensorial descriptivo con nueve vinos, uno de cada tratamiento (Heymann y Lawless, 2010). Durante 4 sesiones se consensuó la terminología a utilizar, los estándares de referencia (Tabla 2.1), y se desarrollaron 4 sesiones de formación (de 1 hora cada una) realizadas en más de dos semanas. Los panelistas seleccionaron dos atributos para color (saturación de color y tono violeta), cuatro descriptores de sabor y sensación en boca (acidez, amargura, astringencia y volumen en boca) y cinco aromas (frutado, floral, herbáceo, especiado y balsámico). Después de la capacitación, se les solicitó a los panelistas que evaluaran los nueve vinos por triplicado durante tres sesiones. Cada una comenzaba con la evaluación de los estándares de aroma. Se utilizó el diseño de Cuadrado Latino de William para controlar los efectos de arrastre. Se sirvieron aproximadamente 30 a 40 ml de vino a 16–18 ° C en copas técnicas de degustación (ISO 3591, 1977) etiquetadas con códigos de tres dígitos. Para cada descriptor, los panelistas clasificaron la intensidad de cada vino en una escala de 1 a 10. Se recopilaron los datos utilizando Smartphones con el software SOLDESA (ISETA, Buenos Aires, Argentina). El

desempeño del panel fue monitoreado evaluando la correlación de los panelistas con la media del panel y por su contribución a la interacción panelista x vino para cada atributo. No se brindó información sobre la naturaleza del estudio para reducir el sesgo.

TABLA 2.1. Descriptores generados por el panel para describir vinos con formulaciones de referencia.

<u>Referencia de atributo</u>	<u>Formulación de referencia</u>
Saturación de color	NA*. Se refiere a la saturación general del color del vino observada al inclinar la copa 45° sobre un fondo blanco.
Tonalidad violeta	NA. Se refiere a la cantidad total de tono violeta de vino observada al inclinar la copa 45 ° sobre un fondo blanco.
Frutado	20 g/L de mermelada de ciruela (Emeth, Buenos Aires, Argentina)
Floral	1 mL de agua de rosas (Laborit, Buenos Aires, Argentina)
Herbáceo	1 ml de agua de cocción de espárragos + 2 g de pimientos verdes frescos picados (distribuidos por Carrefour, Buenos Aires, Argentina)
Especiado	1 g de pimienta de Jamaica molida + 1 g de canela molida (distribuida por Carrefour Buenos Aires, Argentina)
Balsámico	5 cápsulas de semillas de eucalipto
Acidez	2 g/L L-(+)-ácido tartárico (Derivados Vínicos, Buenos Aires, Argentina) en agua
Astringencia	0,43 g/L de sulfato de aluminio y amonio (Anedra Research AG S.A., Buenos Aires, Argentina) en agua
Amargor	1 g/L de cafeína (Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) en agua
Volumen en boca	1,5 g/L de sal sódica de carboximetilcelulosa (Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) en agua
NA: no aplica	

7.5. Análisis estadístico de los datos:

El análisis estadístico se realizó con el Software *Statgraphics Centurion XVI* (software estadístico Graphics Corp., Warrenton, VA, 2009) y R (R Core, 2018). Se testeó la homogeneidad de la varianza en todos los resultados (químicos y sensoriales), utilizando la prueba de Cochran, y se llevó a cabo un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) y Prueba de significancia de Tukey (HSD) ($\alpha =$

0.05). Se consideró que un $p < 0,05$ era estadísticamente significativo. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en todos los atributos sensoriales utilizando la matriz de correlación. Las elipses de confianza que indican intervalos de confianza del 95% se basaron en la distribución multivariada de la prueba de Hotelling para $p < 0.05$ y se construyeron utilizando la función *panellipse* de *SensoMineR* en R (Husson *et al.*, 2005). Cada ensayo y análisis propuesto se realizó por triplicado en forma independiente.

TABLA 2.2: Resumen de variables a analizar

	BAYAS	VINOS
PARÁMETROS GENERALES	Peso bayas	Acidez Titulable
	Volumen bayas	Acidez Volátil
	Peso hollejos	pH
	Peso semillas	Contenido de alcohol
	° Bx	Recuento de levaduras
	pH	
	Acidez titulable	
PARÁMETROS FENÓLICOS GENERALES		Fenoles
		Taninos
		Antocianos totales
		Pigmentos poliméricos
		CIE L*a*b*
COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA INDIVIDUAL		Antocianinas
		Pigmentos derivados
		Ácidos fenólicos
		Flavonoles
		Dihidroflavonoles
ANÁLISIS SENSORIAL		Homogeneidad de tratamientos. Test Triangular.
		Análisis cuantitativo descriptivo

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el impacto simultáneo de la reducción del contenido alcohólico y del pH sobre la composición fenólica y los atributos sensoriales de los vinos Malbec, se utilizaron dos estrategias: tratamiento prefermentativo (TPF, *blend* de vino verde con mosto) y tratamiento fermentativo (TF, cepas de levaduras). Los resultados indicaron que los vinos elaborados a partir del *blend* de mostos con madurez fenólica óptima con una proporción de vino de baja graduación alcohólica (2RV), fermentado con la cepa regional de *S. cerevisiae* (BSc114), evidenció diferencias químicas marcadas (menor graduación alcohólica y menores valores de pH en relación a los controles), así como mayor potencial fenólico, sin afectar la calidad sensorial en términos de color, aromas y sensación en boca.

1. Crecimiento de las levaduras y cinética fermentativa

Como se muestra en trabajos anteriores (Mestre Furlani *et al.*, 2017), ambas levaduras regionales, *S. cerevisiae* BSc114 y *H. uvarum* BHu9 toleran altas concentraciones de anhídrido sulfuroso. Estas levaduras iniciaron sin dificultad el proceso fermentativo a niveles de SO₂ aplicados al mosto de uva, como se puede observar en la breve fase de latencia (Figura 3.1). Las levaduras regionales propias del mosto se detectaron en la primera etapa de todos los ensayos, pero en proporciones significativamente más bajas que las cepas de levaduras inoculadas al inicio del proceso fermentativo. El grado de resistencia al SO₂ es variable a nivel de cepa y varias especies de levadura no *Saccharomyces* pueden ser tolerantes a concentraciones comúnmente empleadas en la vinificación (Mendoza *et al.*, 2009; Padilla *et al.*, 2016).

Como era de esperarse, los tiempos de fermentación estuvieron estrechamente relacionados con la concentración de azúcar de los mostos de uva, es decir los tratamientos que iniciaron el proceso con alrededor de 22 °Brix (1C-EC1118, 1C-BSc114, 1C-Co, 2RV-EC1118, 2RV- BSc114 y 2RV-Co) terminaron el proceso fermentativo en un rango de 6 a 9 días. Mientras que las fermentaciones de 2C-EC1118, 2C- BSc114y 2C-Co llevaron a cabo el proceso en 8 a 11 días (24 ° Brix). En todos los casos, los tratamientos que incluyeron la Co-inoculación secuencial, 1C-Co, 2C-Co y 2RV-Co, demoraron más tiempo demostrando la menor capacidad fermentativa de la levadura *no-Saccharomyces* (Figura 3.1). Otros autores emplearon cocultivos y obtuvieron resultados similares concluyendo que fermentaciones más

largas reducen la pérdida de *flavours* o la alta demanda energética de refrigeración (Lleixà *et al.*, 2016).

Durante el proceso de fermentación, fue evidente que todos los sistemas fermentantes inoculados con la levadura BSc114 a las 48 h (tratamientos con Co) aumentaron significativamente el tamaño de su población y la producción de CO₂. Además, estos exhibieron las mayores tasas de producción de CO₂ y tamaños de población durante los primeros 4-5 días, alcanzando poblaciones por encima de 8 Log CFU/mL y luego disminuyeron lentamente a medida que la fermentación progresaba hasta completarse (Figura 3.1.c, f, i). Los resultados de la dinámica poblacional indicaron que *S. cerevisiae* BSc114 fue capaz de superar la microbiota autóctona de los mostos de uva desde el principio. Todos estos hechos demuestran que esta levadura logró una rápida implantación en el medio fermentativo.

Hanseniaspora uvarum es una de las especies predominantes al inicio del proceso de vinificación y, además, frecuentemente reportada por otros autores (Lleixà *et al.*, 2016; Tristezza *et al.*, 2016), por lo que la Co-inoculación secuencial con *S. cerevisiae* es una de las estrategias más factibles para imitar lo que ocurre durante la fermentación espontánea y mejorar la calidad del vino. En este estudio, todos los cocultivos registraron actividades fermentativas muy bajas durante el período anterior a la inoculación de levaduras BSc114 en comparación con los cultivos puros de *S. cerevisiae* (Figura 3.1). Otros autores confirmaron una tasa fermentativa inicial baja en cocultivos de *H. uvarum*/*S. cerevisiae* (Ciani *et al.*, 2006; Du Plessis *et al.*, 2019; Tristezza *et al.*, 2016). A pesar de la baja tasa fermentativa, el consumo de azúcares reductores fue del 23,5% (1C-Co), 20,4% (2C-Co) y 34,2% (2RV-Co) durante este período. El mayor consumo de azúcares se detectó en 2RV-Co, que se puede atribuir a la afinidad de esta levadura por la acidez del mosto de uva (pH 3.6, acidez titulable 6.5 g/L), como lo reportan otros autores (Çelik *et al.*, 2017; Ciani *et al.*, 2006). Este consumo de azúcar se reflejó en el aumento de la biomasa favorecido por los niveles de oxígeno aún presentes, como se puede observar en la Figura 3.1. Desde el inicio, *H. uvarum* BHu9 estuvo presente en poblaciones superiores a 6.0 Log UFC/mL; alcanzó un máximo (entre 6,86 y 7,73 log UFC/ml) en tres días y luego disminuyó. El comportamiento de esta levadura apiculada se advirtió previamente, indicando que las levaduras *no-Saccharomyces* dominan durante los primeros días de fermentación hasta una concentración de etanol de entre 4-7% v/v aproximadamente, y luego disminuyen su crecimiento (Fleet, 2003). La población de la levadura BHu9 permaneció hasta el día 4 (1C-Co) y el día 6 (2C-Co y 2RV-Co). Por otro lado, es importante destacar que este consumo precoz disminuye la concentración inicial de azúcares fermentables disponibles para *S.*

cerevisiae. Por tanto, se podría inferir que de esta manera se reduce el impacto del estrés osmótico en esta población de levaduras. Además, no presentó una fase latente después de su inoculación (a las 48 h) y rápidamente comenzó a aumentar su población y producción de CO₂. Es importante destacar que las poblaciones totales alcanzadas por los cocultivos no superaron significativamente las encontradas en las vinificaciones conducidas por monocultivos de BSc114.

Los ensayos de fermentación de la levadura comercial EC1118 (1C-EC1118, 2C-EC1118 y 2RV-EC1118) siempre alcanzaron tamaños poblacionales inferiores a la fermentación con levaduras regionales. Además, las fermentaciones realizadas con EC1118 registraron una producción de CO₂ superior a la de las levaduras autóctonas (Figura 3.1). Estos resultados podrían indicar que la cepa EC1118 presentó una alta conversión de azúcar/etanol, es decir, que requiere menos azúcar para producir más etanol.

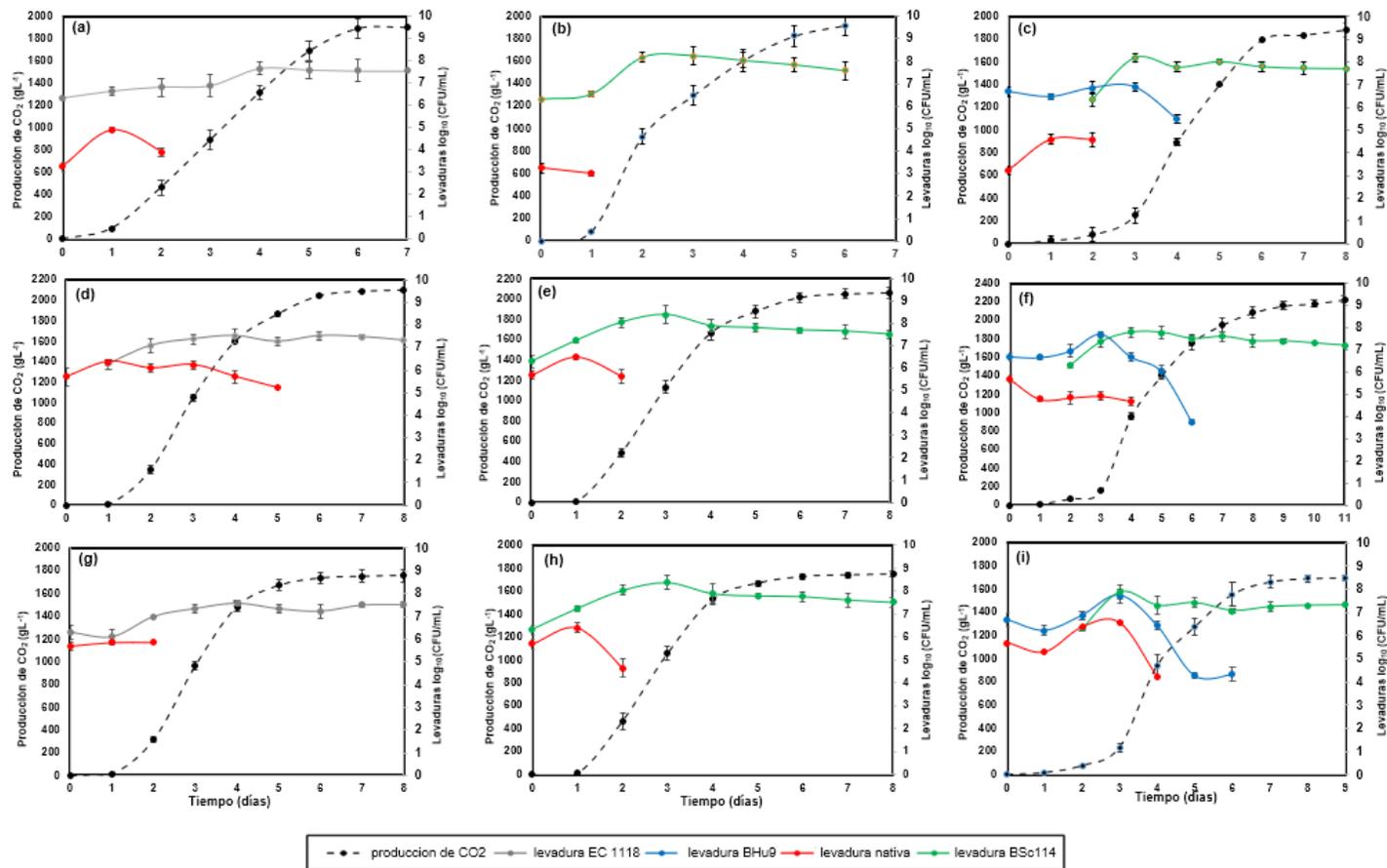


FIGURA 3.1. Evolución de las poblaciones de levadura (Log UFC/mL) y producción de CO₂ (g/L) durante la fermentación de vinos Malbec obtenidos aplicando estrategias prefermentativas y fermentativas de vinificación: (a) 1C-EC1118, (b) 1C- BSc114, (c) 1C-Co, (d) 2C-EC1118, (e) 2C- BSc114, (f) 2C-Co, (g) 2RV-EC1118, (h) 2RV- BSc114 y (i) 2RV-Co.

2. Parámetros analíticos generales de los vinos Malbec

La inoculación secuencial de levaduras *H. uvarum*/*S. cerevisiae* fue exitosamente implementada por investigadores en otras regiones enológicas, logrando vinos de buena calidad (Canonico *et al.*, 2016; Ciani *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2009; Tristezza *et al.*, 2016). Habiendo conseguido reducciones de hasta 1,6% v/v en relación al control, no se percibieron desviación en las fermentaciones y, además, se encontró que algunos compuestos aromáticos deseables aumentaron su concentración (Canonico *et al.*, 2016). Adicionalmente, otros autores correlacionaron este tipo de coinóculos, eficientes en la reducción de la concentración de etanol final, con descriptores sensoriales asociados a características positivas de los vinos de calidad (Mercado *et al.*, 2018). La estrategia de Co-inoculación aplicada en el presente trabajo fue optimizada previamente y logró resultados prometedores a escala de laboratorio (Maturano *et al.*, 2019; Mestre *et al.*, 2019). Es importante señalar que todos los vinos de los diferentes tratamientos fermentaron hasta quedar con rastros de azúcares (<3 g/L de azúcares residuales totales, Tabla 3.1).

Los valores finales de etanol, pH, acidez titulable y volátil de los vinos obtenidos se resumen en la Tabla 3.1. Según lo previsto, el contenido de etanol de los vinos elaborados a partir de uvas cosechadas en madurez tecnológica (2C) fue significativamente mayor que los vinos de la primera vendimia (1C) y los elaborados a partir del *blend* de mosto maduro con una proporción de vino verde (2RV). En general, independientemente de la cepa de levadura utilizada, los vinos 2RV tenían 1.4% v/v menos de alcohol que los vinos 2C, y niveles cercanos a los vinos 1C. El rendimiento de azúcar en etanol también se consideró un factor importante. Como se puede observar en la Tabla 3.1, la estrategia fermentativa 2RV-Co registró los valores más altos, demostrando su baja eficiencia en la conversión de azúcares en etanol. Asimismo, los valores de pH de los vinos mostraron un comportamiento similar, logrando una reducción de 0.3 unidades aplicando los tratamientos 2RV; mientras que la acidez titulable solo aumentó en un 4%. Por el contrario, se obtuvieron niveles de pH y acidez comparables entre los vinos 1C y 2C; probablemente debido a los altos niveles de potasio observados en las uvas desde el inicio de la maduración (1C, 1500 mg / L; 2C, 1700 mg / L).

Estos resultados coinciden con reportes de otros autores (Kontoudakis *et al.*, 2011; Piccardo *et al.*, 2019; Schelezki *et al.*, 2018), en los que la sustitución del jugo de uva por mosto/vino verde determinó una disminución del contenido de azúcar y un aumento de la acidez. Específicamente, se observó un gran efecto del factor prefermentativo (60,2% y 74,3%) y un ligero impacto de la interacción tratamiento

prefermentativo x tratamiento fermentativo (TPF x TF) (19,0% y 9,0%) sobre el alcohol y el pH, respectivamente. Mientras que, en el caso de la acidez total, el impacto del factor fermentativo (TF) fue mayor que el resto (51,5%). Por lo tanto, 2RV-Co y 2RV- BSc114 fueron los tratamientos más efectivos en la reducción del alcohol y el pH de los vinos (Tabla 3.1).

Como se mencionó anteriormente, la participación activa de la levadura autóctona *no-Saccharomyces* como inóculo inicial influye en el curso de la fermentación y la calidad del producto final. Algunas especies de levaduras *no-Saccharomyces* se reconocen como potenciales acidificantes, como *Lanchacea thermotolerant*, *Schizosacchamyses pombe*, *Starmerella Bacillaris* y *Candida zemplinina* (Benito *et al.*, 2015; Gobbi *et al.*, 2013). Estas levaduras son capaces de inducir la acidificación debido a sus características fisiológicas y determinantes genéticos asociados con la producción de ácidos orgánicos (Berbegal *et al.*, 2019). Hong y Park (2013) advirtieron que las cepas de *H. uvarum* resultaron ser buenas productoras de ácidos orgánicos en vinos coreanos.

Finalmente, mientras que la acidez volátil aumenta con los niveles de madurez de la fruta, todos los tratamientos presentaron valores de ácido acético inferiores a 0,6 g/L (Tabla 3.1), valor que es considerado aceptable de acuerdo con la normativa vigente (Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina). Cabe resaltar que ambas estrategias tuvieron un impacto significativo en los valores de acidez volátil. Los mismos fueron menores que en los vinos control.

TABLA 3.1. Parámetros analíticos generales de los vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de la vinificación.

Tratamientos	Etanol (% v/v)	pH	Acidez total (g/L)	Acidez Volátil (g/L)	Azúcar residual (g/L)	Rendimiento etanol
1C-EC1118	13.33* ± 0.23 bc	3.95 ± 0.02 c	4.77 ± 0.07 a	0.45 ± 0.02 ab	1.47 ± 0.12 cd	16.02 ± 0.29 cde
1C-BSc114	13.83 ± 0.23 cd	3.91 ± 0.01 bc	5.04 ± 0.03 b	0.45 ± 0.01 b	1.21 ± 0.11 bc	15.46 ± 0.27 bcd
1C-Co	12.20 ± 0.35 a	3.87 ± 0.02 b	5.16 ± 0.12 b	0.37 ± 0.03 a	1.03 ± 0.03 abc	17.55 ± 0.51 f
2C-EC1118	15.07 ± 0.21 e	4.16 ± 0.03 d	4.78 ± 0.04 a	0.57 ± 0.02 c	1.78 ± 0.10 d	14.15 ± 0.20 a
2C-BSc114	14.00 ± 0.10 d	3.91 ± 0.02 bc	5.59 ± 0.06 c	0.56 ± 0.03 c	1.32 ± 0.21 cd	15.26 ± 0.11 bc
2C-Co	14.20 ± 0.20 d	3.92 ± 0.03 bc	5.58 ± 0.07 c	0.54 ± 0.05 c	0.74 ± 0.21 ab	15.09 ± 0.20 b
2RV-EC1118	13.23 ± 0.35 bc	3.73 ± 0.01 a	5.19 ± 0.06 b	0.52 ± 0.04 bc	1.48 ± 0.22 cd	16.14 ± 0.41 de
2RV-BSc114	12.93 ± 0.12 bc	3.66 ± 0.03 a	5.76 ± 0.03 c	0.52 ± 0.01 bc	1.25 ± 0.26 c	16.53 ± 0.16 e
2RV-Co	12.87 ± 0.12 b	3.70 ± 0.03 a	5.62 ± 0.14 c	0.52 ± 0.03 bc	0.72 ± 0.12 a	16.65 ± 0.14 e
1C	13.12 ± 0.76 A	3.91 ± 0.04 B	4.99 ± 0.19 A	0.42 ± 0.04 A	1.28 ± 0.48 A	14.84 ± 0.54 B
2C	14.42 ± 0.51 B	4.00 ± 0.12 C	5.32 ± 0.41 B	0.56 ± 0.03 C	1.15 ± 0.38 A	16.44 ± 0.33 A
2RV	13.01 ± 0.26 A	3.70 ± 0.04 A	5.52 ± 0.27 C	0.52 ± 0.03 B	1.24 ± 0.21 A	16.34 ± 0.99 B
EC1118	13.88 ± 0.92 χ	3.95 ± 0.19 β	4.91 ± 0.21 α	0.51 ± 0.06 β	1.58 ± 0.20 χ	15.44 ± 1.00 α
BSc114	13.59 ± 0.52 β	3.83 ± 0.12 α	5.46 ± 0.33 β	0.51 ± 0.05 αβ	1.26 ± 0.18 β	15.75 ± 0.61 α
Co	13.09 ± 0.91 α	3.83 ± 0.10 α	5.46 ± 0.24 β	0.48 ± 0.09 α	0.83 ± 0.20 α	16.43 ± 1.11 β
ANOVA de dos factores						
TPF	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2893	<0.0001
TF	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0246	<0.0001	<0.0001
Interacción (TPF x TF)	<0.0001	<0.0001	0.0001	0.0983	0.0652	

* Media ± DE (n = 3). Letras romanas minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Prueba Tukey HSD, p<0,05). Letras mayúsculas romanas indican diferencias estadísticas (p<0,05) entre vinos de TPF. Letras griegas diferentes indican diferencias estadísticas (p<0,05) entre vinos de TF. Estrategias prefermentativas (TPF): 1C, vinos de 1ª cosecha (22°Brix); 2C, vinos de 2ª cosecha (24 °Brix); 2RV, vinos de alcohol reducido. Estrategias fermentativas (TF): EC1118 cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*; BSc114 cepa regional de *Saccharomyces cerevisiae*; Co, Co-inoculación *Saccharomyces cerevisiae*/ *Hanseniaspora uvarum* (BHu9/BSc114).

3. Parámetros fenólicos generales de los vinos

La Figura 3.2 muestra los parámetros fenólicos generales de los vinos Malbec obtenidos al aplicar estrategias prefermentativas y fermentativas de vinificación para reducir el alcohol y el pH. En primer lugar, es bien sabido que la madurez de la uva influye significativamente en el color y en la composición fenólica de los vinos tintos (Bindon *et al.*, 2013). Los vinos obtenidos de las uvas más maduras (2C) presentaron mayor concentración total de fenoles (~ 47%), antocianinas (~ 26%), y en menor medida de taninos (~ 9%) que los vinos obtenidos de su correspondiente primera cosecha (1C), confirmando las tendencias anteriormente observadas para esta variedad (Fanzone *et al.*, 2011) y otras variedades tintas (Fournand *et al.*, 2006). Las principales diferencias se observaron en fenoles totales, medidos mediante reacción con cloruro de hierro, cuantificando todos los fenoles que contienen dos grupos hidroxilos en posiciones vecinales (Harbertson y Spayd, 2006). Por lo tanto, estas medidas incluyen no solo taninos sino también flavan-3-oles y flavonoles, compuestos que aumentan su concentración y posiblemente su extractibilidad durante la maduración de la uva (Fanzone *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012).

Es importante destacar que cuando se comparó cada vino de alcohol reducido (2RV) con su respectivo control (2C), no se encontraron diferencias significativas en estos parámetros, considerándose como resultados satisfactorios en cuanto a la calidad del vino (Figura 3.2). Estos hallazgos coinciden con los obtenidos en experimentos similares llevados a cabo por otros autores (Kontoudakis *et al.*, 2011; Piccardo *et al.*, 2019; Rolle *et al.*, 2018; Schelezki *et al.*, 2018; Schelezki *et al.*, 2020) y confirmó que cambios (reducción) en los niveles de alcohol (alrededor 1,5-2% v/v) en la matriz del vino no afectaron la extractibilidad de antocianinas y taninos de los hollejos. Además, la sustitución de parte del mosto antes de la maceración, por vino Sauvignon Blanc de baja graduación alcohólica, no supuso pérdidas de antocianinas extraídas durante el proceso de molienda sino, incluso, un posible suministro de copigmentos, que protege a las antocianinas contra la oxidación (Boulton, 2001). Estos factores también se deben a valores de pH bajos, que ralentizan esta reacción y favorecen la extracción de estos compuestos durante la vinificación (Canals *et al.*, 2005; Kontoudakis *et al.*, 2011).

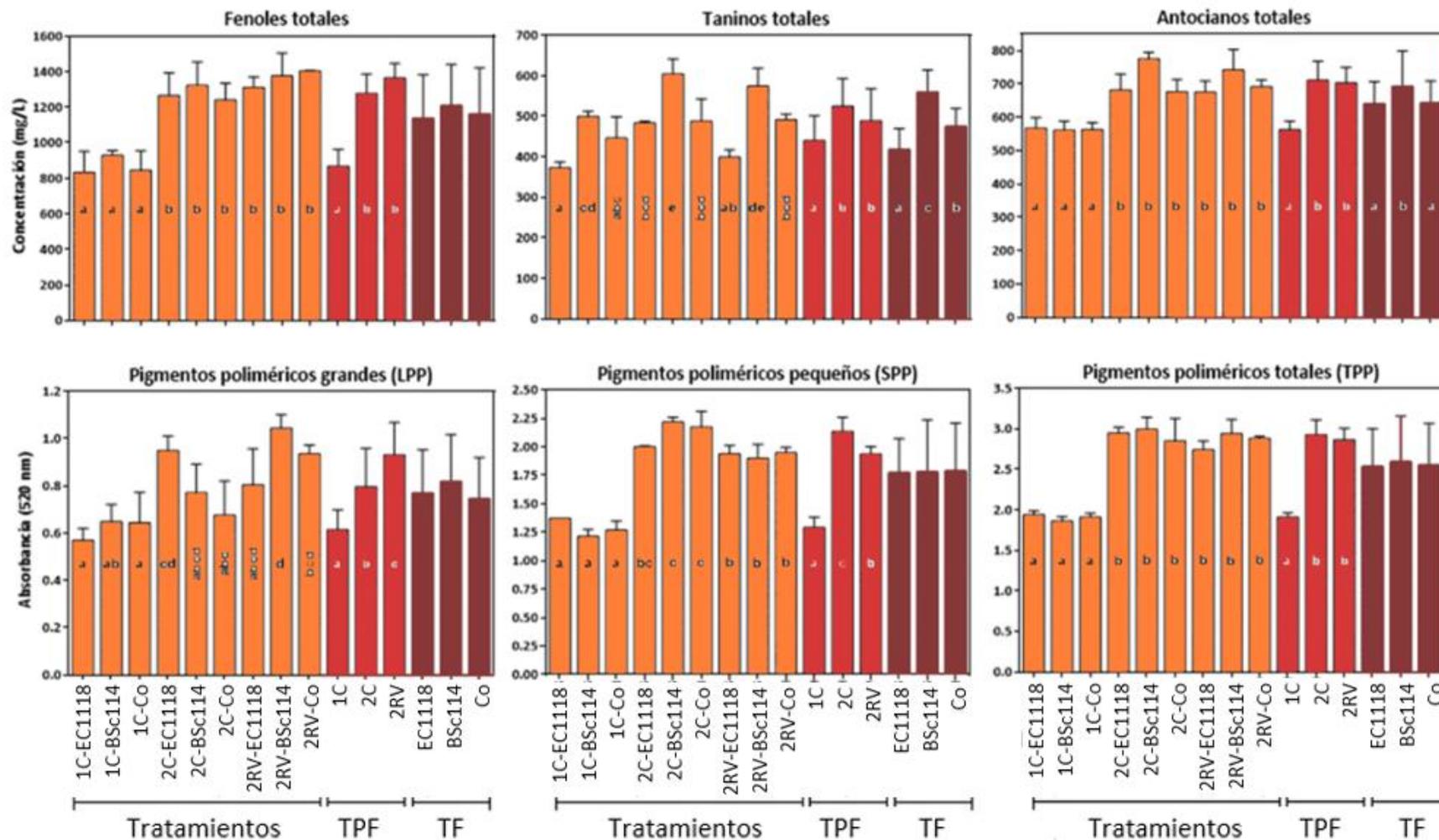


FIGURA 3.2. Parámetros fenólicos globales de vinos Malbec obtenidos aplicando estrategias prefermentativas y fermentativas de la vinificación. Letras diferentes para cada grupo de barras indican diferencias significativas (prueba Tukey HSD, $p < 0,05$).

La Tabla 3.2 muestra los valores probables de cada factor, cuando se aplicó el ANOVA de dos factores utilizando TPF vs TF como factores. Desde este análisis, se observó un efecto significativo del factor TF, indicando en todos los casos mayores niveles de taninos (~34 %) y antocianinas (~12 %) en vinos fermentados con levaduras regionales (*S. cerevisiae* BSc114) que los fermentados con la levadura comercial (CS) (Figura 3.2). La mayor extracción de estos compuestos podría explicarse por un efecto positivo de los menores niveles de pH obtenidos con la cepa regional (Figura 3.2). Es bien sabido que los polisacáridos de la pared celular de la levadura retienen las antocianinas y los taninos, impidiendo así su precipitación. Por lo tanto, se mejora la estabilidad del color y la astringencia disminuye (Escot *et al.*, 2001). La cantidad liberada de estas moléculas durante la fermentación alcohólica, el envejecimiento y especialmente durante la lisis celular, varía intraespecíficamente y depende del tamaño poblacional alcanzado y sus condiciones fisiológicas (Domizio *et al.*, 2014). En este estudio, como puede observarse en la Figura 3.1, la levadura regional *S. cerevisiae* alcanzó altas poblaciones durante el proceso fermentativo, por lo tanto, se podría esperar una mayor concentración de polisacáridos, aunque esto no fue determinado en este trabajo.

Los pigmentos poliméricos formados durante la vinificación proporcionaron un color estable y una buena sensación en boca. Su producción está modulada por la cantidad molar relativa de antocianinas y taninos (Kilmister *et al.*, 2014). Los pigmentos poliméricos totales resultan de la suma de los pequeños pigmentos poliméricos (SPP; incluyendo piranoantocianinas y aductos flavanol-antocianina con puente de etilo, que no pueden precipitar proteínas y son resistentes a la decoloración por SO₂) y grandes pigmentos poliméricos (LPP; aductos covalentes entre taninos y antocianos, de peso molecular relativamente alto, que pueden precipitar proteínas y son resistentes a la decoloración por SO₂) (Adams *et al.*, 2004). El contenido polimérico total (TPP) de los vinos elaborados a partir de uvas más maduras (2C y 2RV) fue mayor que los vinos elaborados a partir de uvas menos maduras (1C). La formación de LPP siguió la tendencia observada respecto al contenido de taninos en los vinos, mientras que la tasa de SPP mostró una correlación directa con el nivel de antocianinas (Figura 3.2). Resultados similares fueron reportados por otros autores en Syrah (Garrido-Bañuelos *et al.*, 2019), Cabernet-Sauvignon (Bindon *et al.*, 2013) y Merlot (Casassa *et al.*, 2019) a partir de frutos completamente maduros cosechado entre 23 y 25 °Brix.

El ANOVA de dos factores mostró una interacción significativa TPF × TF para LPP y SPP (Tabla 3.2). Esto sugiere que el efecto de las cepas de levadura empleadas (TF) dependió de la estrategia prefermentativa. En otras palabras, las

cepas regionales (BSc114 y Co) aplicada al control de los vinos de uvas maduras (2C) y vinos de alcohol reducido (2RV) produjo efectos contrastantes en pigmentos poliméricos de diferente peso molecular, sin afectar su sumatoria (TPP).

TABLA 3.2. Valores de probabilidad (ANOVA de dos factores) para estrategias prefermentativas (TPF) y fermentativas (TF) para los parámetros globales fenólicos y el color en vinos Malbec.

Parámetros	<i>p</i> valor ^a por factor		
	TPF	TF	TPF x TF ^b
Fenoles totales	<0.0001	0.3221	0.8014
Taninos totales	0.0002	<0.0001	0.1805
Antocianos totales	<0.0001	0.0111	0.1232
LPP	<0.0001	0.3541	0.0101
SPP	<0.0001	0.7426	0.0066
TPP	<0.0001	0.3672	0.2759
L*	<0.0001	0.0047	0.1156
C* _{ab}	<0.0001	<0.0001	0.0111
h _{ab}	<0.0001	<0.0001	<0.0001

a Se considera significativo cuando $p < 0,05$.

b Efecto de interacción entre tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF).

4. Color del vino

Para una mayor comprensión de la composición del color de los vinos, se llevaron a cabo análisis utilizando el espacio de color CIELAB. La Figura 3.3 muestra la ubicación de los vinos de los diferentes tratamientos en el plano de color (a^*b^*) del espacio CIELAB y valores L* (luminosidad). Los datos obtenidos del ANOVA de dos factores (Tabla 3.2), muestran un efecto significativo ($p < 0,05$) de estrategias prefermentativas y fermentativas en el color final de los vinos Malbec, en términos cuantitativos (C*_{ab} y L*) y cualitativos (h_{ab}); e interacción significativa TPF x TF en croma (C*_{ab}) y tono (h_{ab}).

Independientemente de la cepa de levadura utilizada, se evidenció que el color de los vinos de la primera cosecha (1C) era menos vívido y más claro (menor C*_{ab}), y mostró una ligera disminución de las tonalidades violetas, dada una marcada disminución de los valores de a^* y b^* . Por el contrario, el color de los vinos de las uvas de mayor madurez mostró una intensidad alta debido a un aumento de C*_{ab} (2C,

47 %; 2RV, 78 %), y un desplazamiento hacia tonos violetas (disminución en h_{ab} de 5° y 8° para 2C y 2RV, respectivamente) (Figura 3.3 A). Además, C^*_{ab} presenta una correlación negativa con L^* y, como era de esperar, cuando el primero aumenta, el segundo disminuye (Figura 3.3 B). El valor L^* es el eje vertical y define la luminosidad, la propiedad de acuerdo a la cual cada color puede ser considerado como un equivalente a una escala de grises, entre negro y blanco, tomando valores dentro del rango 0–100, respectivamente (Gordillo *et al.*, 2014). Este parámetro evidenció diferencias significativas entre vinos, presentando una disminución relativa porcentual (en promedio) del 16 % en 2C y 19 % en 2RV, en relación a los vinos 1C. Estos resultados pueden explicarse por los altos niveles de compuestos fenólicos, especialmente antocianinas y pigmentos poliméricos, en vinos 2C y 2RV (Figura 3.2).

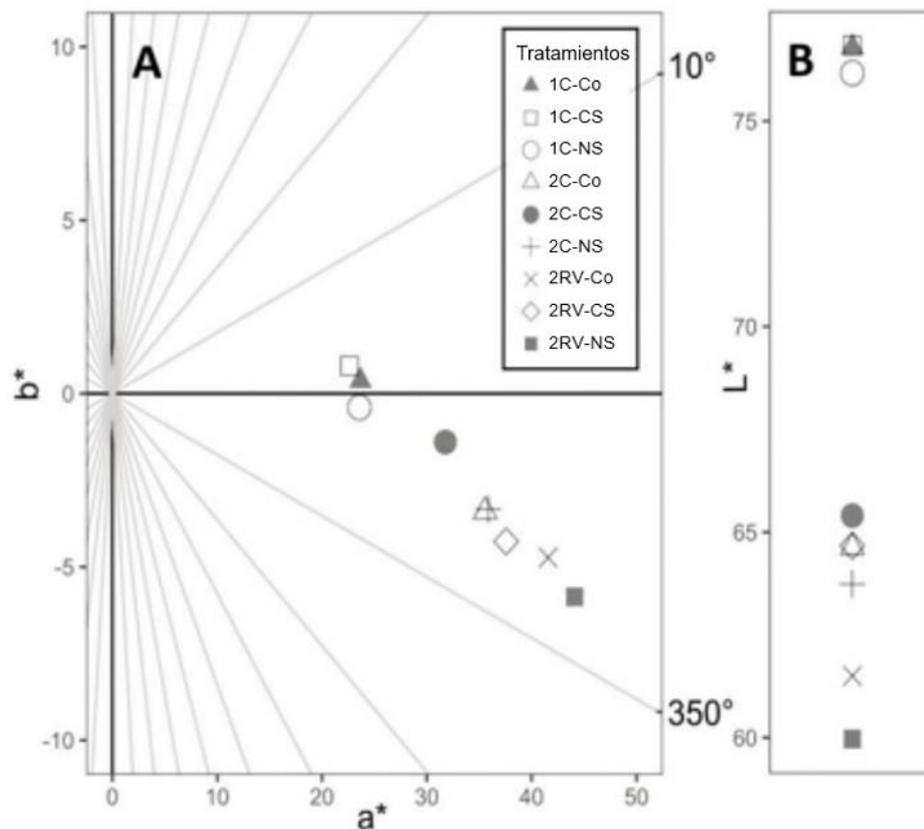


FIGURA 3.3. Parámetros CIELAB de vinos Malbec. (A) (a^*b^*) Diagrama; Chroma (C^*_{ab}) es un vector que une el punto (ubicación del vino) con el origen de coordenadas; hue (h_{ab}) es el ángulo de este vector. (B) Luminosidad (L^*).

Además, cuando cada vino de alcohol reducido (2RV) se comparó con los controles (2C), también se encontraron diferencias significativas en estos parámetros, los vinos 2RV tenían un color más intenso (mayor C^*_{ab} , ~20 %; menor L^* , ~4 %). El factor determinante posiblemente es el pH más bajo, que desplaza el

equilibrio entre las diferentes formas de las antocianinas hacia el catión *flavilium*. Una vez más, estos hallazgos coinciden con los obtenidos por otros autores (Kontoudakis *et al.*, 2011; Piccardo *et al.*, 2019) en ensayos similares.

Como se mencionó anteriormente, se observó una influencia significativa de las cepas de levadura y de la interacción TPF x TF en los parámetros de color de los vinos (Tabla 3.2). La inoculación de la cepa regional *S. cerevisiae* BSc114, especialmente como monocultivo), para cada tratamiento prefermentativo resultó en vinos de mayor intensidad de color (mayor C^*_{ab}), con tendencia a tonalidades azul-violeta (h_{ab} menor) (Figura 3.3 A). Asimismo, los valores de L^* en los vinos BSc114 fueron menores que los de los tratamientos Co y EC1118, para cada estrategia prefermentativa (Figura 3.3 B). Estos resultados coinciden con los niveles más altos de antocianos y taninos en los vinos fermentados con esta levadura autóctona (Figura 3.2).

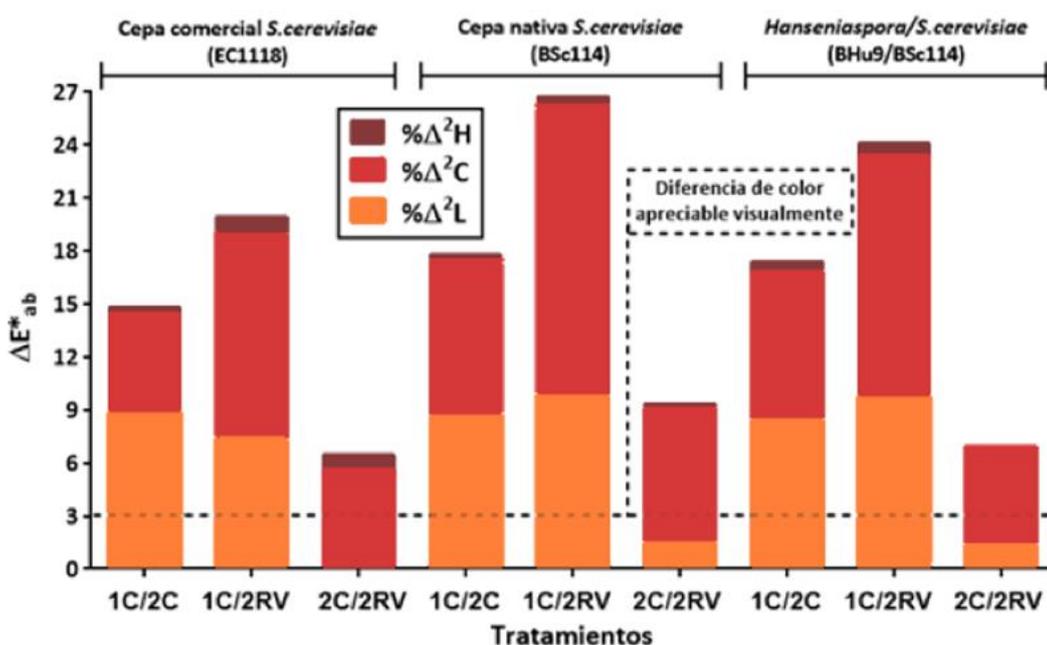


FIGURA 3.4. Diferencias de color (ΔE^*_{ab}), con la contribución relativa de luminisidad, croma y tonalidad ($\% \Delta^2 L$, $\% \Delta^2 C$, $\% \Delta^2 H$), entre vinos Malbec obtenidos aplicando diferentes tratamientos prefermentativos y fermentativos con diferentes cepas de levadura.

Finalmente, se evaluó la diferencia total de color (ΔE^*_{ab}) entre vinos Malbec obtenidos mediante la aplicación de diferentes tratamientos prefermentativos y fermentativos con diferentes cepas de levaduras. No es posible establecer el valor concreto para la discriminación de color porque muchos factores están condicionando este límite, como la visual geométrica, el entorno, incluso la región del

color, y la habilidad, capacidad visual y formación del observador. Algunos estudios realizados bajo condiciones específicas han establecido el umbral de discriminación visual en vinos entre 3 y 5 unidades CIELAB (Martínez *et al.*, 2001, Pérez-Magariño y González-San José, 2003), aunque estos valores deben ser considerados en carácter relativo. Para todas las levaduras estudiadas, los valores más altos de diferencia de color (ΔE^*_{ab}) fueron entre vinos de la primera cosecha (1C) y los vinos de alcohol reducido (2RV) (media de 23,6 unidades CIELAB), y las menores entre los vinos control de la segunda cosecha (2C) y los vinos del tratamiento 2RV (media 7,6 unidades), aunque en todos los casos las diferencias se distinguieron visualmente (Figura 3.4). Tomando en cuenta que tanto los vinos 2C como los 2RV provienen de uvas con el mismo grado de madurez, la implementación de la estrategia de reducción de alcohol alteró significativamente el color, principalmente en términos cuantitativos ($\%/\Delta^2 C^*_{ab} > 82$).

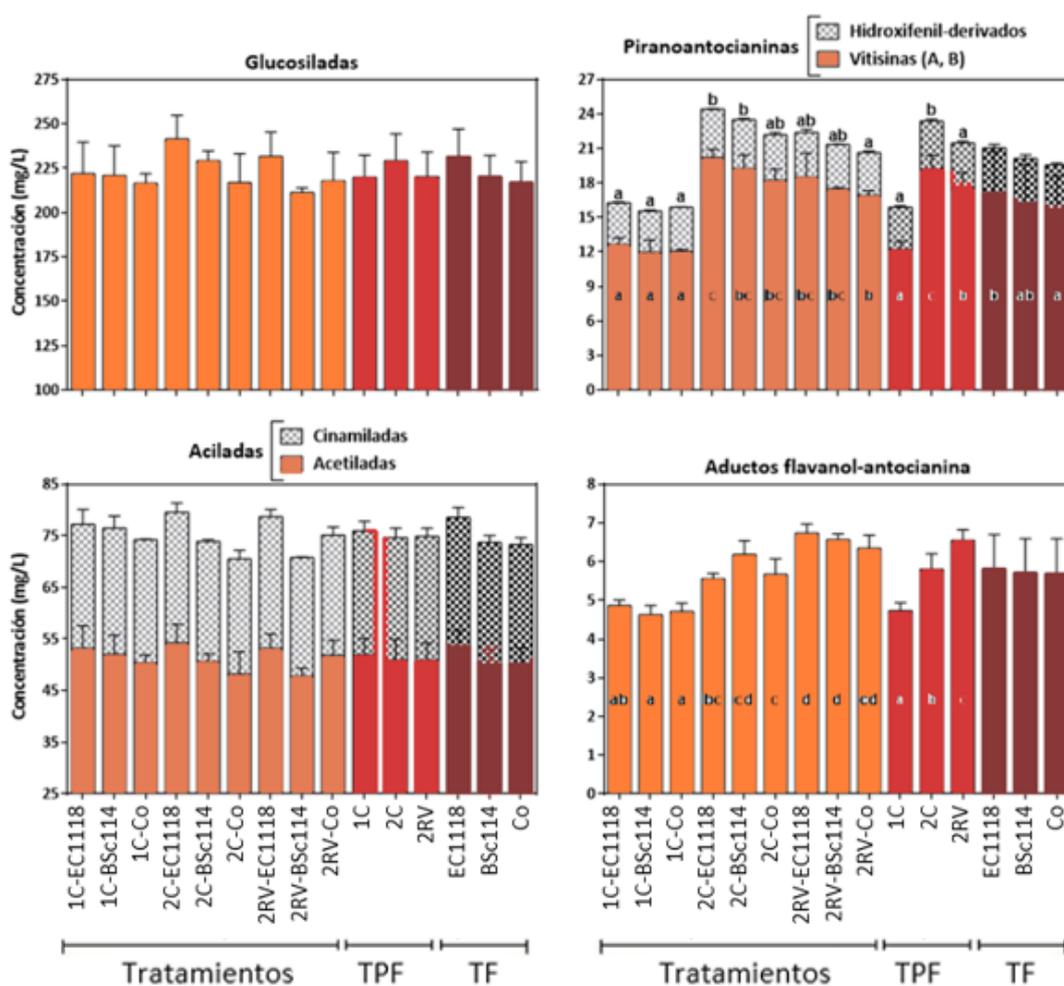


FIGURA 3.5. Perfil de antocianinas y pigmentos derivados de vinos Malbec obtenidos aplicando estrategias prefermentativas y fermentativas de la vinificación. Letras diferentes para cada grupo de barras indican diferencias significativas por ANOVA de dos factores (prueba Tukey HSD, $p < 0,05$).

Analizando la influencia de las cepas de levadura, el inóculo nativo utilizado (*S. cerevisiae* BSc114) generó la mayor diferencia de color (media 18,0 unidades) en los vinos obtenidos de todos los tratamientos prefermentativos (TPF). Mientras que la cepa comercial evidenció mínimas diferencias de color (media 13,8 unidades) en todos los vinos. Siguiendo la misma tendencia indicada arriba, la estrategia microbiológica aplicada para la reducción de alcohol también modificó el color de los vinos en términos principalmente cuantitativos ($\% \Delta^2 C^*_{ab} > 60$) (Figura 3.4).

5. Perfil antociánico de los vinos Malbec

Los compuestos identificados y cuantificados en las muestras de vino se resumen en las Tablas 3.3 a 3.7. Se agruparon en glucósidos no acilados (5), acetil-glucósidos (5), cinamoil-glucósidos (6) y pigmentos de bajo peso molecular derivados de antocianinas (8) piranoantocianinas y 2 aductos flavanol de antocianina). Todos los compuestos identificados se detectaron en todos los vinos estudiados.

La Figura 3.5 muestra los resultados obtenidos en vinos por grupos. Los glucósidos simples representaron la proporción más alta de todas las antocianinas de las muestras (68.8%), seguido por acetil glucósidos (15,8%), cinamoil glucósidos (7,4%) y piranoantocianinas (6,2%), coincidiendo con los resultados publicado previamente por nuestro grupo para el mismo cultivar (Fanzone *et al.*, 2012). La cantidad total de antocianinas fue similar a la obtenida por espectrofotometría (Figura 3.2), aunque los valores fueron significativamente más bajos. Sin embargo, la creciente tendencia detectada entre la primera (1C) y la segunda (2C) cosecha, por la técnica mencionada, no fue observada en la cuantificación individual a través de HPLC-DAD, presentando niveles similares, principalmente en los derivados de malvidina. Los compuestos que aumentaron en la segunda cosecha (2C) fueron petunidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, delphinidina-3-(6"-acetil)-glucósido, cianidina-3-(6"-acetil)-glucósido, delphinidina-3-(6"- p -cumaroil)-glucósido y malvidin-3-(6"-cafeoil)-glucósido (Tablas 3.3, 3.4, 3.5). Este comportamiento podría explicarse por el hecho de que el análisis HPLC-DAD solo detecta antocianinas libres, mientras que el análisis espectrofotométrico sobreestima su cantidad total incluyendo otros pigmentos rojos (Canals *et al.*, 2008). Además, la sustitución de parte del jugo de uvas maduras por vino de baja graduación alcohólica (2RV) no implicó pérdidas de antocianinas, coincidiendo con los resultados presentados anteriormente (Figura 3.2).

TABLA 3.3. Perfil de antocianinas no aciladas de vinos Malbec obtenidas aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de vinificación.

Tratamientos	Df-3-gl			Ci-3-gl			Pt-3-gl			Pn-3-gl			Mv-3-gl		
	Media	± DE	Letras	Media	± DE	Letras	Media	± DE	Letras	Media	± DE	Letras	Media	± DE	Letras
1C-EC1118	5.95	± 0.47	a	3.51	± 0.82		15.85	± 1.79	a	7.64	± 1.18	a	189.12	± 14.25	ab
1C-BSc114	6.52	± 0.09	a	3.32	± 0.36		16.43	± 1.17	ab	8.49	± 0.53	ab	185.99	± 15.67	ab
1C-Co	6.47	± 0.36	a	3.32	± 0.11		17.12	± 0.20	abc	8.18	± 0.33	a	181.38	± 5.92	ab
2C-EC1118	6.59	± 0.66	a	3.66	± 0.25		19.94	± 0.61	bcde	13.15	± 0.84	d	198.06	± 12.77	b
2C-BSc114	7.40	± 0.07	ab	3.41	± 0.36		20.49	± 1.56	cde	12.09	± 0.94	cd	185.70	± 5.21	ab
2C-Co	6.32	± 1.07	a	3.15	± 0.27		17.83	± 2.06	abcd	11.27	± 0.78	cd	178.24	± 12.91	ab
2RV-EC1118	8.43	± 0.52	bc	4.10	± 0.54		20.59	± 0.73	cde	11.88	± 0.94	cd	186.54	± 12.33	ab
2RV-BSc114	10.52	± 0.29	d	3.76	± 0.31		21.51	± 0.39	e	11.07	± 0.74	cd	164.43	± 3.29	a
2RV-Co	9.82	± 0.76	cd	3.90	± 0.13		21.33	± 1.49	de	10.53	± 0.76	bc	172.27	± 13.19	ab
1C	6.31	± 0.41	A	3.38	± 0.46	A	16.47	± 1.21	A	8.10	± 0.76	A	185.50	± 11.50	
2C	6.77	± 0.79	A	3.41	± 0.34	A	19.42	± 1.80	B	12.17	± 1.10	B	187.33	± 12.82	
2RV	9.59	± 1.04	B	3.92	± 0.35	B	21.14	± 0.95	C	11.16	± 0.92	B	174.41	± 13.36	
EC1118	6.99	± 1.22	□	3.76	± 0.57		18.79	± 2.45		10.89	± 2.65		191.24	± 12.53	□
BSc114	8.15	± 1.83	□	3.50	± 0.36		19.48	± 2.53		10.55	± 1.73		178.71	± 13.62	□□
Co	7.54	± 1.84	□□	3.46	± 0.38		18.76	± 2.33		9.99	± 1.51		177.30	± 10.49	□
ANOVA de dos															
TPF		<0.0001			0.0186			<0.0001			<0.0001				0.0575
TF		0.0016			0.2553			0.4224			0.0890				0.0352
Interacción (TPF x TF)		0.0746			0.9093			0.1442			0.1254				0.5787

* Media ± DE (mg/L, n=3). Distintas letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Tuckey HSD, p<0,05). Distintas letras mayúsculas indican diferencias estadísticas (p<0.05) entre vinos de estrategias prefermentativas. Estrategias prefermentativas (TPF): 1C, vinos de 1ª cosecha (22°Brix); 2C, vinos de 2ª cosecha (24°Brix); 2RV, vinos de alcohol reducido. Estrategias fermentativas (TF): EC1118 cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*; BSc114 cepa regional de *Saccharomyces cerevisiae*; Co, Co-inoculación *Saccharomyces cerevisiae*/ *Hanseniaspora uvarum* (BH9/BSc114). Abreviaturas: Df: delfinidina; Ci: cianidina; Pt: petunidina; Pn: peonidina; Mv: Malvidina; 3-gl: 3-glucósido.

TABLA 3.4. Perfil de antocianinas acetiladas de vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de vinificación.

Tratamientos	Df-3-acgl			Ci-3-acgl			Pt-3-acgl			Pn-3-acgl		Mv-3-acgl		
	1C-EC1118	2.98	± 0.32	a	2.99	± 0.11	abc	6.76	± 0.50	ab	2.95	± 0.40	37.53	± 3.30
1C-BSc114	3.13	± 0.12	ab	2.27	± 0.56	a	6.51	± 0.55	a	3.07	± 0.23	37.06	± 3.52	ab
1C-Co	2.99	± 0.03	a	2.66	± 0.14	ab	6.52	± 0.05	a	3.08	± 0.02	35.16	± 1.31	ab
2C-EC1118	4.06	± 0.14	c	3.85	± 0.16	d	7.54	± 0.81	ab	3.07	± 0.17	35.73	± 3.34	b
2C-BSc114	4.33	± 0.22	c	3.77	± 0.10	cd	7.05	± 0.40	ab	3.09	± 0.08	32.39	± 1.07	ab
2C-Co	3.73	± 0.39	bc	3.85	± 0.22	d	6.66	± 0.38	ab	2.93	± 0.23	31.01	± 3.58	ab
2RV-EC1118	4.15	± 0.11	c	3.71	± 0.54	cd	7.74	± 0.24	ab	3.07	± 0.16	34.55	± 2.37	ab
2RV-BSc114	4.15	± 0.10	c	3.53	± 0.04	cd	7.44	± 0.44	ab	2.89	± 0.14	29.78	± 0.96	a
2RV-Co	4.28	± 0.30	c	3.36	± 0.06	bcd	7.85	± 0.36	b	3.17	± 0.19	33.18	± 2.49	ab
1C	3.04	± 0.19	A	2.64	± 0.43	A	6.60	± 0.39	A	3.03	± 0.24	36.58	± 2.73	B
2C	4.04	± 0.35	B	3.82	± 0.15	B	7.08	± 0.62	A	3.03	± 0.17	33.04	± 3.27	A
2RV	4.19	± 0.18	B	3.53	± 0.31	B	7.68	± 0.36	B	3.04	± 0.19	32.50	± 2.78	A
EC1118	3.73	± 0.59		3.52	± 0.49		7.34	± 0.66		3.03	± 0.24	35.94	± 2.93	
BSc114	3.87	± 0.58		3.19	± 0.75		7.00	± 0.57		3.02	± 0.17	33.07	± 3.72	
Co	3.67	± 0.61		3.29	± 0.53		7.01	± 0.69		3.06	± 0.18	33.12	± 2.90	
ANOVA de dos factores														
TPF		<0.0001			<0.0001			0.0004		0.9903			0.0083	
TF		0.1641			0.0662			0.2196		0.9011			0.0534	
Interacción (TPF x TF)		0.1140			0.2584			0.4249		0.3791			0.3579	

Media ± DE (mg/L, n=3). Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba Tukey HSD, $p < 0.05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre vinos de estrategias prefermentativas. Estrategias prefermentativas (TPF): 1C, Vinos de 1ª cosecha (22°Brix); 2C, vinos de 2ª cosecha (24°Brix); 2RV, vinos reducidos en alcohol. Estrategias fermentativas (TF): EC1118 cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*; BSc114 cepa regional de *Saccharomyces cerevisiae*; Co, Co-inoculación *Saccharomyces cerevisiae*/ *Hanseniaspora uvarum* (BHu9/BSc114). Abreviaturas: Df, delfinidina; Ci, cianidina; Pt, petunidina; Pn, peonidina; Mv, malvidina; 3-acgl, 3-acetilglucósido.

Cabe señalar que la concentración de piranoantocianinas y aductos flavanol-antocianinas en los vinos se vio significativamente afectada por la estrategia prefermentativa aplicada, y en el caso de las vitisinas también por las levaduras utilizadas (Figura 3.5, Tabla 3.6). Además, los datos obtenidos del ANOVA de dos factores, muestra una interacción significativa TPF x TF ($p < 0,05$) solo para derivados de hidroxifenilos. Las piranoantocianinas son pigmentos derivados de las antocianinas formadas por la reacción de antocianinas monoméricas con acetaldehído, ácido acetoacético, ácido pirúvico y otros compuestos carbonílicos (Blanco-Vega *et al.*, 2011; Rentzsch *et al.*, 2007). Estos compuestos son de interés para los enólogos porque tienen alta estabilidad durante la crianza de los vinos tintos, son más resistente a los valores elevados de pH y a la decoloración por anhídrido sulfuroso que las antocianinas, y expresan más color que otros pigmentos al pH típico del vino (Rentzsch *et al.*, 2007). Mientras tanto, los aductos flavanol-antocianos con puente etileno a menudo desaparecen durante el envejecimiento del vino, tal vez debido a la inestabilidad reportada del enlace etileno (Escribano-Bailón *et al.*, 2001).

En este estudio, los vinos Malbec de uvas maduras (2C y 2RV) fermentados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas o comerciales contenían los niveles más altos de todos los pigmentos derivados, que sostiene la mayor proporción de pequeños pigmentos poliméricos obtenidos por espectrofotometría (Figura 3.5).

TABLA 3.5. Perfil de antocianinas cinamoiladas de vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de la vinificación.

Tratamientos	Df-3-cmgl			Mv-3-cfgl			Pt-3-cmgl			Mv-3-Cis-cmgl			Pn-3-cmgl			Mv-3-trans-cmgl		
	Media	DE	Letra	Media	DE	Letra	Media	DE	Letra	Media	DE	Letra	Media	DE	Letra	Media	DE	Letra
1C-EC1118	4.22	± 0.31	a	0.99	± 0.18	a	2.37	±		1.51	± 0.07		2.33	±		12.60	±	
1C-BSc114	4.21	± 0.19	a	1.19	± 0.08	a	2.44	±		1.52	± 0.11		2.45	±		12.60	±	
1C-Co	4.01	± 0.06	a	0.98	± 0.10	a	2.54	±		1.46	± 0.11		2.47	±		12.35	±	
2C-EC1118	5.40	± 0.28	bc	2.03	± 0.12	c	2.25	±		1.40	± 0.10		2.46	±		11.79	±	
2C-BSc114	5.12	± 0.16	bc	1.78	± 0.07	bc	2.17	±		1.35	± 0.06		2.51	±		10.36	±	
2C-Co	4.74	± 0.34	ab	1.96	± 0.19	bc	2.10	±		1.34	± 0.08		2.29	±		9.89	±	
2RV-EC1118	5.43	± 0.51	c	2.11	± 0.10	c	2.39	±		1.45	± 0.09		2.72	±		11.41	±	
2RV-BSc114	4.64	± 0.05	ab	1.80	± 0.14	bc	2.46	±		1.53	± 0.12		2.53	±		10.01	±	
2RV-Co	4.75	± 0.25	ab	1.65	± 0.04	b	2.43	±		1.52	± 0.08		2.70	±		10.24	±	
1C	4.15	± 0.21	A	1.05	± 0.15	A	2.45	±	B	1.50	± 0.09	B	2.42	±	A	12.52	±	B
2C	5.09	± 0.37	B	1.92	± 0.16	B	2.17	±	A	1.36	± 0.07	A	2.42	±	A	10.68	±	A
2RV	4.94	± 0.47	B	1.85	± 0.22	B	2.43	±	B	1.50	± 0.09	B	2.65	±	B	10.55	±	A
EC1118	5.02	± 0.68	□	1.71	± 0.55	□	2.34	±		1.45	± 0.09		2.51	±		11.93	±	
BSc114	4.66	± 0.41	□	1.59	± 0.31	□	2.36	±		1.47	± 0.13		2.50	±		10.99	±	
Co	4.50	± 0.42	□	1.53	± 0.45	□	2.35	±		1.44	± 0.11		2.49	±		10.83	±	
ANOVA de dos factores																		
TPF		<0.000			<0.000			0.0037			0.0070			0.0271			0.0009	
TF		0.0025			0.0170			0.9672			0.8301			0.9806			0.0688	
Interacción (TPF x TF)		0.1474			0.0026			0.5707			0.6412			0.3255			0.5881	

*Media ± DE (mg/L, n=3). Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba Tukey HSD, p<0.05). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas (p<0,05) entre vinos de estrategias prefermentativas. Estrategias prefermentativas (TPF): 1C, vinos de 1ª cosecha (22°Brix); 2C, vinos de 2ª cosecha (24°Brix); 2RV, vinos reducidos en alcohol. Estrategias fermentativas (TF): EC1118 cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*; BSc114 cepa regional de *Saccharomyces cerevisiae*; Co, Co-inoculación *Saccharomyces cerevisiae*/ *Hanseniaspora uvarum* (BHu9/BSc114). Abreviaturas: Df, delfinidina; Ci, cianidina; Pt, petunidina; Pn, peonidina; Mv, malvidina; 3-cfgl, 3-(6"-cafeoil)-glucósido; 3-cmgl, 3-(6"-p-cumaroil)-glucósido.

TABLA 3.6. Perfil de piranoantocianinas tipo vitisina (A, B) de vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de vinificación.

Tratamientos	10-H-pirmv-3-acgl		10-C-pirpn-3-gl			10-C-pirmv-3-gl			10-C-pirmv-3-acgl	
1C-EC1118	3.08 ± 0.40	ab	2.13	± 0.06	ab	4.16	± 0.23	a	3.27 ± 0.06	a
1C-BSc114	2.87 ± 0.79	a	2.21	± 0.29	abc	3.61	± 0.35	a	3.29 ± 0.12	a
1C-Co	2.88 ± 0.08	a	2.09	± 0.01	a	3.97	± 0.09	a	3.10 ± 0.02	a
2C-EC1118	4.17 ± 0.40	bc	3.81	± 0.52	d	7.60	± 0.37	d	4.62 ± 0.39	b
2C-BSc114	4.19 ± 0.29	bc	3.68	± 0.83	d	6.97	± 0.12	cd	4.40 ± 0.19	b
2C-Co	3.71 ± 0.48	abc	3.06	± 0.06	abcd	7.41	± 0.27	cd	4.05 ± 0.26	b
2RV-EC1118	4.32 ± 0.33	c	3.53	± 0.35	d	6.33	± 1.13	bc	4.30 ± 0.34	b
2RV-BSc114	3.92 ± 0.08	abc	3.23	± 0.08	cd	6.34	± 0.19	bcd	3.97 ± 0.12	b
2RV-Co	4.06 ± 0.12	bc	3.18	± 0.26	bcd	5.68	± 0.09	b	3.98 ± 0.31	b
1C	2.94 ± 0.45	A	2.14	± 0.16	A	3.91	± 0.33	A	3.22 ± 0.11	A
2C	4.03 ± 0.41	B	3.52	± 0.60	B	7.33	± 0.36	C	4.35 ± 0.35	B
2RV	4.10 ± 0.25	B	3.31	± 0.28	B	6.12	± 0.66	B	4.08 ± 0.29	B
EC1118	3.86 ± 0.67		3.16	± 0.84		6.03	± 1.62		4.06 ± 0.66	□
BSc114	3.66 ± 0.74		3.04	± 0.79		5.64	± 1.56		3.89 ± 0.50	□□
Co	3.55 ± 0.58		2.77	± 0.53		5.69	± 1.50		3.71 ± 0.50	□
ANOVA de dos factores										
TPF	<0.0001			<0.0001			<0.0001		<0.0001	
TF	0.2643			0.1080			0.1522		0.0173	
Interacción (TPF x TF)	0.7011			0.4582			0.2489		0.4342	

Media ± DE (mg/L, n=3). Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba Tukey HSD, $p < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre vinos de estrategias prefermentativas. Estrategias prefermentativas (TPF): 1C, vinos de 1ª cosecha (22°Brix); 2C, 2do vinos de cosecha (24°Brix); 2RV, vinos reducidos en alcohol. Estrategias fermentativas (TF): EC1118 cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*; BSc114 cepa regional de *Saccharomyces cerevisiae*; Co, Co-inoculación *Saccharomyces cerevisiae*/ *Hanseniaspora uvarum* (BH9/BSc114).). Abreviaturas: 10-H, estructuras de vitisina B; 10-C, estructuras de vitisina A; pirpn, piranopeonidina; pirmv, piranomalvidina; 3-gl, 3-glucósido; 3-acgl, 3-(6"-acetil)-glucósido

TABLA 3.7. Perfil de aductos de hidroxifenil-piranoantocianinas y flavanol-antocianinas de vinos Malbec obtenidos aplicando tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF) de vinificación.

Tratamientos	10-HP-pirmv-3-gl			10-MHP-pirmv-3-gl			10-HP-pirmv-3-acgl			10-HP-pirmv-3-cmgl			Mv-3-gl-Cat			Mv-3-gl-etil-Cat		
1C-EC1118	1.36	±	ab	0.70	± 0.02	a	0.82	± 0.01	ab	0.73	± 0.01	a	2.47	± 0.06	ab	2.39	± 0.18	a
1C-BSc114	1.34	±	ab	0.71	± 0.01	a	0.78	± 0.02	a	0.74	± 0.02	a	2.41	± 0.17	ab	2.22	± 0.06	a
1C-Co	1.52	±	b	0.73	± 0.00	a	0.84	± 0.02	ab	0.75	± 0.00	a	2.54	± 0.08	ab	2.18	± 0.14	a
2C-EC1118	1.52	±	b	0.90	± 0.01	b	0.94	± 0.01	d	0.87	± 0.02	b	2.18	± 0.15	a	3.38	± 0.09	b
2C-BSc114	1.53	±	b	0.91	± 0.01	b	0.92	± 0.03	cd	0.90	± 0.02	b	2.64	± 0.22	bc	3.54	± 0.18	b
2C-Co	1.32	±	ab	0.88	± 0.02	b	0.88	± 0.03	bc	0.85	± 0.03	b	2.27	± 0.19	ab	3.41	± 0.22	b
2RV-EC1118	1.27	±	ab	0.89	± 0.02	b	0.89	± 0.05	bc	0.87	± 0.03	b	3.01	± 0.12	de	3.73	± 0.22	b
2RV-BSc114	1.28	±	ab	0.88	± 0.00	b	0.86	± 0.01	bc	0.86	± 0.02	b	3.15	± 0.15	e	3.42	± 0.03	b
2RV-Co	1.17	±	a	0.87	± 0.01	b	0.85	± 0.02	ab	0.85	± 0.02	b	2.81	± 0.22	cd	3.53	± 0.13	b
1C	1.41	±	B	0.71	± 0.02	A	0.82	± 0.03	A	0.74	± 0.01	A	2.48	± 0.11	A	2.26	± 0.15	A
2C	1.46	±	B	0.90	± 0.02	C	0.92	± 0.03	C	0.87	± 0.03	B	2.36	± 0.27	A	3.44	± 0.17	B
2RV	1.24	±	A	0.88	± 0.01	B	0.87	± 0.03	B	0.86	± 0.02	B	2.99	± 0.21	B	3.56	± 0.19	B
EC1118	1.38	±		0.83	± 0.10		0.89	± 0.06	b	0.82	± 0.07		2.55	± 0.38	ab	3.17	± 0.62	
BSc114	1.38	±		0.83	± 0.09		0.86	± 0.06	a	0.83	± 0.08		2.74	± 0.36	b	3.06	± 0.64	
Co	1.34	±		0.83	± 0.07		0.86	± 0.03	a	0.82	± 0.05		2.54	± 0.28	a	3.04	± 0.67	
ANOVA de dos factores																		
TPF		0.0004			<0.0001			<0.0001			<0.0001			<0.0001			<0.0001	
TF		0.5247			0.6555			0.0230			0.2334			0.0318			0.1950	
Interacción (TPF x TF)		0.0164			0.0071			0.0161			0.1022			0.0318			0.1418	

* Media ± DE (mg/L, n=3). Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba Tukey HSD, p<0.05). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas (p<0,05) entre vinos de estrategias prefermentativas. Estrategias prefermentativas (TPF): 1C, vinos de cosecha la 1ª cosecha (22°Brix); 2C, vinos de 2ª cosecha (24°Brix); 2RV, vinos reducidos en alcohol. Estrategias fermentativas (TF): EC1118 cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*; BSc114 cepa regional de *Saccharomyces cerevisiae*; Co, Co-inoculación *Saccharomyces cerevisiae*/ *Hanseniaspora uvarum* (BHu9/BSc114). Abreviaturas: 10-HP, p-hidroxifenilo; 10-MHP, metoxi-hidroxifenilo o guayacil; pyrmv, piranomalvidina; 3-gl, 3-glucósido; 3-acgl, 3-(6"-acetil)-glucósido; 3-cmgl, 3-(6"-cumaroil)-glucósido; Cat, catequina.

6. Análisis sensorial descriptivo

Se llevó a cabo un análisis descriptivo sensorial con un panel entrenado para determinar los efectos sensoriales específicos de las dos estrategias: prefermentativas y fermentativas. Se realizó un ANOVA de dos factores con efecto fijo e interacciones sobre los datos sensoriales (Tabla 3.9). No hubo interacción entre los tratamientos prefermentativos y fermentativos en ninguno de los atributos de los vinos, evidenciando que no había ningún efecto sensorial sinérgico o antagónico de ambas estrategias. El efecto de la estrategia prefermentativa prevaleció en todos los atributos sensoriales. En resumen, el análisis descriptivo evidenció efectos significativos de los tratamientos prefermentativos para saturación del color, matiz violeta, frutado, especiado, balsámico, amargor y volumen en boca. A pesar de que hubo diferencias químicas en la acidez total, no fueron percibidas por los panelistas. Los vinos 2C y 2RV tuvieron mayor saturación del color y tono violeta que los vinos 1C. Contrariamente a los resultados obtenidos en parámetros CIELAB (Figura 3.3), no hubo diferencias significativas en la apreciación visual de la saturación del color en vinos de alcohol reducido (2RV) cuando se compararon con los controles (2C). Este resultado presentó evidencias de que el uso de vino de alcohol reducido en la matriz del vino Malbec no afectó negativamente la percepción del color.

TABLA 3.8. Valores probables (ANOVA de dos factores) para el tratamiento prefermentativo (TPF) y el fermentativo (TF) de antocianinas, piranoantocianinas (PA) y aductos directos en vinos Malbec.

Parámetros	p valor^a por factor		
	TPF	TF	TPF x TF
Glucosilado	0,2604	0,0710	0,5488
Acetilado	0,7776	0,0510	0,3518
Cinamoilado	0,8456	0,0727	0,4699
Vitisinas	<0.0001	0,0259	0,8125
Hidroxifenil-PA	<0.0001	0,3128	0,0232
Aductos flavanol-antocianina	<0.0001	0,2136	0,0525
Antocianos totales	0,1750	0,0505	0,5177

a- Se considera significativo cuando $p < 0,05$.

b- Efecto de interacción entre los tratamientos prefermentativos (TPF) y fermentativos (TF)

TABLA 3.9. Perfil sensorial de vinos Malbec obtenidos aplicando estrategias prefermentativas (TPF) y fermentativas (TF) de vinificación.

Tratamientos	Saturación de color	Matiz violeta	Fruta	Floral	Herbáceo	Especiado	Balsámico	Ácido	Astringente	Amargo	Volumen en boca
1C-EC1118	5.04* a	2.97 a	3.60 ab	1.96	1.92	1.84 ab	1.68	3.85	3.14 a	2.90 a	3.19 a
1C-BSc114	4.83 a	3.03 a	3.93 abc	2.35	1.56	1.24 a	1.99	4.01	3.97 abc	2.99 a	3.22 a
1C-Co	4.77 a	2.93 a	3.24 a	2.07	1.90	1.80 ab	1.93	3.84	3.64 ab	3.37 ab	3.44 a
2C-EC1118	6.79 b	5.28 b	4.44 abc	2.60	1.26	1.80 ab	2.56	3.45	4.12 bc	4.04 b	4.45 b
2C-BSc114	6.97 b	5.69 b	4.14 abc	2.53	1.94	2.68 b	2.44	4.00	4.62 c	3.72 ab	4.53 b
2C-Co	6.51 b	4.98 b	4.00 abc	2.64	1.72	2.14 ab	2.91	3.86	4.69 c	3.77 ab	4.66 b
2RV-EC1118	6.77 b	5.18 b	4.75 bc	2.30	1.42	2.05 ab	2.31	4.27	4.17 bc	3.04 a	3.87 ab
2RV-BSc114	6.91 b	5.78 b	4.29 abc	2.89	1.35	2.41 b	2.79	4.23	4.51 bc	3.42 ab	4.56 b
2RV-Co	7.07 b	5.74 b	4.96 c	2.65	1.51	2.24 ab	2.46	4.28	4.7 c	2.87 b	4.38 b
1C	4.88 A	2.98 A	3.59 A	2.13	1.79	1.63 A	1.87 A	3.90	3.58 A	3.08 A	3.28 A
2C	6.76 B	5.32 B	4.20 AB	2.59	1.64	2.21 B	2.64 B	3.77	4.48 B	3.84 B	4.55 B
2RV	6.92 B	5.57 B	4.67 B	2.61	1.42	2.23 B	2.52 AB	4.26	4.46 B	3.11 A	4.27 B
EC1118	6.20	4.48	4.27	2.29	1.53	1.89	2.18	3.86	3.81 a	3.32	3.84
BSc114	6.24	4.83	4.12	2.59	1.61	2.11	2.40	4.08	4.36 β	3.38	4.11
Co	6.12	4.55	4.07	2.45	1.71	2.06	2.43	3.99	4.34 β	3.33	4.16
ANOVA de dos factores											
TPF	<0.0001	<0.0001	0.0020	0.2220	0.2410	0.0160	0.0200	0.2690	<0.0001	0.0060	<0.0001
TF	0.8530	0.3650	0.8010	0.6310	0.7020	0.6260	0.6470	0.7720	0.0470	0.9790	0.2900
Interacción (TPF x TF)	0.6830	0.6200	0.4630	0.9340	0.3990	0.1220	0.8450	0.9470	0.9180	0.5270	0.7500

Media: letras romanas minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba Tukey HSD, $p < 0.05$). Diferentes letras griegas indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre vinos de estrategias fermentativas. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre vinos de estrategias prefermentativas. Estrategias prefermentativas (TPF): 1C, vinos de 1ª cosecha (22°Brix); 2C, vinos de 2ª cosecha (24°Brix); 2RV, vinos de alcohol reducido. Estrategias fermentativas (TF): EC1118 cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*; BSc114 cepa regional de *Saccharomyces cerevisiae*; Co, Co-inoculación *Saccharomyces cerevisiae*/ *Hanseniaspora uvarum* (BH9/BSc114).

El perfil aromático sensorial de los vinos reveló que las principales diferencias se encontraron entre vinos 1C y ambos tratamientos provenientes de la segunda cosecha. De acuerdo con el análisis descriptivo sensorial, la producción de vinos Malbec de hasta un 1,4 %v/v menos de alcohol empleando la estrategia 2RV no provocó cambios significativos en la percepción de ningún aroma al comparar con vinos del mismo momento de vendimia (2C). Schelezki *et al.* (2020) reportaron resultados similares en vinos Cabernet Sauvignon y Syrah de Australia, y Piccardo *et al.* (2019) en vinos Pinot Noir y Tannat de Uruguay.

Los vinos se comportaron de manera similar para los atributos volumen en boca y astringencia, siendo los dos de mayor intensidad de la segunda cosecha (2C y 2RV). En el caso de la astringencia, también hubo un efecto significativo de la estrategia fermentativa, los vinos EC1118 mostraron niveles menores de astringencia que BSc114 y Co. En ambos casos, la percepción de este atributo de volumen en boca estuvo en concordancia con la medición de contenido de taninos por precipitación de proteínas que se puede observar en la Figura 3.2. Existe evidencia considerable que respalda que los vinos con alto contenido de alcohol pueden resultar más amargos que los vinos control (Kutyna *et al.*, 2010; Fontoin *et al.*, 2008; Noble, 1994; Fischer *et al.*, 1994). Esta situación es evidente en este ensayo en el que el vino 2C es más amargo que los otros.

Para explorar más a fondo la influencia comparativa de las estrategias prefermentativas y fermentativas en el perfil sensorial de los vinos, el conjunto de datos obtenidos de la degustación sensorial se sometió a un análisis de componentes principales (ACP). El *biplot* del ACP y las elipses de confianza se construyeron con un 95 % de confianza según la prueba de Hotelling (Husson *et al.*, 2005), que proporciona *tests* de significancia. El tamaño de las elipses de confianza está relacionado con la variabilidad de cada vino (Figura 3.6 A), mientras que los puntos de color en el *loading plot* mostraron la variabilidad en los atributos sensoriales (Figura 3.6 B). La dimensión 1 muestra que los vinos fueron separados principalmente por las estrategias prefermentativas, con el primer componente principal explicando ~63 % de la varianza total (Figura 3.6). Los vinos 1C se agrupan en la región negativa de la dimensión 1, mientras que los de 2C y 2RV están agrupados en la región positiva de la dimensión 1 (Figura 3.6 A). El *factor map* reveló una superposición significativa entre los vinos de la primera cosecha (1C) indicando que no hay diferencias entre las estrategias fermentativas aplicadas a la matriz. Una situación similar ocurrió con las elipses de los vinos 2C y 2RV excepto para los vinos 2C- BSc114 y 2RV-Co que parecen ser vinos significativamente diferentes. El *loading*

plot correspondiente (Figura 3.6 B) evidenció que la separación de los vinos en el primer componente principal puede atribuirse al descriptor herbáceo cargado negativamente en la primera dimensión con casi el resto de los atributos cargados positivamente. La excepción fueron la acidez y el amargor que fueron ubicados positiva y negativamente en la segunda dimensión.

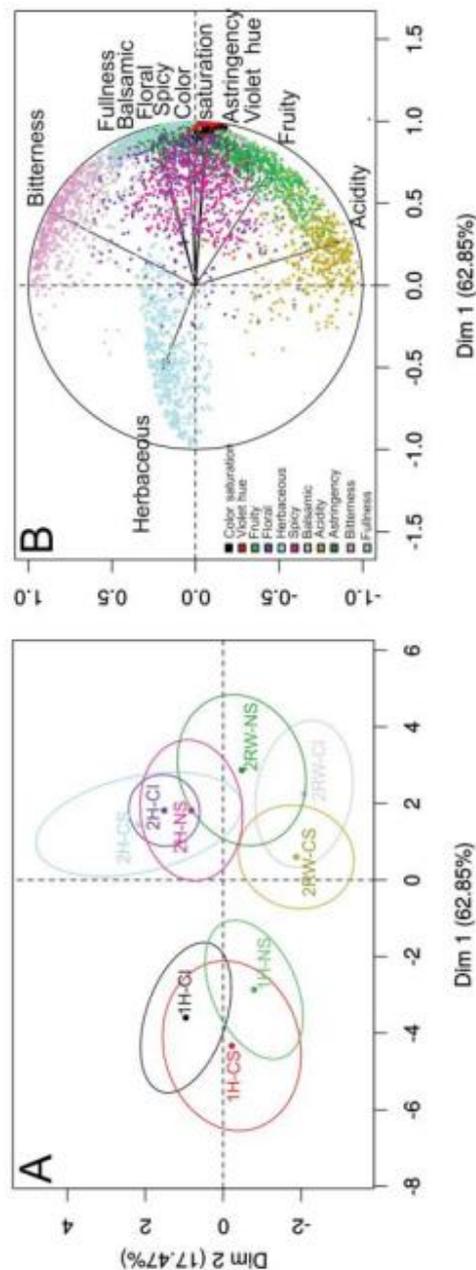


FIGURA 3.6. Análisis de componentes principales (ACP) de datos sensoriales descriptivos de vinos Malbec evaluados por un panel entrenado ($n = 12$). (A) mapa del factor vino. (B) atributos sensoriales con elipses de confianza del 95 % basadas en la distribución multivariada de la prueba de Hotelling ($p < 0,05$).

IV.CONCLUSIONES

La combinación de estrategias: *blend* de mostos/vinos y la inoculación de levaduras regionales redujo los niveles de pH y etanol de los vinos Malbec e impactó positivamente en la composición fenólica, especialmente en taninos, antocianinas y pigmentos poliméricos, que tienen repercusión en el color final y las sensaciones en boca.

Los vinos en los cuales se reemplazó una parte del mosto con vino de uvas poco maduras y que se inocularon con levadura regional *S. cerevisiae* BSc114 o inoculación secuencial *H. uvarum*/*S. cerevisiae* fueron los tratamientos más efectivos en la reducción del alcohol y el pH de los vinos. Tuvieron mayor potencial polifenólico que los otros tratamientos y no se alteraron significativamente las características organolépticas de los vinos resultantes. Adicionalmente, se obtuvo el resultado esperado en relación a las características físico-químicas, en particular, una reducción de 1,4% v/v en el grado alcohólico y 0,3 puntos del pH.

Cabe destacar que la estrategia prefermentativa no alteró la composición polifenólica de los vinos de uvas más maduras. Esto se considera positivo y se atribuye al efecto de la reducción del pH que favoreció la extracción en el proceso de vinificación, es decir que este tratamiento no implicó pérdida de antocianinas. Este último, también se evidenció en los tratamientos inoculados con levadura autóctona dentro de las estrategias fermentativas, ya que se evaluaron mayores contenidos de antocianinas y taninos.

Tanto la estrategia prefermentativa como la fermentativa tuvieron un rol importante sobre el color resultante, incluyendo también su interacción. Los vinos del segundo punto de cosecha tuvieron colores más intensos (oscuros) y con tonalidades violetas, observándose mayor impacto en los vinos 2RV. A la vez que la estrategia fermentativa evidenció que los monoinóculos de levaduras regionales resultaron en la acentuación de estas características en sus respectivos vinos. En este análisis también se advirtió que la reducción del pH resulta ser clave en este parámetro. Estos resultados se corresponden con la composición polifenólica de los vinos.

El estudio sensorial, derivó en una diferenciación entre vinos de la 1C y de la 2C, tanto 2C como 2RV. Este último grupo se caracterizó por poseer buen volumen en boca y astringencia, así como alta saturación de color y matices violetas. Por otro lado, a nivel aromático se describieron como frutados, especiados y balsámicos, careciendo de notas herbáceas. Todos estos atributos se condicen con los perfiles buscados por los consumidores: color intenso, aromas a frutas maduras y de gran cuerpo, demostrando que la combinación de estrategias aplicadas generó vinos

cualitativamente similares a los obtenidos de la 2C. Así también como que los cambios en la matriz (alcohol y pH) incidieron positivamente en estos.

Se concluye entonces, que las tecnologías propuestas en este trabajo podrían resultar herramientas sencillas y económicas para la producción de vinos tintos de bajo grado alcohólico, de alta calidad química y organoléptica.

Los resultados de este trabajo han sido publicados el 18 de noviembre de 2020:

Fanzone, M. L., Sari, S. E., Mestre, M. V., Catania, A. A., Catelén, M. J., Jofré, V. P., González-Miret, M. L., Combina, M., Vazquez, F., Maturano, Y. P. (2020). *Combination of pre-fermentative and fermentative strategies to produce Malbec wines of lower alcohol and pH, with high chemical and sensory quality*. OENO One, 54(4). <https://doi.org/10.20870/oenone.2020.54.4.4018>

V.BIBLIOGRAFÍA

- Abalos, D., Vejarano, R., Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J. A. (2011). *The use of furfural as a metabolic inhibitor for reducing the alcohol content of model wines*. European Food Research and Technology, 232(4), 663–669.
- Adams, D. O., Harbertson, J. F., Picciotto, E. A. (2004). *Fractionation of Red Wine Polymeric Pigments by Protein Precipitation and Bisulfite Bleaching*. In A. L. Waterhouse & J. A. Kennedy (Eds.), *Red Wine Color* 886, 275–288. American Chemical Society.
- Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau (2021) *Quick Reference Guide to Wine Excise Tax*. <https://www.ttb.gov/tax-audit/quick-reference-guide-to-wine-excise-tax#one>
- Alston J.M., Fuller K.B., Lapsley J.T., Soleas G., Tumber K.P. (2013) *The High and Rising Alcohol Content of Wine*. In: Giraud-Héraud E., Pichery MC. (eds) *Wine Economics*. Applied Econometrics Association Series. Palgrave Macmillan, London.
- Arroyo-López, F. N., Pérez-Torrado, R., Querol, A., Barrio, E. (2010). *Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast Saccharomyces kudriavzevii differs from that exhibited by Saccharomyces cerevisiae and their hybrid*. Food Microbiology, 27(5), 628–637
- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., Zapparoli, G. (2012). *Effects of Torulaspora delbrueckii and Saccharomyces cerevisiae mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine*. European Food Research and Technology, 235(2), 303–313
- Beech, F.W., Burroughs, L.F., Timberlake, C.F., Whiting, G.C. (1979). *Progrès recents sur l'aspect chimique et antimicrobienne de l'anhydride sulfureux*. Bulletin de l'OIV: 52: 1001-1022.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarede, I., Dubourdiou, D. (2008). *Impact of mixed Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae culture on high-sugar fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 122: 312-320.
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S. (2015). *Combine use of selected Schizosaccharomyces pombe and Lachancea thermotolerans yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production*. Molecules, 20(6), 9510–9523.
- Berbegal, C., Fragasso, M., Russo, P., Bimbo, F., Grieco, F., Spano, G., Capozzi, V. (2019). *Climate changes and food quality: the potential of microbial activities as mitigating strategies in the wine sector*. Fermentation, 5(4), 85
- Bindon, K., Holt, H., Williamson, P. O., Varela, C., Herderich, M., Francis, I. L. (2014). *Relationships between harvest time and wine composition in Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon 2. Wine sensory properties and consumer preference*. Food Chemistry, 154, 90–101
- Bindon, K., Varela, C., Kennedy, J., Holt, H., Herderich, M. (2013). *Relationships between harvest time and wine composition in Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon*. Grape and wine chemistry. Food Chemistry, 138 (2-3), 1696–1705

- Biyela, B. N. E., du Toit, W. J., Divol, B., Malherbe, D. F., van Rensburg, P. (2009). *The production of reduced-alcohol wines using Gluzyme Mono® 10.000 BG-treated grape juice*. South African Journal of Enology & Viticulture, 30(2).
- Blanco-Vega, D., López-Bellido, F. J., Alía-Robledo, J. M., Hermosín-Gutiérrez, I. (2011) *HPLC–DAD–ESI-MS/MS Characterization of Pyranoanthocyanins Pigments Formed in Model Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(17), 9523–9531
- Bordenave, L., Dai, Z.W., Lusson, A., Ollat, N., Delrot, S. (2013) *Vines accumulating less sugars. Alcohol reduction in wine*. Teissedre PL, editor: *Alcohol reduction in wine*. Oenoviti International Network. Merignac: Vigne et Vin Publications Internationales 2013. p.14-20.
- Böttrcher, C., Harvey, K., Forde, C. G., Boss, P. K., Davies, C. (2010). *Auxin treatment of pre-veraison grape (Vitis vinifera L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 17(1), 1–8.
- Canals, R., del Carmen Llaudy, M., Canals, J. M., Zamora, F. (2008). *Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine*. European Food Research and Technology, 226 (5), 1183–1190.
- Canals, R., Llaudy, M. C., Valls, J., Canals, J. M., Zamora, F. (2005). *Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4019–4025.
- Canonico, L., Comitini, F., Oro, L., Ciani, M. (2016). *Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-Saccharomyces Yeast for Reduction of Ethanol Content in Wine*. Frontiers in Microbiology, 7.
- Carimi F, Mercati F, de Michele R, Fiore MC, Riccardi P and Sunseri F. (2011) *Intra-varietal genetic diversity of the grapevine (Vitis vinifera L.) cultivar 'Nero d'Avola' as revealed by microsatellite markers*. Genet Resour Crop Evol 58: 967–975
- Carnacini, A., Marignetti, N., Antonelli, A., Natali, N., Migazzi, S. (1989). *Alcohol removal and aroma recovery from wine by permoseparation, dialysis, and extraction with CO₂*. Industrie delle Bevande, 18: 257-264.
- Casassa, L., Sari, S., Bolcato, E., Fanzone, M. (2019). *Microwave-assisted extraction applied to Merlot grapes with contrasting maturity levels: effects on phenolic chemistry and wine color*. Fermentation, 5(1), 15.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). *Flavonol Profiles of Vitis vinifera Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines*. Journal of agricultural and food chemistry, 55: 992-1002.
- Çelik, Z., Erten, H., Darici, M., Cabaroğlu, T. (2017). *Molecular characterization and technological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of Vitis vinifera L.cv. Narince grape must grown in ancient wine making area Tokat, Anatolia*. In J. Aurand (Ed.), BIO Web of Conferences 2017. EDP Sciences.

- Chinaud, N., Broussous, P., Ferrari, G. (1991) *Application de l'osmose inverse à la désalcoolisation des vins*. Journal international des sciences de la vigne et du vin, 25: 245-250.
- Ciani M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. (2010) *Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking*. FEMS Yeast Research, 10:123-133.
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F. (2006). *Fermentation behavior and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations*. International Journal of Food Microbiology, 108(2), 239–245.
- Ciani, M., Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I, (2013) *Lachancea thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine*. Food Microbiol, 33:271-281.
- Ciani, M., Gobbi, M., De Vero, L., Solieri, L., Comitini, F., Oro, L., Giudici, L., (2014) *Fermentative aptitude of non-Saccharomyces wine yeast for reduction in the ethanol content in wine*. European Food Research and Technology, 239: 41-48.
- CIE (2004). Technical report colorimetry. Commission Internationale de l'Éclairage Central Bureau. Vienna, Austria
- CIE, 1986. Colorimetry, Versión actualizada: CIE 015:2018. <http://www.cie.co.at/>
- Clemente-Jiménez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Vázquez, F.J.L., Rodríguez-Vico, F. (2005). *Influence of sequential mixtures on wine fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 98: 301-308.
- Clingeleffer, P.R., Smith, B., Edwards, E., Collins, M., Morales, N., Davis, H., (2011) *Industry puts low–medium vigour rootstocks to the test*. Wine & Viticulture Journal 3:72–76.
- Cochetel, N., Hévin, C., Vivin, P., Ollat, N., Lauvergeat, V., (2019) *Grapevine rootstocks differentially regulate root growth and architecture in response to nitrogen availability*. Proceedings of the XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics. Acta Horticulturae 1248, Vol. 1248, ed. by Delrot S, Ollat N and Gallusci P. ISHS, Leuven, Belgium, pp. 521–530.
- Cohen, S.D., Tarara, J.M., Gambetta, G.A., Matthews, M.A., Kennedy, J.A., (2012) *Impact of diurnal temperature variation on grape berry development, proanthocyanidin accumulation, and the expression of flavonoid pathway genes*. J Exp Bot 63: 2655–2665.
- Conidi, C., Castro-Muñoz, R., Cassano, A. (2020). *Nanofiltration in beverage industry*. Nanotechnology in the Beverage Industry, 525–548
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C. (2014) *Evaluation of Non-Saccharomyces Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine*. Applied and Environmental Microbiology, 80 (5): 1670 –1678.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P.A, Curtin, C., Varela, C. (2015). *The application of non-Saccharomyces yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content*. International journal of food microbiology, 205: 7-15.

- Coulter, A. D., Henschke, P. A., Simos, C. A., Pretorius, I. S. (2008). *When the heat is on, yeast fermentation runs out of puff*. Australian and New Zealand Wine Industry Journal, 23, 26-30.
- Coviari y Observatorio Argentino (2017) Informe de vigilancia tecnológica: Desalcoholización de vinos en [https://observatoriova.com › uploads › 2017/08](https://observatoriova.com/uploads/2017/08)
- Cuello, R. A., Flores Montero, K. J., Mercado, L. A., Combina, M., Ciklic, I. F. (2017). *Construction of low-ethanol-wine yeasts through partial deletion of the Saccharomyces cerevisiae PDC2 gene*. AMB Express, 7(1).
- Cus, F. (2004) Influence of crop load on yield and grape quality of cv. Chardonnay. Acta agriculturae slovenica, 83 - 1, junio 2004.
- Dangles, O., Fenger J.A. (2018) The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition en Molecules 2018, 23, 1970.
- Dequin, S.; Baptista, E.; Barre, P. (1999) *Acidification of grape musts by Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains genetically engineered to produce lactic acid*. American journal of enology and viticulture 50, 45-50.
- Diban, N., Arruti, A., Barceló, A., Puxeu, M., Urtiaga, A., Ortiz, I. (2013). *Membrane dealcoholization of different wine varieties reducing aroma losses. Modeling and experimental validation*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 20, 259–268.
- Diban, N., Athes, V., Bes, M., Souchon, I. (2008). *Ethanol and aroma compounds transfer study for partial dealcoholization of wine using membrane contactor*. Journal of Membrane Science, 311(1-2), 136–146.
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F., Barile, D. (2014). *Use of non-Saccharomyces wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine*. Food Microbiology, 43, 5–15.
- Du Plessis, H., Du Toit, M., Nieuwoudt, H., Van der Rijst, M., Hoff, J., Jolly, N. (2019). *Modulation of wine flavor using Hanseniaspora uvarum in combination with different saccharomyces cerevisiae, lactic acid bacteria strains and malolactic fermentation strategies*. Fermentation, 5(3), 64.
- Duchêne E, Huard F, Dumas V, Schneider C and Merdinoglu D, (2010) *The challenge of adapting grapevine varieties to climate change*. Climate Res 41: 193–204
- Duchêne, É., Dumas, V., Butterlin, G., Jaegli, N., Rustenholz, C., Chauveau, A., Merdinoglu, D. (2020). *Genetic variations of acidity in grape berries are controlled by the interplay between organic acids and potassium*. Theoretical and Applied Genetics.
- Duchêne, E., Dumas, V., Jaegli, N., Merdinoglu, D. (2012). *Deciphering the ability of different grapevine genotypes to accumulate sugar in berries*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 18(3), 319–328.
- Englezos V., Rantsiou K., Torchio F., Rolle L., Gerbi V., Cocolin L. (2015). *Exploitation of the non-Saccharomyces yeast Starmerellabacillaris (synonym Candida zemplinina) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations*. International Journal of Food Microbiology, 199: 33–40.

- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., Cocolin, L. (2016). *Starmmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5515–5526.
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., Charpentier, C. (2001). *Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on color stability and wine astringency*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 153–159.
- Escribano-Bailón, T., Álvarez-García, M., RivasGonzalo, J. C., Heredia, F. J., Santos-Buelga, C. (2001). *Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-o-glucoside and (+)-catechin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1213–1217.
- Escudero-Gilete, M. L., González-Miret, M. L., Heredia, F. J. (2010). *Implications of blending wines on the relationships between the color and the anthocyanic composition*. *Food Research International*, 43(3), 745–752.
- Evans, P. (2013) *Profitability and health our two immediate priorities*. *Wine Vitc J*. 28: 10
- Fanzone Sánchez, M.L. (2012) *Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (Vitis Vinifera L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial*. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona.
- Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., Gómez-Cordovés, C., Peña-Neira, Á. (2011). *Phenolic characterization of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina)*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 704–718.
- Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., Peña-Neira, A. (2011). *Phenolic composition of malbec grape skins and seeds from Valle de Uco (Mendoza, Argentina) during ripening. Effect of cluster thinning*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (11), 6120–6136.
- Fañanás Puigjaner, G.; Sarrá Paloma, A. (2020) *Desalcoholización del vino*. Tesis de grado en Ingeniería en Tecnologías Industriales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona/Universidad Politécnica de Catalunya.
- Fernández O., Sánchez S., Rodríguez L., Lissarrague J.R. (2013) *Effects of different irrigation strategies on berry and wine composition on Cabernet sauvignon grapevines grown in Madrid (Spain)*. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, Volume 28, Proceedings 18th International Symposium GiESCO, Porto, 7-11 July 2013, 112-117.
- Ferraro, L., Fatichenti, Ciani, M. (2000). *Pilot scale vinification process using immobilized Candida stellata cells and Saccharomyces cerevisiae*. *Process Bioch*, 35:1125-1129.
- Ferreira, J., Toit, M. D., Toit, W. J. D. (2006). *The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1), 50–56.

- Filippetti, I., Movahed, N., Allegro, G., Valentini, G., Pastore, C., Colucci, E., Intrieri, C. (2014). *Effect of post-veraison source limitation on the accumulation of sugar, anthocyanins and seed tannins in Vitis vinifera cv. Sangiovese berries*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 21(1), 90–100
- Fischer, U., Noble, A.C. (1994) *The Effect of Ethanol, Catechin Concentration, and pH on Sourness and Bitterness of Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 45: 6-10.
- Fleet, G. H. (2003). *Yeast interactions and wine flavour*. International Journal of Food Microbiology, 86: 11-22.
- Fleet, G. H. (2008). *Wine yeasts for the future*. FEMS Yeast Research, 8: 979-995
- Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P.L.; Glories, Y. (2008) *Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution*. Food Qual.Preference, 19, 286–291.
- Ford, R.J. (2007) *The effect of shading and crop load on flavour and aroma compounds in Sauvignon blanc grapes and wine*. Thesis for Degree of Master of Applied Science at Lincoln University at <https://core.ac.uk/download/pdf/35459294.pdf>
- Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J.M., Moutounet, M., Cheynier, V. (2006). *Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(19), 7331–7338.
- García-Martín, N., Perez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., Mihnea, M., González-Sanjosé, M. L., Hernández, A. (2010). *Sugar reduction in musts with nanofiltration membranes to obtain low alcohol-content wines*. Separation and Purification Technology, 76(2), 158–170.
- Gardner, J.M., Walker, M.E., Boss, P.K., Jiranek, V. (2020) *The effect of grape juice dilution on oenological fermentation*. BioRxiv.
- Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., Schückel, J., Zietsman, A. J. J., Willats, W. G. T., Moore, J. P., Du Toit, W. J. (2019). *Investigating the relationship between grape cell wall polysaccharide composition and the extractability of phenolic compounds into Shiraz wines. Part I: Vintage and ripeness effects*. Food Chemistry, 278, 36–46.
- Giacosa, S., Marengo, F., Guidoni, S., Rolle, L., Hunter, K. (2015). *Anthocyanin yield and skin softening during maceration, as affected by vineyard row orientation and grape ripeness of Vitis vinifera L. cv. Shiraz*. Food Chemistry, 174: 8-15.
- Gil, M., Estevez, S., Kontoudakis, N., Fort, F., Canals, J.M. and Zamora, F. (2013) *Influence of partial dealcoholization by reverse osmosis on red wine composition and sensory characteristics*. European Food Research and Technology, 237, 481–488.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine*. Food Microbiology, 33(2), 271–281.

- Godden, P., Wilkes E., Johnson, D. (2015) *Trends in the composition of Australian wine 1984–2014*. Australian Journal of Grape and Wine Research 21, 741–753
- Godden, P., Muhlack, R. (2010). *Trends in the composition of Australian wine, 1984-2008*. Australian and New Zealand grapegrower and winemaker, 558: 47-61.
- Goldner, M.C.; Zamora, M.C.; Di Leo L., Paola, M.R.; Gianninoto, H., Bandoni, A.L. (2003) Effect of ethanol level in the perception of aroma attributes and the detection of volatile compounds in red wine. Journal Of Sensory Studies; 24; 2; 4-2009; 243-257
- Gómez-Plaza, E., López-Nicolás, J., López-Roca, J., Martínez-Cutillas, A. (1999). *Dealcoholization of Wine. Behaviour of the Aroma Components during the Process*. LWT - Food Science and Technology, 32(6), 384–386.
- Gonzalez R., Quirós M., Morales, P. (2012) *Yeast respiration of sugars by non-Saccharomyces yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines*. Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino. Logroño, España.
- Gonzalez-Huerta, C. (2006). Estudio de desalcoholización parcial de vinos mediante columna de cono rotatorio: características del vino *final*. III JORNADAS ENOLÓGICAS DE CANARIAS. LANZAROTE.
- Goold, H. D.; Kroukamp, H.; Williams, T. C.; Paulsen, I. T.; Varela, C.; Pretorius, I. S. (2017) *Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines*. Microbial Biotechnology, 10(2), 264–278.
- Gordillo, B., Cejudo-Bastante, M. J., Rodríguez Pulido, F. J., Jara-Palacios, M. J., Ramírez-Pérez, P., González-Miret, M. L., Heredia, F. J. (2014). *Impact of adding white pomace to red grapes on the phenolic composition and color stability of Syrah wines from a warm climate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(12), 2663–2671.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F., González-Miret, L., Quijada-Morín, N., Rivas-Gonzalo, J., García-Estévez, I., Heredia, F., Escribano-Bailón, M.T. (2015). *Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin–flavonol–flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63: 7645-7653.
- Grønbaek, M. (2009). *The positive and negative health effects of alcohol- and the public health implications*. Journal of Internal Medicine, 265(4), 407–420.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Pardo, C., Moreno-Simunovic Y. (2019) *Effects on berry shrinkage in Vitis vinifera. L cv. 'Merlot' from changes in canopy/ root ratio: a preliminary approach*. S Afr J Enol 40:47–52.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Verdugo-Vásquez, N., Carrasco-Quiroz, M., Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A.M., Moreno-Simunovic, Y. (2018) *Carignan phenolic composition in wines from ten sites of the Maule Valley (Chile): location and rootstock implications*. Sci Horti 234: 63–73.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Zheng, W., Martínez de Toda, F. (2020). *Strategies in vineyard establishment to face global warming in viticulture: a mini review*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 101(4).

- Han, D. H., & Lee, C. H. (2004). *The effects of GA3, CPPU and ABA applications on the quality of Kyoho (Vitis Vinifera L. x Labrusca L.) grape*. *Acta Horticulturae*, (653), 193–197
- Harbertson, J. F., Spayd, S. (2006). *Measuring Phenolics in the Winery*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 280–288.
- Harbertson, J.F., Mireles, M.S., Harwood, E.D., Weller, K.M., Ross, C.F. (2009) *Chemical and sensory effects of saignee, water addition, and extended maceration on high brix must*. *American Journal of Enology and Viticulture* 60, 450-460.
- Harbertson, J.F., Picciotto, E.A, Adams., D.O. (2003). *Measuring polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching*. *American Journal of Viticulture and Enology*, 54:301-306.
- Harbertson, J.F; Keller, M. (2012) *Rootstock Effects on Deficit-Irrigated Winegrapes in a Dry Climate: Grape and Wine Composition*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63:1.
- Hed, B., Ngugi, H. K., Travis, J. W. (2014). *Short- and Long-Term Effects of Leaf Removal and Gibberellin on Chardonnay Grapes in the Lake Erie Region of Pennsylvania*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(1), 22–29
- Henderson, C. M., Lozada-Contreras, M., Jiranek, V., Longo, M. L., Block, D. E. (2012). *Ethanol Production and Maximum Cell Growth Are Highly Correlated with Membrane Lipid Composition during Fermentation as Determined by Lipidomic Analysis of 22 Saccharomyces cerevisiae Strains*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 91–104
- Hendgen, M., Schubert, S., Löhnertz, O. (2021) *Ethephon-induced leaf senescence increases the concentration of yeast-assimilable nitrogen in grape must (Vitis vinifera cv. Riesling)*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*.
- Heredia, F. J., Alvarez, C., González-Miret, M. L., Ramírez, A. (2004) *CromaLab®. Análisis de color*. Registro de la Propiedad Intelectual No. SE-1052-04. [Software]
- Heredia, T. M., Adams, D. O., Fields, K. C., Held, P. G., Harbertson, J. F. (2006). *Evaluation of a Comprehensive Red Wine Phenolics Assay Using a Microplate Reader*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(4), 497–502.
- Heux, S., Sablayrolles, J.M., Cachon, R., Dequin, S. (2006). *Engineering a Saccharomyces cerevisiae wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5822-5828.
- Heymann, H., Lawless, H. T. (2010). *Descriptive Analysis. In Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices*. Springer Publishing. Segunda edición, pp. 227–258.
- Hong, Y.-A., Park, H.-D. (2013) *Role of non-Saccharomyces yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of Hanseniaspora uvarum as a starter culture*. *Food Microbiology*, 34(1), 207–214.
- Hopper, H., Ebeler, S. E., Heymann, H. (2012). *How blending affects the sensory and chemical properties of red wine*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(3), 313–324.

- Husson, F., Lê, S., Pagès, J. (2005). *Confidence ellipse for the sensory profiles obtained by principal component analysis*. Food Quality and Preference, 16(3), 245–250
- Ivit, N.N., Longo, R.; Kemp, B. (2020) *The Effect of Non-Saccharomyces and Saccharomyces Non-Cerevisiae Yeasts on Ethanol and Glycerol Levels in Wine*. En Fermentation 2020, 6, 77.
- Jakab G, Csikasz-Krizsics A, Hartman B, Werner J, Kozma P. (2013) *Vineyards adaptation and varieties: the effect of varieties, clones and rootstocks on must sugar content*. Teissedre PL, editor: *Alcohol reduction in wine*. Oenoviti International Network. Merignac: Vigne et Vin Publications Internationales; 2013: 9–13.
- Jones, G., White, M., Cooper, O., Storchmann, K. (2005). *Climate Change and Global Wine Quality*. Climatic Change, 73: 319-343.
- Keller, M.M. (2010). *Managing grapevines to optimize fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists*. Aust. J.Grape Wine Res. 16, 56–69.
- Kilmister, R. L., Mazza, M., Baker, N. K., Faulkner, P., Downey, M. O. (2014). *A role for anthocyanin in determining wine tannin concentration in Shiraz*. Food Chemistry, 152, 475–482.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, N., Fort, F., Canals, J.M., Zamora, F. (2011) *Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine*. Australian Journal of Grape and Wine Research.
- Kutyna, D., Varela, C., Henschke, P., Chambers, P., Grant, S. (2010) *Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine*. Trends in Food Science & Technology. 21. 293-302.
- Lawless H.T., Heymann H. (2010) *Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices*. 2nd Edition. New York: Springer, 2010: 620.
- Le Berre, E., Atanasova, B., Langlois, D., Etiévant, P., Thomas-Danguin, T. (2007). *Impact of ethanol on the perception of wine odorant mixtures*. Food Quality and Preference, 18(6).
- Liang, N.-N., He, F., Bi, H.-Q., Duan, C.-Q., Reeves, M. J., Wang, J. (2012). *Evolution of flavonols in berry skins of different grape cultivars during ripening and a comparison of two vintages*. European Food Research and Technology, 235(6), 1187–1197.
- Lisanti, M. T., Gambuti, A., Genovese, A., Piombino, P., Moio, L. (2012). *Partial Dealcoholization of Red Wines by Membrane Contactor Technique: Effect on Sensory Characteristics and Volatile Composition*. Food and Bioprocess Technology, 6(9), 2289–2305.
- Lleixà, J., Martín, V., Portillo, M. del C., Carrau, F., Beltran, G., Mas, A. (2016). *Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of Hanseniaspora vineae and Saccharomyces cerevisiae*. Frontiers in Microbiology, 7, 338.
- Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M. J., González, C., Calderón, F., Suárez-Lepe, J. A. (2015). *Use of Schizosaccharomyces pombe and Torulaspora*

delbrueckii strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Research International*, 76, 325–333.

- Longo, R., Torley, P., Rogiers, S., Blackman, J., Schmidtke, L. (2017). Changes in volatile composition and sensory attributes of wines during alcohol content reduction. *Journal of the science of food and agriculture*. 97. 10.1002/jsfa.7757.
- Main, G., Morris, J., Striegler, K. (2002). *Rootstock effects on Chardone productivity, fruit, and wine composition*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(1): 37-40.
- Mandelli F., Miele A., Rizzon L.A., Zanus M.C. (2008). *Efeito da poda verde na composição físico-químico do mosto de uva Merlot*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 667-674.
- Mangindaan, D., Khoiruddin, K., Wenten, I.G., (2017) *Beverage dealcoholization processes: Past, present, and future*, *Trends in Food Science & Technology*.
- Margallo, M., Aldaco, R., Barceló, A., Diban, N., Ortiz, I., & Irabien, A. (2015) *Life cycle assessment of technologies for partial dealcoholisation of wines*. *Sustainable Production and Consumption*, 2, 29–39
- Marignetti, N., Carnacini, A., Antonelli, A., Natali, N. (1992). *Proceso per la dealcoholizione del vino e della birra con CO2 allostatosolido*. *Industrie delle Bevande*, 21:369-374.
- Martinez, A., Aleixandre Tудо, J.L., Aleixandre, J.L. (2016) *Efectos de los fenómenos producidos por el cambio climático sobre la calidad de los vinos*. *Revista Enoviticultura nro 42 de la Universidad Politécnica de Valencia*.
- Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., Negueruela, A. I. (2001). *Note. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines*. *Food Science and Technology International*, 7(5), 439–444.
- Martínez-Pérez, M.P., Bautista-Ortín, A.B., Pérez-Porras, P., Jurado, R., Gómez-Plaza, E. (2020) *A New Approach to the Reduction of Alcohol Content in Red Wines: The Use of High-Power Ultrasounds*. *Foods* 2020, 9, 726.
- Maturano Y. P., Rodríguez Assaf L. A., Toro M. E., Nally M. C., Vallejo M., Castellanos de Figueroa L. I. (2012). *Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts during wine fermentation*. *International Journal of Food Microbiology*, 155: 43–50.
- Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Esteve-Zarzoso, B., Nally, M. C., Lerena, M. C., Toro, M. E., Vazquez, F., Combina, M. (2015). *Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines*. *International Journal of Food Microbiology*, 199, 23–32.
- Maturano, Y.P., Assof, M., Fabani, M.P., Nally, M.C., Jofre, V.P., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Castellanos, L.I., Vazquez, F. (2015a) *Enzymatic activities produced by mixed Saccharomyces and non-Saccharomyces cultures: relationship with wine volatile composition*. CONICET.
- Maturano, Y.P., Mestre, M.V., Kuchen, B., Toroa, M.E., Mercado, L., Vazquez, F., Combina, M. (2019). *Optimization of fermentation-relevant factors: A strategy to reduce ethanol in red wine by sequential culture of native yeasts*. *International Journal of Food Microbiology*, 289: 40-48.

- Mendez, M. P., Sanchez, L., Dokoozlian, N. (2011). *Crop load and irrigation management during the latter stages of ripening: effects on vine water status, fruit dehydration and fruit composition of Merlot grapevines*. Acta Horticulturae, 889: 67–74.
- Mendoza, L. M., de Nadra, M. C. M., Bru, E., Farías, M. E. (2009). *Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts in mixed culture*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 36(2), 229–237.
- Mercado L., Combina M., Maturano P., Mestre M. (2018) *Inóculos innovadores para enología: reducción del etanol en vinos mediante el uso de co-cultivos secuenciales de levaduras no-Saccharomyces y Saccharomyces*. Ficha técnica E.E.A Mendoza, INTA.
- Mestre Furlani, V., Maturano, P., Combina, M., Mercado, L., Toro, M., Vazquez, F. (2017). *Selection of non-Saccharomyces yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: A strategy to obtain wines with reduced ethanol content*. FEMS Yeast Research, 17.
- Mestre, M. V., Maturano, Y. P., Gallardo, C., Combina, M., Mercado, L., Toro, M. E., Dellacassa, E. (2019). *Impact on Sensory and Aromatic Profile of Low Ethanol Malbec Wines Fermented by Sequential Culture of Hanseniaspora uvarum and Saccharomyces cerevisiae Native Yeasts*. Fermentation, 5(3), 65.
- Mestre, V., Maturano, P., Mercado, L., Toro, M., Vazquez, F., Combina, M. (2016) *Evaluation of different co-inoculation time of non- Saccharomyces/Saccharomyces yeasts in order to obtain reduced ethanol wines*. BIO Web of Conferences, 7.
- Mira de Orduña, R. (2010). *Climate change associated effects on grape and wine quality and production*. Food Research International, 43: 1844-1855.
- Molina Espeja, P. (2020): *Genetic Engineering in Saccharomyces cerevisiae for Trendy Challenges en Next Generation Winemakers en Bioengineering* 7, 128.
- Molitor, D., Behr, M., Fischer, S., Hoffmann, L., Evers, D. (2011). *Timing of cluster-zone leaf removal and its impact on canopy morphology, cluster structure and bunch rot susceptibility of grapes*. OENO One, 45(3), 149–159
- Morales P., Rojas V., Quirós M., Gonzalez R. (2015). *The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture*. Applied Microbiology and Biotechnology, 99: 3993–4003.
- Mozell, M.R.; Thachn, L. (2014) *The impact of climate change on the global wine industry: Challenges & solutions*. Wine Economics and Policy 3: 81–89
- Noble, A.C. (1998) *Why Do Wines Taste Bitter and Feel Astringent? In Chemistry of Wine Flavour*. Waterhouse, A.L., Ebeler, S.E., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, USA; pp. 156–165.
- Noble, A. C. (1994). *Bitterness in wine*. Physiology & Behavior, 56(6), 1251–1255.
- Noble, A.C., Arnold, R.A., Buechsenstein, J., Leach, E.J., Schmidt, J.O., Stern, P.M. (1987) *Modification of a standardized system of wine aroma terminology*. American Journal of Enology and viticulture, 38 (2): 143-146.
- Novello, V.; De Palma, L. (2013) *Viticultural Strategy to Reduce Alcohol Levels in Wine*. Oenoviti Internacional Network, Alcohol level reduction in wine.

- O'Brien, P., Collins, C., Bei, R.D. (2021) *Leaf Removal Applied to a Sprawling Canopy to Regulate Fruit Ripening in Cabernet Sauvignon*. *Plants*, 10.
- OIV (2012). *Compendium of international methods of analysis of wines and musts*, vol.1. Organization Internationale de la Vigne et du Vin, Paris.
- Ozturk, B., Anli, E. (2014) *Different Techniques for Reducing Alcohol Levels in Wine: A Review*. *Proceedings of 37th World Congress of Vine and Wine, and 12th General Assembly of the OIV (Pt 1)* 3.
- Padilla, B., Gil, J. V., Manzanares, P. (2016) *Past and future of non-Saccharomyces yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 411.
- Paladino, S., Nazralla, J., Vila, H., Genovart, J., Sanchez, M.L., Maza, M. (2008) *Oxidación de los vinos tintos: influencia del pH*. *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XL. N° 2. Año 2008. 105-112
- Palliotti, A., Panara, F., Silvestroni, O., Lanari, V., Sabbatini, P., Howell, G. S., Poni, S. (2013) *Influence of mechanical postveraison leaf removal apical to the cluster zone on delay of fruit ripening in Sangiovese (Vitis vinifera L.) grapevines*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19, 369–377.
- Pallman, C., Brown, J., Olineka, T., Cocolin, L., Mills, D., Bisson, L. (2001) *Use of WL medium of profile native flora fermentations*. *Am. J. Enol. Viticult.* 52, 198–203.
- Peiró, R.; Soler, J.X.; Crespo, A.; Jiménez, C.; Cabello, F.; Gisbert, C. (2018) *Genetic variability assessment in 'Muscat' grapevines including 'Muscat of Alexandria' clones from selection programs*. *Span J Agric Res* 16:0702.
- Pérez-Magariño, S., González-SanJosé, M. L. (2003) *Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines*. *Food Chemistry*, 81(2), 301–306.
- Petkova, V., Mladenoska, I., Dimitrovski, D., Stafilov, T., Stefova, M. (2020) *Pre-Fermentativa treatment of grape juice and must from Vranec variety with a glucose oxidase from Aspergillus Niger* en *Proceedings of the international conference of experimental and numerical investigations and new technologies, CNNTech 2020*. Springer.
- Petrozziello, M., Panero, L., Guaita, M., Prati, R., Marani, G., Zinzani, G., Bosso, A. (2019). *Effect of the extent of ethanol removal on the volatile compounds of a Chardonnay wine dealcoholized by vacuum distillation*. *BIO Web of Conferences*, 12, 2020.
- Piccardo, D., Favre, G., Pascual, O., Canals, J.M., Zamora, F., Gonzalez-Neves, G. (2019). *Influence of the use of unripe grapes to reduce ethanol content and pH on the color, polyphenol and polysaccharide composition of conventional and hot macerated Pinot Noir and Tannat wines*. *European Food Research and Technology*. 245.
- Pickering GJ. (2000) *Low- and reduced-alcohol wine: a review*. *Journal of Wine Research*, 11(2):129–44.
- Pickering, G., Heatherbell, D.A. (1996) *Characterization of reduced alcohol wine made from glucose oxidase treated juice*. *Food Technology*, 26: 101-107.

- Pickering, G., Heatherbell, D.A., Barnes, M. F. (1999) *The Production of Reduced-Alcohol Wine Using Glucose Oxidase Treated Juice*. Part I. Composition. American Journal of Enology and Viticulture, 50: 291-298;
- Pickering, G.J.; Heatherbell, D.A.; Vanhanen, L.P.; Barnes, M.F. (1998) The effect of ethanol concentration on the temporal perception of viscosity and density in white wine. Am. J. Enol.Vitic. 49, 306–318.
- Poni, S., Bernizzoni, F., Civardi, S., Libelli, N. (2009) *Effects of pre-bloom leaf removal on growth of berry tissues and must composition in two red Vitis vinifera L. cultivars*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 15: 185-193.
- Poni, S., Gatti, M., Bernizzoni, F., Civardi, S., Bobeica, N., Magnanini, E., Palliotti, A. (2013). *Late leaf removal aimed at delaying ripening in cv. Sangiovese: physiological assessment and vine performance*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 19, 378–38.
- Pretorius, I. S. (2000) *Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking*. Yeast, 16: 675-729.
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., Morales, P. (2014) *Selection of non-Saccharomyces yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration*. International Journal of Food Microbiology, 181, 85–91.
- Rentzsch, M., Schwarz, M., Winterhalter, P. (2007). *Pyranoanthocyanins – an overview on structures, occurrence, and pathways of formation*. Trends in Food Science & Technology, 18(10), 526–534.
- Reynolds, A.,Wardle, D.A., Dever, M.J. (1996) *Vine performance, fruit composition, and wine sensory attributes of Gewürztraminer in response to vineyard location and canopy manipulation*. American Journal of Enology and Viticulture, 47: 77-92.
- Ribereau Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2006) *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 2nd Edition. Ed. Hemisferio Sur.
- Robinson A. L., Ebeler S. E., Heymann H., Boss P. K., Solomon P. S., Trengove R. D. (2009) *Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning*. J. Agric. Food Chem. 57 10313–10322.
- Rolle, L., Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Río Seade, S., Rantsiou, R., Giacosa, S., Gambuti, A., Gerbi, V., Cocoli, L. (2018) *Alcohol reduction in red wines by technological and microbiological approaches: a comparative study*. Australian Journal of Grape and Vine Research, 24 (1), 62-74.
- Romero, E., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I. (2013) *Chromatic characteristics and color-related phenolic composition of Brazilian young red wines made from the hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rúbea x IAC 1398-21)*. Food Research International,54: 33-43.
- Salgado, C. M., Fernández-Fernández, E., Palacio, L., Hernández, A., Prádanos, P. (2015) *Alcohol reduction in red and white wines by nanofiltration of musts before fermentation*. Food and Bioproducts Processing, 96, 285–295.

- Saliba, A., Ovington, L., Moran, C. (2013) *Consumer demand for low-alcohol wine in an Australian sample*. International Journal of Wine Research 2013:5 1–8
- Salmon, J.M., Languet P., Ortiz-Julien, A. (2007) *Colture miste di lieviti e fermentazione alcolica*. Rivista di Viticoltura e di Enologia, 3: 1–5.
- Schelezki, O., Deloire, A., Jeffery, D.W. (2020) *Substitution or Dilution? Assessing Pre-Fermentative Water Implementation to Produce Lower Alcohol Shiraz*. Wines Molecules 25, no. 9: 2245
- Schelezki, O., Smith, P., Hranilovic, A., Bindon, K., Jeffery, D. (2018) *Comparison of consecutive harvests versus blending treatments to produce lower alcohol wines from Cabernet Sauvignon grapes: Impact on polysaccharide and tannin content and composition*. Food Chemistry, 244: 50-59.
- Schmidtke, L.M., Blackman, J.W., Agboola, S.O. (2012) *Production technologies for reduced alcoholic wines*. Journal of Food Science, 77: R25–R41
- Schmitt, M., Christmann, M. (2019). *Alcohol Reduction by Physical Methods*. Advances in Grape and Wine Biotechnology.
- Schultz, H. R. (2000) *Climate change and viticulture: a European perspective on climatology, carbon dioxide, and UV-B effects*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 6: 2-12.
- Schultz, H.R., Jones, G.V. (2010) *Climate induced historic and future changes in viticulture*. Journal of Wine Research,21:137–45.
- Stoll, M., Scheidweiler, M., Lafontaine, M., Schultz, H.R. (2010) *Possibilities to reduce the velocity of berry maturation through various leaf area of fruit ratio modifications in Vitis Vinifera L Riesling*. Progres Agricole et Viticole 7 (3), 68:71.
- Swiegers, J.H.; Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A.; Pretorius, I.S. (2005) *Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 11: 139-73.
- Symons, G. M.; Davies, C.; Shavrukov, Y.; Dry, I. B.; Reid, J. B. (2006) *Grapes on Steroids Brassinosteroids Are Involved in Grape Berry Ripening*. Thomas, M. R. Plant Physiology 140 (1), 150–158
- Teng, B., Petrie, P. R., Smith, P. A., Bindon, K. A. (2020). *Comparison of water addition and early-harvest strategies to decrease alcohol concentration in Vitis vinifera cv. Shiraz wine: impact on wine phenolics, tannin composition and colour properties*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 26(2), 158–171.
- Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., & Dequin, S. (2014) *Reduction of Ethanol Yield and Improvement of Glycerol Formation by Adaptive Evolution of the Wine Yeast Saccharomyces cerevisiae under Hyperosmotic Conditions*. Applied and Environmental Microbiology, 80(8), 2623–2632.
- Torija, M. (2003) *Effects of fermentation temperature on the strain population of Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 80(1), 47–53.
- Torregrosa L, Bigard A, Doligez A, Lecourieux D, Rienth M, Luchaire N. (2017) *Developmental, molecular and genetic studies on grapevine response to temperature open breeding strategies for adaptation to warming*. OENO One 51:155–165

- Tristezza, M., di Feo, L., Tufariello, M., Grieco, F., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., Grieco, F. (2016). *Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine*. LWT - Food Science and Technology, 66, 406–412.
- Van Leeuwen C. (2010) *Terroir: the effect of the physical environment on vine growth, grape ripening and wine sensory attributes*. Managing Wine Quality:273–315.
- Van Leeuwen, C., Darriet, P. (2016) *The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality*. Journal of Wine Economics, Volume 11, Number 1, 2016, Pages 150–167.
- Van Leeuwen, C., Destrac-Irvine, A. (2017) *Modified grape composition under climate change conditions requires adaptations in the vineyard*. OENO One 51:147–154.
- Van Leeuwen, C., Destrac-Irvine, A., Dubernet, M., Duchêne, E., Gowdy, M., Marguerit, E., Pieri, P., Parker, A, Rességuier, L., Ollat, N. (2019) *An update on the impact of climate change in viticulture and potential adaptations*. Agronomy 9:514.
- Varela C., Dry P.R., Kutyna D.R., Francis I.L., Henschke P.A., Curtin C.D., and Chambers P.J. (2015) *Strategies for reducing alcohol concentration in wine*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 21: 670–679.
- Whiring, J., (2010) *Regulating winegrape sugar accumulation through leaf removal*. Grapegrower and Winemaker Issue 555, 18-20.
- Wilkinson, K., Jiranek, V. (2013). *Wine of reduced alcohol content: Consumer and society demand vs industry willingness and ability to deliver*. Conference: 1st International Symposium on alcohol level reduction in wine at Bordeaux, France.
- Zambonelli, C., Romano, P., Suzzi, G. (1989) *Micro-organisms of wine*. In Biotechnology Applications in Beverage Production ed. Cantarelli, C. & Lanzarini, G. pp.17-30.
- Zamora, F. (2016) *Dealcoholised wines and low-alcohol wines*. Wine safety, consumer preference and human health, 8: 163-182.
- Zoecklein, B.W. (2001). *Grape sampling and maturity evaluation for growers*. Vintner's Corner: 16, 1-6.
- Zufferey, V., Murisier, F., Vivin, P., Belcher, S., Lorenzini, F., Spring, J. Viret, O. (2012) *Carbohydrates reserves in grapevines (Vitis vinifera L. Chasselas): the influence of the leaf to fruit ratio*. Vitis 51. 103: 110.