

Impacto de levaduras autóctonas *no Saccharomyces* en la reducción de etanol y perfil químico del vino chileno Sauvignon blanc

Indigenous non-*Saccharomyces* yeasts in their impact on ethanol reduction and chemical profile of Chilean Sauvignon Blanc wine

Alejandra Urtubia^{1,*}, Wendy Franco^{2,3}, Consuelo Ceppi De Lecco⁴, Sergio Benavides⁵ y Angélica Durán¹

¹Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Técnica Federico Santa María, Ave. España 1680, Valparaíso 2390123, Chile

²Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos, Pontificia Universidad Católica de Chile, Ave. Vicuña Mackenna 4860, Santiago 7820244, Chile

³Departamento de Ciencias de la Salud, Carrera de Nutrición y Dietética, Pontificia Universidad Católica de Chile, Ave. Vicuña Mackenna 4860, Santiago 7820244, Chile

⁴Departamento de Fruticultura y Enología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Ave. Vicuña Mackenna 4860, Santiago 7820244, Chile; ceppidelecco@uc.cl

⁵Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad San Sebastián, Lientur 1439, Concepción, Chile

Resumen. El estudio de levaduras *No-Saccharomyces* (NSY) en fermentaciones enológicas permite explorar nuevas alternativas para la reducción de etanol en vinos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad fermentativa de dos levaduras autóctonas y poco exploradas del tipo NSY (NSYa, NSYb) en fermentaciones monocultivo y secuenciales (escala laboratorio y microvinificación) para producir vino Sauvignon Blanc chileno. Las fermentaciones se monitorearon mediante la determinación de etanol, glicerol, ácidos orgánicos y azúcares residuales. Los resultados indicaron que a escala de laboratorio tanto para las fermentaciones monocultivo y secuenciales fue posible reducir la concentración de etanol, a un 0,77% v/v (monocultivo) y 1,5% v/v (secuencial) para NSYa y 0,50% v/v (monocultivo) y 0,04% v/v (secuencial) para NSYb comparado con *S. cerevisiae* (12,87% v/v). Adicionalmente, mayores concentraciones de glicerol fueron obtenidas en fermentaciones monocultivo en comparación a las secuenciales (NSYa: 9,47 g/L y NSYb 10,97 g/L). A escala de microvinificación, las fermentaciones monocultivo y secuenciales con NSYb lograron reducir el contenido de etanol en 0,17% v/v y 0,54% v/v, respectivamente, comparado al control de *S. cerevisiae* (13,74% v/v). En el caso de NSYa, la reducción solo se observó en fermentaciones secuenciales con 0,62% v/v

Abstract. The study of non-*Saccharomyces* yeasts in wine fermentations allows the exploration of new alternatives for the reduction of ethanol in wines. The objective of this work was to evaluate the fermentation capacity of two indigenous and novel *non-Saccharomyces* yeasts (NSYa, NSYb) in monoculture and sequential fermentations (laboratory and microvinification scale) to produce Chilean Sauvignon Blanc wine. Fermentations were monitored by the determination of ethanol, glycerol, organic acids, and residual sugars. The results indicated that at the laboratory scale for both the monoculture and sequential fermentations it was possible to reduce the ethanol concentration on 0.77% v/v (monoculture) and 1.5% v/v (sequential) for NSYa and 0.50% v/v (monoculture) and 0.04% v/v (sequential) for NSYb compared to *S. cerevisiae* (12.87% v/v). Higher glycerol concentrations were produced in monoculture than sequential fermentations (NSYa: 9.47 g/L and NSYb 10.97 g/L). For microvinifications, the monoculture and sequential fermentations with NSYb managed to reduce ethanol content by 0.17% v/v and 0.54% v/v, respectively, over the *S. cerevisiae* control (13.74% v/v). In the case of NSYa, the reduction was only observed in sequential fermentations with 0.62% v/v.

1 Introducción

En la actualidad los consumidores buscan vinos de bajo graduaje alcohólico, bien estructurados y con perfiles sensoriales innovadores (Contreras et al.,

2015; Lemos Junior et al., 2019). Es por lo que, en los últimos años se ha incrementado el interés por centrarse en el proceso fermentativo evaluando el efecto de las condiciones ambientales y, de manera más desafiante; explorando la microbiología

* Corresponding author: alejandra.urtubia@usm.cl

fermentativa alcohólica (Balmaseda et al., 2021; Jolly et al., 2014; Rossouw & Bauer, 2016; Wei et al., 2019). Tradicionalmente, la levadura más utilizada para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica en la *S. cerevisiae*, debido a su alta capacidad fermentativa, el inicio temprano de la fermentación y su alta tolerancia al etanol (Kutyna et al., 2010). Además, el uso de *S. cerevisiae* como cultivo iniciador permite una predicción eficiente de las propiedades de fermentación, así como del perfil aromático final que se obtendrá (Shekhawat et al., 2017). No obstante, hoy en día se ha explorado el uso de levaduras del tipo *No-Saccharomyces* (NSY), cuya metabolómica, en muchos casos, puede desviar la fermentación alcohólica a otras rutas catabólicas, como la fermentación gliceropirúvica y la respiración celular, lo que permite lograr una reducción del contenido final de etanol (Englezos et al., 2018). Además, al cambiar su metabolismo a otras rutas, se obtienen metabolitos novedosos que otorgan diferentes atributos sensoriales al producto final, como glicerol, ácido acético y otros compuestos volátiles.

Diversos trabajos han indicado que diversas NSY han logrado resultados importantes en términos de reducción de alcohol y perfiles organolépticos novedosos, correspondientes a diferentes géneros como *Toruslaspora sp.*, *Pichia sp.*, *Metschnikowia sp.*, *Lachacea sp.*, entre otras (Aplin & Edwards, 2021; Balmaseda et al., 2021; Hong et al., 2021). Sin embargo, aún existen especies autóctonas que aún no han sido estudiadas ni menos caracterizadas en términos de fermentaciones alcohólicas. Nuestros estudios previos, han permitido aislar varios tipos de NSY obtenidas de diversas zonas geográficas de los valles centrales de Chile, por lo que es de sumo interés conocer y caracterizar el potencial fermentativo de dos nuevas levaduras NSYa y NSYb.

En la presente investigación se evaluó la capacidad fermentativa de NSYa y NSYb aisladas de viñedos de los valles centrales de Chile, mediante fermentaciones en laboratorio (monocultivo) y microvinificaciones (monocultivo y secuencial) sobre mosto Sauvignon Blanc.

2 Materiales y métodos

2.1 Levaduras

Las levaduras NSYa y NSYb, fueron obtenidas desde la colección de cultivos en el Laboratorio de Fermentación de Alimentos (Pontificia Universidad Católica de Chile/Universidad Técnica Federico Santa María). Estas levaduras fueron aisladas de uvas recolectadas de viñedos en la Región del Maule de Chile (35°260 S 71°400 W) e identificado a través de la secuenciación parcial del ADNr 26S.

Para los experimentos de laboratorio, los cultivos de levadura se mantuvieron en placas de agar, mientras que para la microvinificación las levaduras fueron liofilizadas para emular las condiciones en las

que la levadura es comúnmente utilizada en centros vitivinícolas.

2.2 Fermentaciones a escala de laboratorio

2.2.1 Mosto

Uvas Sauvignon Blanc cosechadas en el Valle de Casablanca, Región de Valparaíso, Chile (33° 190 S 71° 250 W), se utilizaron para la preparación del jugo de uva. Las uvas se limpiaron de restos vegetales y hojas, y se prensaron hasta la obtención del jugo, el que fue filtrado en gasa fina. El jugo filtrado obtenido fue caracterizado en término del contenido de azúcar inicial: obteniéndose una densidad de 1,088 g/mL; 22,8 Brix; 143 g/L de glucosa y 136 g/L de fructosa. El contenido de nitrógeno se ajustó a 250 mg/L de YAN con fosfato diamónico (DAP) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.). Adicionalmente, se agregaron 30 mg/L de metabisulfito de sodio para alcanzar 30 ppm de sulfitos libres, medidos por titulación de SO₂ (HI 84,500 Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, EE. UU.). El jugo de uva acondicionado se decantó en una nevera a 5°C durante 16 h.

2.2.2 Activación de cepas

Las colonias de NSYa y NSYb se incubaron en 40 mL de caldo SB (Biokar, Pantin, Francia) a 28°C durante 24 h. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con agua peptonada (1%). El sedimento se re-suspendió con el medio de glucosa/fructosa.

2.2.3 Fermentación de monocultivo

El jugo de uva acondicionado se porcionó en matraces Erlenmeyer doble boca de 500 ml provistos de airlocks. Cada matraz fue inoculado con las levaduras activas (Sección 2.2.2) asegurado una concentración final de 10⁶ UFC/mL. Como control se utilizó una levadura comercial *S. cerevisiae* (Actiflore) la cual fue activada e inoculada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la inoculación, los matraces se airearon durante 2 min y luego se colocaron en un agitador (Mod JSSI-100C, JS Research, Chungcheongnam, Korea) a 15°C y 200 rpm durante un máximo de 15 días.

2.2.4 Fermentación Secuencial

Para la fermentación secuencial, se siguió el mismo proceso descrito en la Sección 2.2.3 con la diferencia que cuando se consumió el 50% de los azúcares iniciales, se inoculó la levadura *S. cerevisiae* (Actiflore) para finalizar la fermentación.

2.3 Microvinificaciones

Para la ejecución de las microvinificaciones se adquirieron uvas Sauvignon Blanc de 2 regiones

geográficas de Chile: Valle de Casablanca, Región de Valparaíso (33°19' S 71°25' O) y Valle de Curicó, Región del Maule (35°26' S 71°40' O). Los racimos fueron sometidos a una evaluación sanitaria visual para descartar la presencia de *Botrytis sp.* Las uvas fueron seleccionadas y mantenidas en refrigeración (4 a 5°C) hasta el momento de la extracción del mosto.

Para la obtención del mosto, los racimos fueron lavados retirando los tallos y escobajos. Las uvas limpias fueron luego prensadas en frío, y el jugo obtenido fue sometido a sulfitado con metabisulfito de sodio (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, Estados Unidos de América), hasta alcanzar de 10 a 20 ppm de sulfito libre. A continuación, el jugo de uva se refrigeró (4-5°C) por aproximadamente 24 h, para la decantación de restos vegetales hasta obtener una turbidez de 120-150 NTU (Unidad Nefelométrica de Turbidez, Santiago, Chile). Se utilizaron tres unidades de fermentación para cada tratamiento, cada una con un volumen de 10 L. Los inóculos se prepararon mezclando 0,5 g de cada levadura liofilizada en 40 mL de jugo fresco de uva Sauvignon Blanc y se mantuvieron a 25°C durante 20 min. Las levaduras activas se inocularon en cada matraz hasta alcanzar una concentración de 10^6 células/mL. Cada levadura se evaluó por separado. Como control se utilizó una levadura comercial *S. cerevisiae* (Actiflore), la cual se activó e inoculó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La fermentación fue monitoreada hasta que el jugo de uva fermentado alcanzó una concentración de azúcar residual de ≤ 2 g/L con una densidad de aproximadamente 0,990 g/mL sin variación durante 48 h. Durante el seguimiento se evaluó la producción de etanol y glicerol, así como la concentración de ácidos orgánicos (málico y acético), glucosa y fructosa.

2.4 Seguimiento y Control de Fermentaciones

Tanto para las fermentaciones a escala de laboratorio (monocultivo y secuencial), así como las microvinificaciones, los procesos fermentativos fueron monitoreados efectuando un seguimiento de la biomasa celular, así como el consumo de azúcar y producción de etanol. Para el recuento celular, se utilizó un contador de células automatizado (Bio-Rad TC20™, Hercules, CA, EE. UU.). El etanol, glicerol y ácido láctico se determinaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Agilent Technologies, Infinity 1260, Waldbronn, Alemania), utilizando una columna de cromatografía Aminex HPX-87 de 300 × 7,8 mm (BIORAD, Hercules, CA, EE. UU.), operando con un detector DAD de longitud de onda de 210 nm. Las medidas se

tomaron con un tiempo de corrida de 30 min y un volumen de inyección de muestra de 20 µL; la fase móvil de H₂SO₄ con una concentración de 0,005 mMol y un flujo de 0,6 mL/min. La glucosa, fructosa, ácido málico y ácido acético se determinaron mediante kits enzimáticos (Megazyme, Wicklow, Irlanda). Los compuestos se identifican mediante una serie de reacciones enzimáticas, medidas por espectrofotometría a 340 nm y 0,1 ml de volumen de muestra.

2.5 Análisis estadístico

Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado. Los conjuntos de datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), y las diferencias de medias se determinaron con las diferencias de mínimos cuadrados (LSD). Se utilizó el software estadístico Statgraphics Centurion XIX versión: 15.2.05 (Madrid, España).

3 Resultados y Discusiones

Los resultados obtenidos de este trabajo permitieron evaluar el potencial de fermentación de la NSYa y NSYb. Al respecto, se establecieron los efectos sobre la fermentación a dos escalas diferentes (laboratorio, 500 mL; y microvinificación, 10 L) con dos tipos de sistemas de fermentación (monocultivo y secuencial).

3.1 Fermentaciones a Escala de Laboratorio

3.1.1 Fermentación de monocultivo

Con el fin de evaluar la capacidad de fermentación de las NSY se realizaron fermentaciones en monocultivo a nivel de laboratorio con uva Sauvignon Blanc del Valle de Casablanca, con un contenido de sólidos solubles de 22,8 °Brix. El proceso de fermentación del monocultivo se evaluó mediante el seguimiento de la densidad (Fig. 1), el crecimiento celular (Fig. 2) y la composición final al término de la fermentación alcohólica (Tablas 1 y 2).

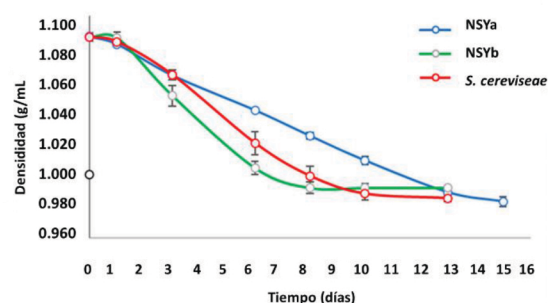


Figura 1. Evolución del consumo de sustrato a través de la medición de la densidad en fermentaciones en monocultivo (mosto Sauvignon Blanc).

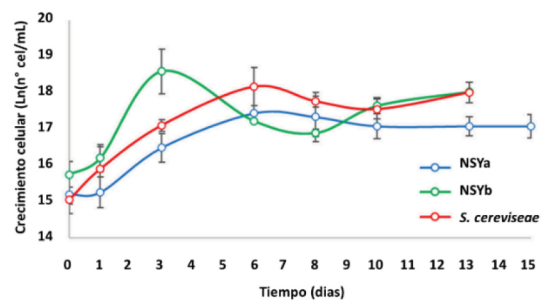


Figura 2. Evolución de la proliferación celular en fermentaciones en monocultivo (mosto Sauvignon Blanc).

Tabla 1. Fermentaciones en monocultivo de mosto Sauvignon Blanc (Valle de Casablanca, Chile).

NSY	Etanol (%v/v)	Azúcar residual (g/L)	Rendimiento (g etanol/g glucosa)	G/F	Días
NSYa	12,10±0,10 ^a	2,70±0,26 ^a	0,347	1,074	15
NSYb	12,37±0,06 ^b	2,17±0,84 ^a	0,354	1,070	10
<i>S. cerevisiae</i>	12,87±0,16 ^c	2,50±0,17 ^a	0,368	1,072	13

Los datos reportados corresponden a los promedios y desviaciones estándar. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas en la misma columna (p<0,05)

Tabla 2. Compuestos secundarios en fermentaciones en monocultivo de mosto Sauvignon Blanc (Valle de Casablanca, Chile).

NSY	g/L	
	Ácido acético	Glicerol
NSYa	0,15±0,15 ^a	9,47±1,17 ^a
NSYb	0,14±0,19 ^a	10,97±0,84 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	0,07±0,02 ^a	11,27±0,46 ^a

Los datos reportados corresponden a los promedios y desviaciones estándar. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas en la misma columna (p<0,05)

Como se preveía, la levadura *S. cerevisiae* (control) tuvo una alta capacidad de consumo de azúcar, lo que se correlacionó con la rápida caída de la densidad (Fig. 1). De manera similar, la NSYb fue tan eficaz en el consumo de azúcar como el control. Sin embargo, la muestra control terminó el proceso fermentativo en 10 días, mientras que la NSYb lo hizo en 13 días, alcanzando valores de densidad final en torno a 0,992 g/mL. Por su parte, la fermentación con NSYa tardó 15 días en finalizar la fermentación mostrando un ritmo constante, pero más lento en el consumo de azúcar (Fig. 1). Paralelamente, el crecimiento celular (Fig. 2) fue concordante con la caída de la densidad, aunque se mostró un tanto errático, particularmente con la concentración celular de la NSYb. Todas las levaduras mostraron una fase de latencia muy breve o inexistente, de hecho, el crecimiento exponencial comenzó entre el día cero (*S. cerevisiae*) y el día 1 (NSYa y NSYb). Sin embargo, la duración de la fase exponencial varió significativamente en algunos casos. En el control (*S. cerevisiae*), el crecimiento exponencial fue desde el día 0 hasta los 6 días aproximadamente, lo cual fue similar al caso de NSYa, cuya fase exponencial fue desde el día 1 hasta el 6. En el caso de la NSYb este período fue mucho más corto, durando solo desde el día 1 hasta el día 3 (Fig. 2). En cuanto a los productos y metabolitos generados y consumidos al final de las

fermentaciones, se muestran en las Tablas 1 y 2. En cuanto a la producción de etanol, hubo diferencias significativas dentro de los NSY estudiados, así como con el control (*S. cerevisiae*). La mayor producción de etanol se observó para el control, cuya concentración final fue de 12,87% v/v. Por otro lado, NSYb produjo 12,37% v/v y NSYa generó 12,10% v/v. Es decir, la diferencia en la producción de etanol en mosto Sauvignon Blanc (Valle de Casablanca) no mostró grandes diferencias (0,77 y 0,50% v/v menos de etanol que el control para NSYa y NSYb, respectivamente).

Estos resultados sugieren que el uso de las dos NSY son un iniciador adecuado para la elaboración de vinos con un contenido reducido de etanol, lo que también es consistente con varios estudios sobre el uso de NSY. Apline et al. (2019) obtuvieron una reducción de 0,8% v/v cuando se utilizó *C. californica* para fermentar jugo de uva. Del mismo modo, Contreras et al. (2015) reportaron reducción de etanol para varios NSY, siendo de particular interés *M. pulcherrima*, que redujo 0,9 y 1,6% v/v en jugos de uvas Chardonnay y Shiraz, respectivamente. De la misma manera, Hranilovic et al. (2020) reportaron una reducción de 1,6% v/v en Shiraz tanto en monocultivo como en fermentaciones secuenciales para varias cepas de *M. pulcherrima*.

La Tabla 2 muestra los resultados de los compuestos secundarios de la fermentación. La producción de ácido acético fue consistente con lo encontrado por García-Fraile et al. (2013). Ambas especies de NSY mostraron una producción de ácido acético similar (~0,15 g/L), sin embargo, fueron más altas que las obtenidas con *S. cerevisiae* (0,07 g/L).

El glicerol es otro metabolito interesante. El compuesto tiene la capacidad de aumentar tanto la densidad como la viscosidad del vino lo que ayuda a la percepción del “cuerpo” del vino además de aumentar la percepción dulce del mismo. En nuestra investigación no se encontraron diferencias significativas en la producción de glicerol entre el control (11,27 g/L) y NSYb (10,97 g/L) o NSYa (9,47 g/L).

3.1.2 Fermentación Secuencial

Se ha informado que las fermentaciones secuenciales (inoculación de NSY seguida de inoculación de *S. cerevisiae*) influyen positivamente en los atributos del vino. Por lo tanto, con el propósito de evaluar el efecto de las levaduras NSYa y NSYb y la levadura *S. cerevisiae*, es que se realizaron fermentaciones secuenciales a nivel de laboratorio en mosto Sauvignon Blanc del Valle de Casablanca (Valparaíso, Chile). La densidad inicial del jugo de uva fue de 1,090 g/mL (22,2 °Brix). La evaluación de la fermentación secuencial se evaluó mediante el control de la densidad (Fig. 3), el crecimiento celular (Fig. 4). Por otro lado, la composición final del mosto tras la fermentación se puede apreciar en las Tablas 3 y 4.

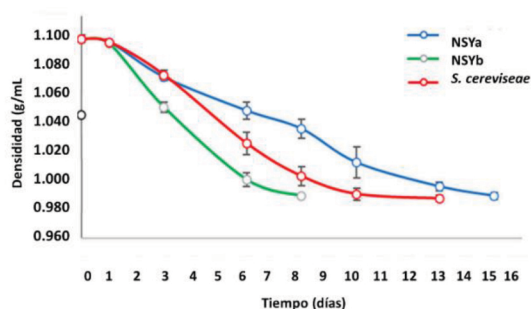


Figura 3. Evolución del consumo de sustrato a través de la medición de la densidad en fermentaciones secuenciales (mosto Sauvignon Blanc).

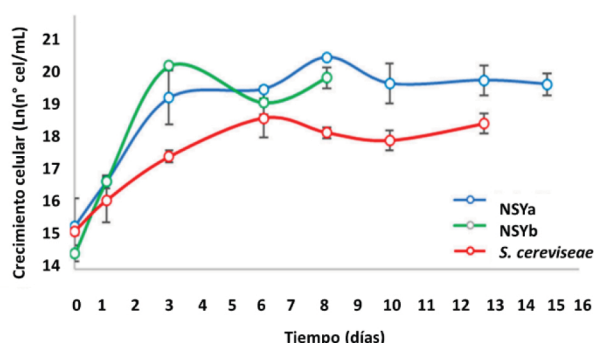


Figura 4. Evolución de la proliferación celular en fermentaciones secuenciales (mosto Sauvignon Blanc)

Tabla 3. Fermentaciones secuenciales mosto Sauvignon Blanc (Valle de Casablanca, Chile).

NSY	Etanol (%v/v)	Azúcar residual (g/L)	Rendimiento (g etanol/g glucosa)	G/F	Días
NSYa	11,37±1,46 ^a	2,03±0,25 ^a	0,368	1,072	15
NSYb	12,83±0,55 ^a	2,40±0,20 ^a	0,368	1,071	8
<i>S. cerevisiae</i>	12,87±0,12 ^a	2,25±0,17 ^a	0,358	1,072	13

Los datos reportados corresponden a los promedios y desviaciones estándar. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas en la misma columna ($p < 0,05$)

Tabla 4. Compuestos secundarios en fermentaciones secuenciales en mosto Sauvignon Blanc (Valle de Casablanca, Chile).

NSY	g/L	
	Ácido acético	Glicerol
NSYa	0,03±0,03 ^a	5,17±0,76 ^a
NSYb	NDL	6,77±0,45 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	0,07±0,02 ^a	11,27±0,46 ^b

Los datos reportados corresponden a los promedios y desviaciones estándar. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas en la misma columna ($p < 0,05$)

El proceso de fermentación más acelerado se observó para NSYb - *S. cerevisiae*. La inoculación de *S. cerevisiae* se produjo cuando se había consumido el 50% de los azúcares disponibles, correspondiente al día 3 de fermentación (Fig. 3), lo que generó un rápido consumo de azúcares restantes tras inocular *S. cerevisiae*. Esto condujo a un acortamiento significativo de la duración del proceso de fermentación, extendiéndose solo a 8 días, en comparación con la fermentación del monocultivo de NSYb, que duró 10 días. En el caso de la NSYa - *S. cerevisiae*, la inoculación con *S. cerevisiae* ocurrió el día 5. Este proceso fermentativo resultó ser más lento

que el control (*S. cerevisiae*) o que NSYb - *S. cerevisiae*, lo cual es consistente con el rendimiento en fermentaciones de monocultivo.

El crecimiento celular (Fig. 4) mostró fluctuaciones en la concentración celular, inherentes a estos procesos, donde también se observaron claramente fases exponenciales y estacionarias. Como era de esperar, en la fermentación con NSYa una vez inoculada la *S. cerevisiae* se observó un claro aumento de la concentración celular. Sin embargo, para NSYb se observó una caída en la concentración celular de Ln19 a Ln18 UFC/mL, luego de la inoculación con *S. cerevisiae*.

Las Tablas 3 y 4 muestran la producción de metabolitos en fermentaciones secuenciales a escala de laboratorio. El contenido de etanol mostró una reducción de 1,5% v/v para NSYa-*S. cerevisiae* (11,37%v/v) en comparación con las muestras de control (12,87% v/v). Este resultado fue consistente con un estudio previo, donde la producción de etanol para NSYa-*S. cerevisiae* (12,5% v/v) fue 1,0% v/v menos de etanol que el producido por *S. cerevisiae* (13,5% v/v) [9]. Por otro lado, se observó una caída de 0,73% v/v en el contenido de etanol en la NSYa-*S. cerevisiae* (11,37% v/v) en comparación con la fermentación en monocultivo con NSYa (12,10% v/v).

Para NSYb - *S. cerevisiae* (12,83% v/v), solo hubo una reducción de 0,04% v/v en contenido de etanol en comparación con la muestra de control. Resultados similares fueron reportados por Aplin et al. (2019) utilizando otras NSY seguido de una inoculación secuencial con *S. cerevisiae*. Los autores informaron una reducción de aproximadamente 0,09% v/v en el contenido de etanol [10]. Por otro lado, la NSYb-*S. cerevisiae* (12,83% v/v) produjo 0,5% v/v más de etanol que la fermentación del monocultivo con NSYb (12,37% v/v).

En cuanto al azúcar residual, todas las fermentaciones secuenciales terminaron con menos de 2,5 g/L, sin mostrar diferencias significativas entre las fermentaciones. Estos resultados indican un consumo efectivo de azúcar hacia el final de la fermentación, se debe a la alta tasa de consumo por parte de la levadura *S. cerevisiae*.

Respecto a metabolitos secundarios en fermentaciones secuenciales, estos se pueden observar en la Tabla 4. En términos de ácido acético, las fermentaciones NSYa-*S. cerevisiae* y NSYb-*S. cerevisiae* generaron concentraciones muy bajas (menos de 0,1 g/L). Por otro lado, las fermentaciones en monocultivo produjeron más ácido acético que las fermentaciones secuenciales, para la NSYa: 0,15 g/L (monocultivo) y 0,03 g/L (secuencial). Respecto a la NSYb la producción en monocultivo fue de 0,14 g/L (monocultivo), pero no detectable en fermentación secuencial. Se ha informado que algunas NSY, como *L. thermotolerans*, puede modular la acidez del vino, a través de una baja producción de ácido acético, pero un aumento en la producción de ácido láctico.

Finalmente, se observaron diferencias significativas en la producción de glicerol dentro de las fermentaciones secuenciales y el control (*S. cerevisiae*). La concentración de glicerol en la fermentación NSYa-*S. cerevisiae* (5,17 g/L) fue significativamente menor que el control (11,25 g/L). También se observaron diferencias en comparación con la fermentación NSYb-*S. cerevisiae* (6,77 g/L) y el control, aunque no mostró diferencias con NSYa-*S. cerevisiae*.

Rolle et al. (2018) y Englezos et al. (2018) indicaron que, en fermentaciones secuenciales, la producción de glicerol fue mayor que en las fermentaciones en monocultivo. Sin embargo, la producción de glicerol depende de varios factores relacionados tales como géneros y especies de levaduras, así como factores ambientales como temperatura, pH, o nutrientes. Además de lo anterior, algunas levaduras *Candida* como *C. famata* pueden producir exopolisacáridos a partir de la glucosa y/o fructosa del mosto. Estos exopolisacáridos tienen un efecto positivo sobre la sensación en boca y la astringencia. Este tipo de compuestos pueden competir con los efectos sensoriales del glicerol.

En términos generales, se pudo evidenciar las diferencias en la producción de compuestos entre fermentaciones en monocultivo y secuenciales. En lo referido a la producción de etanol las fermentaciones en monocultivo con NSYa (12,10% v/v) produjeron 0,73% v/v más etanol que en cultivos secuenciales NSYa-*S. cerevisiae* (11,37% v/v). Para el caso de monocultivos con NSYb (12,37% v/v), se produjo menos etanol que la fermentación secuencial NSYb-*S. cerevisiae* (12,85% v/v). En todos los casos, tanto en fermentaciones en monocultivo como secuenciales, la intervención de las NSY redujo la producción de etanol respecto al control entre un 0,02 a un 1,5% v/v. Esto sugiere que las fermentaciones secuenciales o en monocultivo son una alternativa factible para obtener un vino reducido en alcohol. No obstante, esto debe ser validado con mayores volúmenes de fermentación.

En cuanto a la producción de ácido acético, existen claras diferencias entre monocultivo y fermentaciones secuenciales. Mientras que en la fermentación del monocultivo la NSYa y NSYb produjeron concentración de ácido acético alrededor de 0.14-0.15 g/L, en cultivo secuencial se redujo a niveles de 0,03 g/L para NSYa e imperceptible para la NSYb, valores por debajo del obtenido en el control (0,07 g/L).

Resultados similares se encontraron en otros estudios donde la interacción entre NSY y *S. cerevisiae* produce menos ácido acético que en monocultivos con NSY. Matraxia et al. (2021) informaron que la interacción en co-cultivo entre *H. uvarum* y *S. cerevisiae* resultaron en menos ácido acético (0,03 g/L) que el monocultivo con *H. uvarum* (0,27 g/L). Por el contrario, Sadoudi et al. (2012)

reportaron 0.86 g/L de ácido acético en monocultivos con *C. zemplinina*, mientras que la misma levadura co-inoculada con *S. cerevisiae* resultó en 0,51 g/L. En el mismo estudio, el monocultivo de *T. delbrueckii* produjo 0,65 g/L de ácido acético, en contraste con la interacción de *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae* con solo 0,24 g/L de ácido acético. La presencia y concentración de ácido acético es relevante por su relación con la acidez volátil. Este parámetro puede verse afectado por la madurez (concentración de azúcar inicial) y también las interacciones NSY-*S. cerevisiae*, según lo informado por Dos Santos et al. (2003).

3.2 Microvinificaciones

Para reproducir un proceso de fermentación similar al que se lleva a cabo a nivel industrial, las fermentaciones con levaduras NSY se escalaron nivel de microvinificaciones (10 L) en mosto Sauvignon Blanc proveniente de dos lugares geográficos: Valle de Casablanca (Valparaíso, Chile), cosechado el 18 de abril de 2020, (23,4 °Brix, densidad 1,097 g/mL, pH 3,0, titulable acidez 8,64 g/L ácido tartárico), y el Valle de Curicó (Maule, Chile), cosechado en marzo 10/12/2020 (21,7 °Brix, densidad 1,087 g/mL, pH 3,19, acidez titulable 5,7 g/L ácido tartárico). Se realizaron tanto monocultivos como fermentaciones secuenciales.

3.2.1 Microvinificación con mosto Sauvignon Blanc del Valle de Casablanca

Los resultados de las microvinificaciones en mosto Sauvignon Blanc del Valle de Casablanca se pueden observar en la Tabla 5. En lo referido a la producción de etanol, se puede apreciar este varió entre 13,90% v/v para monocultivo con NSYa hasta 13,12% v/v para fermentación secuencial NSYa-*S. cerevisiae*. El control (*S. cerevisiae*) produjo una concentración intermedia de etanol (13,74% v/v). Todas las fermentaciones, tanto secuenciales como monocultivos resultaron ser menores que el control para la producción de etanol, excepto la fermentación en monocultivo de NSYa.

Las fermentaciones en monocultivo para NSYb fue 0,17% v/v menor que el control, y en el caso de NSYa 0,16% v/v superior al control (13,74% v/v). En el caso de las fermentaciones secuenciales el contenido de etanol varió entre 13,20% v/v (NSYb-*S. cerevisiae*) y 13,12% v/v (NSYa-*S. cerevisiae*), es decir, menos 0,54 y 0,72% v/v respectivamente que el contenido de etanol del control. Estos resultados fueron inesperados ya que, dadas las tendencias observadas en los anteriores experimentos, se esperaba una reducción significativa en la producción de etanol. Si bien no se observaron reducciones estadísticamente significativas, se evidenció una producción de etanol promedio más baja que el

control. En cuanto a los azúcares residuales, como era de esperarse, la glucosa se consumió casi en su totalidad, alcanzándose valores remanentes que oscilaron entre 0,2 y 0,4 g/L.

Por otro lado, el azúcar residual estuvo mayoritariamente constituido por fructosa, con niveles inferiores a 1,75 g/L. Este fenómeno es común en fermentaciones con *S. cerevisiae* pura, o en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae*. Por otra parte, se observó el carácter fructófilo de las

levaduras NSYa y NSYb, cuya participación en monocultivo y fermentaciones secuenciales resultó en azúcar residual significativamente menor que en el testigo.

Los resultados obtenidos indicarían que, tanto la complejidad del jugo de uva como, en mayor medida, la escala del proceso de fermentación junto con las prácticas de la bodega, tienen una influencia significativa en la concentración de compuestos metabólicos.

Tabla 5. Resultados microvinificaciones de mosto Sauvignon Blanc valle de Casablanca (Valparaíso, Chile).

NSY	fermentación	Etanol (%v/v)	g/L					
			Fructosa	Glucosa	Glicerol	Ácido acético	Ácido málico	Ácido láctico
<i>S. cerevisiae</i>	Control	13,74±0,18a	1,73±0,20a	0,39±0,11a	7,26±0,27a	0,29±0,12a	2,42±0,28a	0,09±0,03a
NSYa	Monocultivo	13,90±0,98a	1,07±0,26ab	0,21±0,06b	6,55±0,19b	0,29±0,06a	2,33±0,14ab	ND
	Secuencial	13,12±1,15a	0,60±0,15b	0,099±0,02b	6,71±0,16b	0,16±0,02b	2,37±0,15ab	0,17±0,01a
NSYb	Monocultivo	13,57±0,66a	0,82±0,00ab	0,23±0,04b	6,14±0,10c	0,23±0,03ab	2,22±0,03ab	ND
	Secuencial	13,20±0,84a	1,32±0,40ab	0,22±0,02c	6,74±0,11b	0,21±0,05ab	2,23±0,02ab	0,10±0,01a

Los datos reportados corresponden a los promedios y desviaciones estándar. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas en la misma columna (p<0,05).

Tabla 6. Microvinificaciones de mosto Sauvignon Blanc valle de Curicó (Maule, Chile).

NSY	fermentación	Etanol (%v/v)	g/L					
			Fructosa	Glucosa	Glicerol	Ácido acético	Ácido málico	Ácido láctico
<i>S. cerevisiae</i>	Control	11,95±0,14a	1,79±0,40a	0,06±0,03a	6,70±0,87a	NDL	2,00±0,22a	0,18±0,03ab
NSYa		11,41±0,55a	2,81±0,83a	0,11±0,02a	5,37±0,19b	0,11±0,01a	0,11±0,08c	0,21±0,14b
NSYb		11,51±0,84a	2,04±0,29a	0,08±0,02a	8,51±0,12c	0,46±0,29b	1,75±0,01b	0,05±0,02a

Los datos reportados corresponden a los promedios y desviaciones estándar. Promedios con letras diferentes indican diferencias estadísticas en la misma columna (p<0,05).

En un estudio realizado por Liccioli et al. (2011), se determinó que a volúmenes pequeños de fermentación (escala de laboratorio) existe una mayor tasa de volatilización del etanol. En cambio, a mayores volúmenes, como el de una microvinificación o a nivel de bodega, las tasas de volatilización son mucho menores. Esto podría explicar las concentraciones de etanol más reducidas en las fermentaciones a escala de laboratorio frente a las microvinificaciones en nuestro estudio.

3.2.2 Microvinificación en mosto Sauvignon Blanc del Valle de Curicó

La Tabla 6 resume los resultados observados para estas microvinificaciones. En cuanto a la producción de etanol, si bien no se observaron diferencias significativas, es interesante ver que todas las fermentaciones produjeron menos etanol. El control (*S. cerevisiae*) produjo 11,95% v/v de etanol, mientras que las microvinificaciones con NSYa generó 11,41% v/v, es decir, una diferencia de 0,54% v/v. En el caso de NSYb (11,51% v/v), la diferencia

fue menor alcanzando un valor de 0,44% v/v.

En cuanto al consumo de azúcares, los niveles de glucosa alcanzaron valores finales no significativamente diferentes, oscilando entre 0,06 y 0,11. Por otro lado, la fructosa restante fue significativamente mayor, en particular para la fermentación NSYa-*S. cerevisiae*, que finalizó con 2,81 g/L.

La producción de glicerol, en la fermentación secuencial con NSYb-*S. cerevisiae* fue significativamente superior al resto con 8,51 g/L, mientras que la fermentación secuencial con NSYa-*S. cerevisiae* generó 5,37 g/L. El control (*S. cerevisiae*) produjo una cantidad de glicerol de 6,7 g/L, significativamente mayor que NSYa, pero significativamente menor que NSYb. Las diferencias en las concentraciones de glicerol podrían atribuirse a diferencias en la activación de los mecanismos protectores de cada fermentación secuencial. El aumento en la producción de glicerol se debe comúnmente al hecho de que varios géneros de levadura lo utilizan como un metabolito protector en frente a concentraciones adversas de etanol.

En términos de producción de ácido acético, la menor producción se observó para NSYa-*S. cerevisiae* (0,11 g/L), mientras que la NSYb-*S. cerevisiae* dio como resultado 0,46 g/L. En todos los casos, el nivel de ácido acético fue inferior al umbral sensorial informado, que es aproximadamente 0,7 g/L.

Resumiendo, en promedio, la producción de etanol con las levaduras NSY estudiadas en microvinificaciones fue superior a la obtenida a escala de laboratorio, lo que indicaría que la escala del proceso de fermentación influye significativamente en el contenido de etanol de las fermentaciones. Mientras tanto, las fermentaciones secuenciales con cualquiera de las dos NSY resultaron en menos etanol que las fermentaciones de monocultivo; para NSYb 13,57% v/v (monocultivo) a 13,20% v/v (secuencial), es decir, una diferencia en el contenido de etanol de 0,37% v/v. En el caso de NSYa, del 13,90% v/v (monocultivo) al 13,12% v/v (secuencial), es decir, una diferencia en el contenido de etanol de 0,78% v/v.

Evidentemente, la concentración de azúcar (nivel de madurez de la uva) influye en las características finales del vino. La concentración inicial de azúcar entre los mostos de Casablanca y Curicó fue 23,4 y 21,7 °Brix, respectivamente. En términos de producción de etanol, la fermentación secuencial de Casablanca produjo concentraciones promedio de 13,82% v/v (*S. cerevisiae*: 13,74% v/v; NSYb: 13,20% v/v; C. NSYa 13,12% v/v). Por otro lado, las fermentaciones bajo las mismas condiciones el mosto del valle de Curicó produjo concentraciones promedio de 11,27% v/v (*S. cerevisiae*: 11,95% v/v; NSYb: 11,51% v/v; NSYa 11,41% v/v). Esto indicaría que, a mayor concentración de azúcar en los mostos, las levaduras estudiadas son más eficientes para reducir el etanol.

4 Conclusiones

En resumen, y comparando los diferentes medios, escalas y estrategias de fermentación, se puede concluir lo siguiente: (1) Las levaduras NSY estudiadas mostraron una menor producción de etanol, rendimiento medio G/F; (2) la gestión y el control de las condiciones de fermentación influye en las características finales del vino; (3) Las levaduras NSY a y b pueden producir vinos con menor contenido etanólico cuando se utilizan mostos con mayor concentración de azúcar y se sigue una fermentación secuencial; (4) los resultados de la microvinificación son más representativos de vinificación industrial.

Referencias

1. Zhang, B.; Tang, C.; Yang, D.; Liu, H.; Xue, J.; Duan, C.; Yan, G. Effects of three indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and their pairwise combinations in co-fermentation with

Saccharomyces cerevisiae on volatile compounds of Petit Manseng wines. *Food Chem.* **2022**, *368*, 130807 [CrossRef] [PubMed]

2. Chen, K.; Escott, C.; Loira, I.; del Fresno, J.M.; Morata, A.; Tesfaye, W.; Calderon, F.; Suárez-Lepe, J.A.; Han, S.; Benito, S. Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiol.* **2018**, *69*, 51–63 [CrossRef] [PubMed]
3. Van Wyk, N.; von Wallbrunn, C.; Swiegers, J.H.; Pretorius, I.S. *Biotechnology of Wine Yeasts*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020
4. Bokulich, N.A.; Thorngate, J.H.; Richardson, P.M.; Mills, D.A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 139–148 [CrossRef] [PubMed]
5. Gao, F.; Zeng, G.; Wang, B.; Xiao, J.; Zhang, L.; Cheng, W.; Wang, H.; Li, H.; Shi, X. Discrimination of the geographic origins and varieties of wine grapes using high-throughput sequencing assisted by a random forest model. *Lwt* **2021**, *145*, 111333 [CrossRef]
6. Contreras, A.; Hidalgo, C.; Schmidt, S.; Henschke, P.A.; Curtin, C.; Varela, C. The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *205*, 7–15 [CrossRef]
7. Han, X.; Qing, X.; Yang, S.; Li, R.; Zhan, J.; You, Y.; Huang, W. Study on the diversity of non-*Saccharomyces* yeasts in Chinese wine regions and their potential in improving wine aroma by β -glucosidase activity analyses. *Food Chem.* **2021**, *360*, 129886 [CrossRef]
8. Lappa, I.K.; Kachrimanidou, V.; Pateraki, C.; Koulougliotis, D.; Eriotou, E.; Kopsahelis, N. Indigenous yeasts: Emerging trends and challenges in winemaking. *Curr. Opin. Food Sci.* **2020**, *32*, 133–143 [CrossRef]
9. Franco, W.; Benavides, S.; Valencia, P.; Ramírez, C.; Urtubia, A. Native yeasts and lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of seven grape cultivars from the maule region (Chile). *Foods* **2021**, *10*, 1737 [CrossRef]
10. Aplin, J.J.; White, K.P.; Edwards, C.G. Growth and metabolism of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Washington state vineyards in media and high sugar grape musts. *Food Microbiol.* **2019**, *77*, 158–165 [CrossRef]
11. Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in

- controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 873–882 [CrossRef]
12. Whitener, M.E.B.; Stanstrup, J.; Carlin, S.; Divol, B.; Toit, M.D.; Vrhovsek, U. Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2017**, *23*, 179–192 [CrossRef]
13. Hong, M.; Li, J.; Chen, Y.; Qi, B.; Huang, Y.; Wu, J.; Yue, H.; Tong, Z.; Liu, Y.; Wang, F. Impact of mixed non-*Saccharomyces* yeast during fermentation on volatile aroma compounds of Vidal blanc icewine. *Lwt* **2021**, *145*, 111342 [CrossRef]
14. Mančić, S.; Danilović, B.; Malićanin, M.; Stojanović, S.S.; Nikolić, N.; Lazić, M.; Karabegović, I. Fermentative potential of native yeast *candida famata* for prokupac grape must fermentation. *Agriculture* **2021**, *11*, 358 [CrossRef]
15. Zhang, P.; Zhang, R.; Sirisena, S.; Gan, R.; Fang, Z. Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiol.* **2021**, *100*, 103859 [CrossRef]
16. Liu, D.; Legras, J.L.; Zhang, P.; Chen, D.; Howell, K. Diversity and dynamics of fungi during spontaneous fermentations and association with unique aroma profiles in wine. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *338*, 108983 [CrossRef]
17. Contreras, A.; Hidalgo, C.; Henschke, P.A.; Chambers, P.J.; Curtin, C.; Varela, C. Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 1670–1678 [CrossRef]
18. Berthels, N.J.; Otero, R.R.C.; Bauer, F.F.; Pretorius, I.S.; Thevelein, J.M. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *77*, 1083–1091 [CrossRef]
19. Fleet, G.H. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *86*, 11–22 [CrossRef]
20. Tronchoni, J.; Gamero, A.; Arroyo-López, F.N.; Barrio, E.; Querol, A. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *134*, 237–243 [CrossRef]
21. Azhar, S.H.M.; Abdulla, R.; Jambo, S.A.; Marbawi, H.; Gansau, J.A.; Faik, A.A.M.; Rodrigues, K.F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem. Biophys. Rep.* **2017**, *10*, 52–61 [CrossRef]
22. Fakhruddin, M.; Quayum, M.A.; Ahmed, M.M.; Choudhury, N. Analysis of key factors affecting ethanol production by *S. cerevisiae*. *Biotechnology* **2012**, *11*, 248–252 [CrossRef]
23. Hranilovic, A.; Gambetta, J.M.; Jeffery, D.W.; Grbin, P.R.; Jiranek, V. Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *329*, 108651 [CrossRef] [PubMed]
24. García-Fraile, P.; Silva, L.R.; Sánchez-Márquez, S.; Velázquez, E.; Rivas, R. Plums (*Prunus domestica* L.) are a good source of yeasts producing organic acids of industrial interest from glycerol. *Food Chem.* **2013**, *139*, 31–34 [CrossRef] [PubMed]
25. Junior, W.J.F.L.; Nadai, C.; Crepalde, L.T.; de Oliveira, V.; de Matos, A.D.; Giacomini, A.; Corich, V. Potential use of *Starmerella bacillaris* as fermentation starter for the production of low-alcohol beverages obtained from unripe grapes. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *303*, 1–8 [CrossRef]
26. Ciani, M.; Morales, P.; Comitini, F.; Tronchoni, J.; Canonico, L.; Curiel, J.A.; Oro, L.; Rodrigues, A.J.; Gonzalez, R. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 642 [CrossRef]
27. Del Fresno, J.M.; Morata, A.; Loira, I.; Bañuelos, M.A.; Escott, C.; Benito, S.; González Chamorro, C.; Suárez-Lepe, J.A. Use of non-*Saccharomyces* in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 2175–2185 [CrossRef]
28. Rolle, L.; Englezos, V.; Torchio, F.; Cravero, F.; Segade, S.R.; Rantsiou, K.; Giacosa, S.; Gambuti, A.; Gerbi, V.; Cocolin, L. Alcohol reduction in red wines by technological and microbiological approaches: A comparative study. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2018**, *24*, 62–74 [CrossRef]
29. Englezos, V.; Cravero, F.; Torchio, F.; Rantsiou, K.; Ortiz-Julien, A.; Lambri, M.; Gerbi, V.; Rolle, L.; Cocolin, L. Oxygen availability and strain combination modulate yeast growth dynamics in mixed culture fermentations of grape must with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **2018**, *69*, 179–188 [CrossRef]
30. Cioch-Skoneczny, M.; Satora, P.; Skoneczny, S.; Pater, A. Determination of the oenological properties of yeast strains isolated from spontaneously fermented grape musts obtained from cool climate grape varieties. *Eur. Food Res. Technol.* **2020**, *246*, 2299–2307 [CrossRef]
31. Matraxia, M.; Alfonzo, A.; Prestianni, R.;

- Francesca, N.; Gaglio, R.; Todaro, A.; Alfeo, V.; Perretti, G.; Columba, P.; Settanni, L.; et al. Non-conventional yeasts from fermented honey by-products: Focus on *Hanseniaspora uvarum* strains for craft beer production. *Food Microbiol.* **2021**, *99*, 103806 [CrossRef]
32. Santos, M.M.D.; Gombert, A.K.; Christensen, B.; Olsson, L.; Nielsen, J. Identification of in vivo enzyme activities in the cometabolism of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by using ¹³C-labeled substrates. *Eukaryot. Cell* **2003**, *2*, 599–608 [CrossRef] [PubMed]
33. Liccioli, T.; Tran, T.M.T.; Cozzolino, D.; Jiranek, V.; Chambers, P.J.; Schmidt, S.A. Microvinification—How small can we go? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1621–1628 [CrossRef] [PubMed]
34. Zoecklein, B.W.; Fugelsang, K.C.; Gump, B.H.; Nury, F.S. Volatile Acidity. *Wine Anal. Prod.* **1995**, *11*, 192–198 [CrossRef]