

# Adaptación y desarrollo del velo de flor en vinos “sobretablas” de la D.O. Jerez-Xèrés-Sherry fortificados con alcoholes no vínicos

Jesús Manuel Cantoral, Antonio Florido-Barba, María Fernanda Lopez-Molina y Gustavo Cordero-Bueso\*

Department of Biomedicine, Biotechnology and Public Health, University of Cádiz, Spain

**Abstract.** The EC 2019/187 shows the rules for the usage of ethyl alcohols to fortify wines. These must be obtained from products derived from agriculture and the use of alcohols of mineral or chemical origin is not authorized. The ethyl alcohols authorized for the fortification in the D.O. Sherry have wine origin. But, there are other alcohols that could be equally productive and at a lower economic cost, such as beet or sugar cane alcohol. The effect that different types of ethyl alcohols may have on the yeasts of flor remains unknown. Our goal was to analyze the effects of other alcohols (beet, sugar cane, etc.) on the development of the veil of flor. In this way, the yeasts that constitute the veil of flor of Fino wines were isolated and identified by microbiological techniques and characterized by molecular tools and by biochemical and microbiological tests such as cellular hydrophobicity, flocculation, acetic acid production, etc. Then, base wines were fortified with different distilled alcohols, such as malt brandy, tequila, among others. Biological aging under the veil of flor was monitored to later determine the volatile fractions. Alcohol from sugar cane could be a promising alternative to fortify Fino wines.

## 1 Introducción

El reglamento de la Unión Europea nº 479/2008 define los vinos de licor como aquellos que presentan un grado alcohólico entre 15% y 22% de alcohol por volumen. Este reglamento también establece que estos vinos se elaborarán a partir de fermentados, parcialmente fermentados y/o mosto de uva sin fermentar y enriquecido con aguardiente de vino. Comúnmente, los vinos de licor se conocen como vinos fortificados, de postre o generosos.

Históricamente los vinos fortificados son originarios de Europa, pero actualmente se producen en todo el mundo, concretamente en Australia, Estados Unidos, y Sudáfrica [1]. Europa permanece como el productor clave siendo los principales vinos fortificados los pertenecientes a la D.O. Jerez-Xèrés-Sherry (sur de España), los vinos de Oporto (Portugal peninsular), Madeira (isla portuguesa) y Marsala (isla italiana, Sicilia), pero también se conocen otros, en particular el Vermut (norte Italia), Moscatel de Setúbal (también de Portugal continental), Commandaria (Chipre) y Vins Doux Naturels (sur de Francia).

El proceso básico para la elaboración de vinos Fino bajo crianza biológica, en la D.O. Jerez-Xèrés-Sherry, consiste en dos etapas consecutivas. La primera siendo la fermentación del mosto de la uva que produce un vino joven con levaduras con alta capacidad fermentativas, y el tratamiento post-fermentativo llamado encabezado, donde se fortifica el vino con etanol vínico hasta los 15,5° (v/v). El velo de flor que se forma aísla y protege el vino de exceso de oxidación. Da origen a reacciones muy complejas por el metabolismo oxidativo de las levaduras del velo y el ambiente reductor del vino [2].

Morales y colaboradores [3] sugieren que uno de los cambios metabólicos más significativos ocurridos durante

la crianza biológica es la producción de acetaldehído, que se sintetiza a partir del etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa, puesto que aumenta el contenido de otros compuestos aromáticos, acetatos, ésteres etílicos, lactonas y terpenos, teniendo una gran contribución organoléptica además de reducir los contenidos de glicerol y ácido acético en el metabolismo del etanol.

Actualmente, la investigación de levaduras de velo de flor se encuentra centrada principalmente en identificar las características genéticas y su adaptación a las condiciones de la crianza, así como la caracterización proteómica [3]. Según Ruiz-Muñoz y colaboradores [4] existen diferentes estudios que han permitido dilucidar que las levaduras de velo de flor muestran alteraciones cromosómicas como aneuploidías como la polisomía cromosómica XIII con genes relacionados a la asimilación aeróbica de etanol, además de la delección de la región 5.8 S del espaciador interno de los transcritos de 24 pb como una característica casi invariable y distintiva de las levaduras de velo de flor de España. Autores como Moreno-García y colaboradores [5] igualmente, consideran que la formación del biofilm, se encuentra regulada por la expresión de genes como el FLO11 permitiendo una mayor hidrofobicidad de la superficie celular y la formación de agregados celulares.

En conjunto, la caracterización fisiológica y molecular ha demostrado que las levaduras de velo de flor difieren de las levaduras comunes de fermentación, pues poseen metabolismo y características genéticas distintas. Presentan un perfil heterogéneo que se encuentra caracterizado tanto por la variabilidad del contenido de ADN, mitocondrial y perfiles cromosómicos [2,6]. Aunque *Saccharomyces cerevisiae* es la especie más común, los análisis de fragmentos de polimorfismo de longitud (ITS) de 5.8 S han revelado la existencia de

\*Corresponding author: [gustavo.cordero@uca.es](mailto:gustavo.cordero@uca.es)

especies no-*Saccharomyces* [4]. Esteve-Zarzoso y colaboradores [7] señalan que, la principal diferencia entre estas levaduras, es la delección de un fragmento de 24 pb dentro de la región ITS1.

La Regulación de la Comisión Europea EU 2019/187 señala las normas para el uso de los alcoholes para fortificar los vinos generosos. Éstos, deben ser obtenidos de productos de origen agrícola y no está autorizado el uso de alcoholes de origen mineral o químico. Los alcoholes vínicos son los autorizados para el encabezado en el marco de Jerez, sin embargo, existen otros alcoholes de origen agrícola que podrían ser igualmente eficaces, sostenibles y a un menor coste, como es el caso del alcohol de malta o caña de azúcar. Sin embargo, no se conoce el impacto sobre el velo de flor. Por ello, se propone analizar la influencia de otros alcoholes agrícolas distintos del alcohol vínico en la técnica de fortificación de vinos base sobre la adaptación y el desarrollo del velo de flor por parte de las levaduras implicadas.

## 2 Material y métodos

Las muestras se tomaron de diversas botas de una bodega ubicada en Jerez de la Frontera, con crianza biológica en un sistema de criaderas y soleras. Se obtuvieron de tres tipos de vino Fino nombrados: “vino Fino tipo A, vino Fino viejo tipo E y vino Fino tipo C”. El aislamiento se realizó siguiendo protocolos de microbiología clásica. Los medios de cultivo utilizados fueron: medio YPD (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% agar) y medio WL-agar (Oxoid). Para su conservación y posteriores estudios de identificación y caracterización se utilizaron los siguientes métodos de conservación: a) en placas Petri, conservándose a 4°C y b) en glicerizados (glicerol 80 %), conservadas a -80°C [8].

La identificación de los aislados se hizo mediante la obtención de los diferentes perfiles moleculares del ADN total y mitocondrial previamente extraído mediante protocolos estándares. Las cepas aisladas se identificaron por las técnicas de biología molecular PCR de la región ITS del ADN ribosómico [9] y RFLP utilizando las endonucleasas de restricción *HaeIII*, *HinfI* y *CfoI* [10]. En el caso de las levaduras identificadas como *S. cerevisiae*, se aplicó la técnica del análisis de los microsatélites multiplex o SSR con el objetivo de encontrar distintos perfiles a nivel de cepa [11,12]. Los amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa o en secuenciador automático. Y el análisis de las imagenés en una cámara equipada con un transiluminador UV (BioRad). Se seleccionaron aquéllas que presentaron un perfil distinto y se tomaron al menos dos representantes de la misma especie para ser secuenciadas.

La secuenciación se llevó a cabo a través de los servicios de secuenciación MACROGEN Inc. Korea (<http://www.macrogen.com>). La alineación de secuencias se realizó con programas de bioinformática online (CLUSTAL W, In-silico, etc). Las secuencias fueron comprobadas y depositadas en bases de datos electrónicas de colecciones de microorganismos (CECT, GenBank, NCBI, etc.).

Una vez bien identificados mediante las técnicas señaladas anteriormente, los microorganismos con diferentes perfiles moleculares fueron sometidos a caracterización mediante pruebas bioquímicas y físico-químicas para conocer su capacidad de asimilación y fermentación de azúcares, hidrofobicidad celular, floculación, resistencia al etanol y al anhídrido sulfuroso, stress osmótico (curvas de crecimiento en lector de microplacas), producción de ácido acético, producción de ácido sulfhídrico, capacidad de esporulación y capacidad enzimática, se atendió especialmente a las actividades glucosidasa, esterasa, proteasa y pectinasa (uso de kits enzimáticos y medios de cultivos específicos), ya que son de interés en la enología por aportar complejidad a los vinos. Se siguieron protocolos similares a los descritos en Ruiz-Muñoz et al. [4].

Posterior a la evaluación bioquímica y molecular de las levaduras, se llevó a cabo el encabezamiento o fortificación de 20 mL de vino base con 12,38° v/v a 15,5° v/v con distintos alcoholes de origen agrícola; orujo de uva (83° v/v), aguardiente de columna (77° v/v), tequila (55° v/v), aguardiente de malta (68° v/v), alcohol neutro de grano (96,3° v/v), aguardiente de caña (68° v/v), Holanda alquitara (65° v/v) y alcohol rectificado de vino (95,9° v/v). Éste último fue utilizado como control, ya que es el autorizado en la D.O. Jerez-Xérès-Sherry.

Una vez fortificado el vino base, se añadió a frascos de cultivo celular con cuello inclinado de 25 cm<sup>2</sup> (Sigma Aldrich, Luisiana, Suiza). Se formaron tres grupos para la experimentación bajo crianza biológica. Así, de los 8 vinos fortificados, en total 9 frascos para cada uno, de los cuales 3 se inocularon sólo con levaduras identificadas como *S. cerevisiae*, otros 3 con un monocultivo de levaduras identificadas como no-*Saccharomyces* y los restantes con una mezcla 1:1 de cada tipo de levadura.

Previo a la inoculación de cada uno de los frascos, se llevó a cabo un conteo de los microorganismos crecidos en YPD líquido a 48 horas posterior a su centrifugación y descarte del sobrenadante añadiendo 20 ml de agua estéril por medio de la cámara de *Neubauer*. Éstas se incubaron a 22,5°C. La formación del biofilm se observó visualmente diariamente hasta que cubrió la superficie del vino (30 días como máximo), de manera que se pudieran obtener datos como el tiempo de su aparición y su consistencia, así como la morfología en los distintos vinos bases fortificados con los diferentes alcoholes.

Una vez finalizados los ensayos de crianza biológica de velo de flor a escala de laboratorio, se evaluó la microbiota del velo de flor de cada uno de los vinos de la mezcla 1:1 para conocer la constitución y proporción microbiana del biofilm y así, comparar la supervivencia de ambas levaduras inoculadas y su papel conjunto en la composición volátil del vino. Esto se llevó a cabo utilizando las técnicas de biología molecular mencionadas anteriormente. Finalmente, se unió y homogenizó el volumen del triplicado de cada vino fortificado y posterior a esto, se centrifugaron los volúmenes finales a 12000 rpm por 10 minutos para eliminar la biomasa de levaduras y así, llevar a cabo el análisis de la composición volátil de todos los vinos.

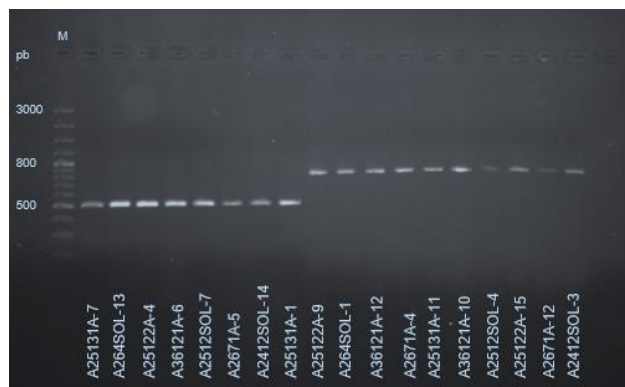
Los principales volátiles (acetaldehído, acetoina, lactato de etilo, succinato de etilo, 2-feniletanol) y los principales alcoholes superiores, metanol, 1-propanol, isobutanol, y los alcoholes isoamílicos (2-Pentanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol) se determinaron después de la destilación al vapor utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Serie II (Palo Alto, CA, EUA) con detector de ionización de llama.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software MiniTab17 (Pensilvania, EUA) y GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, EUA). Se llevó a cabo un análisis estadístico aplicando un análisis de varianza (ANOVA) con el test de Tukey con significancia  $\alpha=0,05$  para determinar las posibles diferencias significativas y a su vez, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) para hacer un cotejo de los valores de los compuestos volátiles más importantes en cada una de las muestras.

### 3 Resultados

Se aisló un total de 133 colonias de las diferentes botas de vino fino muestreadas. De los aislados 58 pertenecieron al vino Fino tipo A, 28 al Fino viejo tipo E y 37 al vino Fino tipo C. La morfología de las levaduras en los medios de cultivo sólidos (WL y YPD) fue esférica, definida y de un color crema. Al ser inoculadas en medio YPD líquido mostraban formación de biofilm en la superficie.

Tras el análisis de los ITS por PCR, se obtuvieron dos perfiles visiblemente diferentes entre las colonias con su región ITS amplificada (Fig. 1), un 60% de ellas presentó una amplificación alrededor de 500 pb mientras que un 40% presentó un tamaño de 850-865 pb.



**Figura 1.** Ejemplo de electroforesis de algunas de las colonias aisladas. Las primeras ocho presentan un tamaño de 501 pb mientras que las siguientes diez, tienen un tamaño de 855 pb.

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de los fragmentos amplificados por ITS con digestión de las enzimas de restricción *Hae*III, *Cfo*I y *Hinf*I. Para las levaduras que en la PCR ITS sin digestión por endonucleasas se obtuvieron tamaños de 850-865 pb amplificados, al obtener sus patrones de restricción con las enzimas, con *Hae*III se obtuvieron 4 de 125 + 170 + 230 +

325 pb, con *Cfo*I 150 + 325 + 375 pb y con *Hinf*I 110 + 365 + 375 pb. Se determinó que se trataba de levaduras *S. cerevisiae*. En el caso de las levaduras que presentaron amplificaciones de alrededor de 500 pb en la PCR ITS, se determinó tras la secuenciación que pertenecía a la especie *Pichia kudriavzevii* con una similitud del 99.76% de acuerdo a las bases de datos. Posteriormente, para las levaduras identificadas como *S. cerevisiae* se amplificaron los loci de polimorfismos de microsatélites y se obtuvo sólo un patrón indicando que sólo existía una cepa entre las muestras de levadura aisladas.

Respecto a las diferentes pruebas bioquímicas y enzimáticas se determinó que ambas especies de levaduras identificadas, tanto *S. cerevisiae*, como *P. kudriavzevii* presentaban una alta hidrofobicidad (> 99%), una floculación baja, ambas especies presentaron alta producción de ácido sulfhídrico, sin embargo, no aumentan la acidez volátil. Además, ambas especies mostraron capacidad de esporulación en el medio de cultivo utilizado con acetato de potasio.

Respecto a la fermentación y asimilación de las diferentes especies encontradas en las botas de vino fino, sorprendentemente *P. kudriavzevii* fermentó todos los azúcares excepto la rafinosa, y asimiló todos, en comparación con *S. cerevisiae* que sólo fermentó tres de los seis azúcares y asimiló cinco (Tabla 1).

**Tabla 1.** Asimilación y fermentación de azúcares por las levaduras donde + indica capacidad de asimilación/fermentación y – indica que no asimilaron/fermentaron.

		<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. kudriavzevii</i>
<b>Fermentación</b>	Glucosa	+	+
	Sacarosa	+	+
	Maltosa	+	+
	Galactosa	-	+
	Lactosa	-	+
	Rafinosa	-	-
<b>Asimilación</b>	Glucosa	+	+
	Sacarosa	+	+
	Maltosa	+	+
	Galactosa	+	+
	Lactosa	-	+
	Rafinosa	+	+

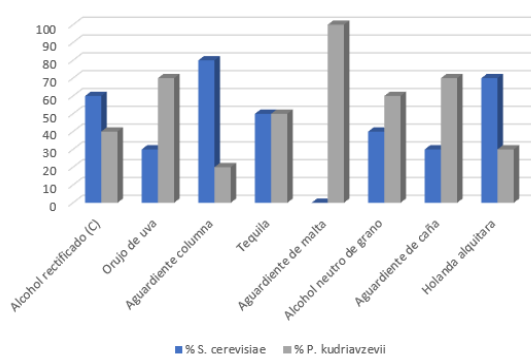
La resistencia al etanol fue analizada sometiendo a las levaduras ante diferentes concentraciones de etanol, las cuales no inhibieron el crecimiento de las levaduras, *S. cerevisiae* tuvo ligeramente mejor resistencia que la no-*Sacharomyces*.

Los triplicados de los vinos fortificados e inoculados (Fig. 2) permitieron la observación visual del velo de flor en cada una de las levaduras y en la mezcla de ellas, consultando diariamente la formación del velo de flor y posibilitando la comparación entre levaduras. En los triplicados de monocultivo de *S. cerevisiae* se pudo observar que hubo menor biomasa que en los de monocultivo de *P. kudriavzevii*, que además tuvieron una formación del velo más lenta.



**Figura 2.** Velo de flor formado por el consorcio de *S. cerevisiae* + *P. kudriavzevii*.

Al finalizar la crianza biológica en condiciones de laboratorio, se evaluó si la proporción 1:1 inoculada al inicio se mantenía o si había variado a lo largo de los días de formación del velo, evaluando la competencia de las levaduras mediante PCR ITS. En cada uno de los vinos encabezados con los diferentes alcoholes, se observó que la proporción de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* variaba en cada uno de los casos (Fig. 3). Con la información encontrada en la formación de velo de flor, se pudo observar que para algunas levaduras fue más sencillo proliferar y formar el biofilm en ciertos vinos fortificados. Se dilucidó que en los casos en los que la formación del velo era mejor con un tipo de levadura, esta levadura se encontraba en mayor proporción en la mezcla. Tal es el caso del aguardiente de malta, donde todas las levaduras caracterizadas fueron *P. kudriavzevii* que, aunque se inició de manera lenta la formación, logró formar un velo consistente antes que *S. cerevisiae*. En la Figura 3, se observa que, en cuanto a proporción de levaduras en cada bebida fortificada, *S. cerevisiae* fue la más prevaleciente en las bebidas fortificadas con aguardiente de columna, alcohol rectificado y con Holanda alquitara, mientras que *P. kudriavzevii* lo fue en las bebidas fortificadas con aguardiente de malta en su totalidad, orujo de uva y aguardiente de caña. Se observó que la bebida fortificada con tequila fue la única que permitió que ambas levaduras se encontraran en la misma proporción.



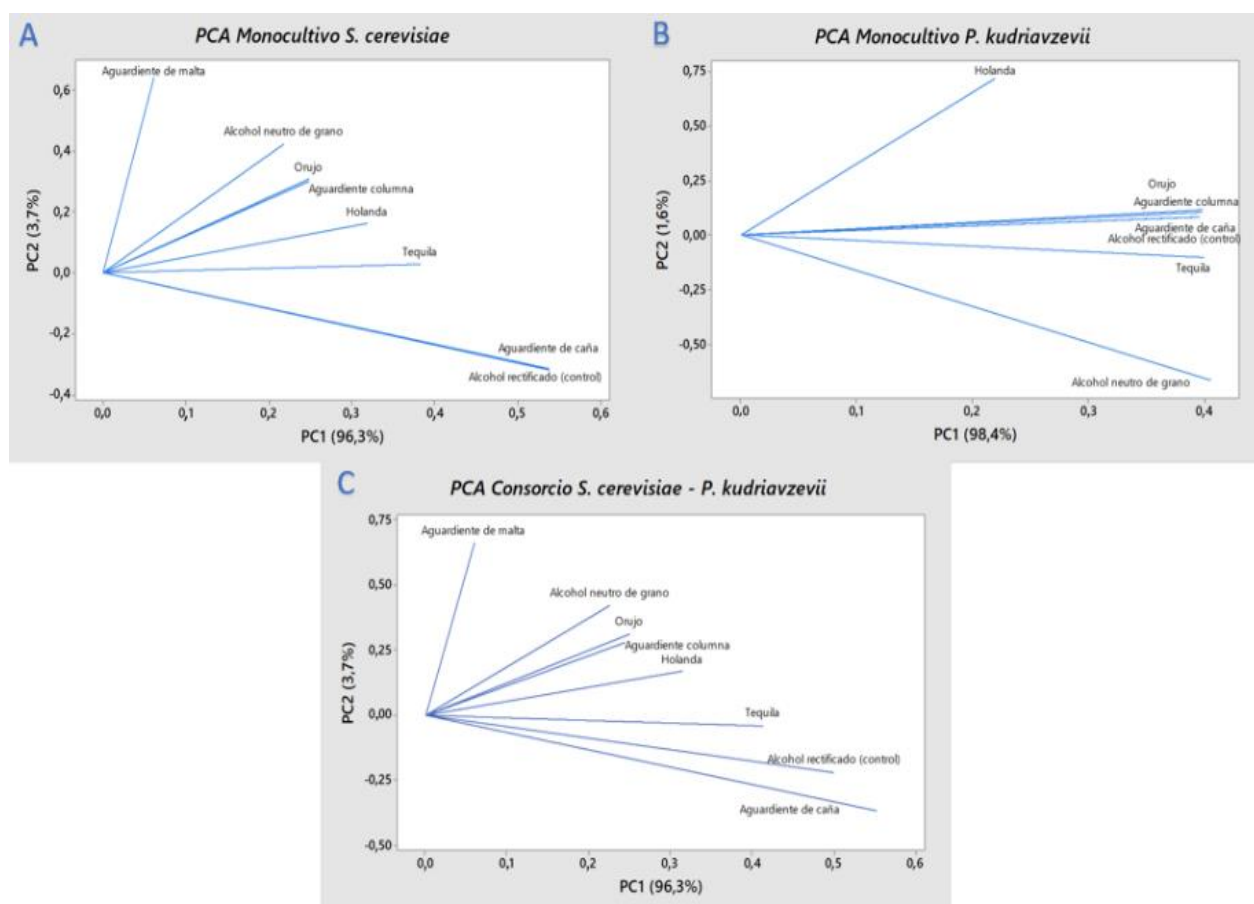
**Figura 3.** Proporción de levaduras en cada uno de los vinos fortificados con los diferentes alcoholes respecto al control (C).

Mediante el análisis de los compuestos volátiles más representativos de los vinos Fino, fue posible observar que cada triplicado experimental de levaduras modificó el perfil aromático de cada vino fortificado con diferentes alcoholes de origen agrícola. Con los valores obtenidos al calcular el valor de actividad práctico (OAV) comparados con los valores del umbral de olores teóricos (OTH) se halló que el compuesto con mayor producción por *S. cerevisiae* fue el acetaldehído excepto en el aguardiente de malta, que fue en el 3-metil-1-butanol, compuesto que a su vez fue formado mayoritariamente por *P. kudriavzevii* en todas las bebidas fortificadas inoculadas con su monocultivo, destacar además que en los monocultivos de no-*Saccharomyces* los niveles de lactato de etilo aumentan como consecuencia del metabolismo de estas levaduras. En el caso de la mezcla 1:1 de las levaduras se observó que el acetaldehído fue el compuesto con más producción excepto en una bebida, el de aguardiente de malta, en el cual se vio el 3-metil-1-butanol más elevado. En los tres tipos de tratamientos con levaduras, el compuesto con menor producción fue el 2-pentanol. Se pudo observar que el alcohol de caña fue el que presentó un perfil cromatográfico similar al encabezado con alcohol vínico rectificado, y que los de aguardiente de malta y de grano fueron los más diferentes con respecto al control (Fig. 4).

Se considera que hay aporte significativo de los compuestos al ser iguales o mayores a los teóricos (datos no mostrados). En la experimentación se consiguió que el acetaldehído tuviera aporte aromático mayor al teórico, como se mencionó anteriormente con *S. cerevisiae*, algo que no se logró con *P. kudriavzevii*; sin embargo, se examinó, que los resultados obtenidos se potenciaron a tal punto de igualarlos en algunas bebidas, en la mezcla con *S. cerevisiae*. Algunas trazas de alcoholes fueron detectadas entre los compuestos volátiles, con poca diferencia entre las del control. En cuanto a los esteres, en el tratamiento con *S. cerevisiae* las concentraciones usuales teóricas, específicamente en el acetato de etilo, se vieron aumentadas, algo habitualmente beneficioso puesto que la presencia de éste tiene gran impacto en el resultado final del aroma global del vino, junto con los alcoholes.

## 4 Discusión y Conclusiones

Hasta ahora, los procesos se han basado principalmente en cepas de levadura llamadas “convencionales” como *S. cerevisiae*. Las especies de levaduras “no convencionales” están ganando progresivamente más atención como nuevas herramientas potenciales para aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, pocas de estas especies se han caracterizado con detalle, por lo que se cree que la mayoría de éstas aún no han sido aisladas e identificadas, y pueden considerarse como un recurso que no ha podido ser del todo explotado para aplicaciones biotecnológicas, especialmente para las áreas agroalimentarias y de manera más específica para la crianza biológica. Para el uso de nuevas cepas y especies en procesos de producción, se necesita una caracterización y pruebas exhaustivas de los microorganismos de interés, así como de una comprensión detallada del sustrato y su interacción con el microorganismo [13].



**Figura 4.** Análisis de componentes principales entre las bebidas fortificadas donde A) es el de *S. cerevisiae*, B) el de *P. kudriavzevii* y C) el del consorcio.

La presencia de levaduras *no Saccharomyces*, se ha observado anteriormente en otros estudios, sin embargo, la presencia de una levadura como *P. kudriavzevii*, aislada en estos experimentos, no se había detectado hasta que Ruiz-Muñoz y colaboradores [4] la caracterizaron en el velo de flor de vinos Finos del Marco de Jerez. Mencionan que, el origen de estas levaduras es poco preciso, pues pueden provenir de las sobretablas, el vino joven utilizado para volver a llenar las criaderas, adaptándose a estos entornos cambiantes que pueden estresar a las levaduras. Además, se ve favorecido su crecimiento al alimentarse de las proteínas extracelulares y otros nutrientes de levaduras que perecieron [14]. En un estudio más reciente llevado a cabo por Ruiz-Muñoz y colaboradores [15], se ha demostrado que las levaduras *no-Saccharomyces* no actúan como contaminantes ocasionales de vinos Finos, sino que también forman parte del velo de flor.

Es de importancia mencionar que los indicadores tanto moleculares, como microbiológicos y bioquímicos son elementales para poder saber si las levaduras son aptas para su uso en la producción vinica [16]. Por lo que, al llevar a cabo las pruebas de caracterización de las levaduras, se pudo enfrentar a éstas a diferentes condiciones de estrés para analizar sus respuestas y ver si eran prometedoras para su uso en la experimentación de la crianza biológica. Entre éstas, la de resistencia al etanol es de las más necesarias para saber si las levaduras con las que se está trabajando están adaptadas para sobrevivir en

altas concentraciones alcohólica, en este caso, pues serían inoculadas a un vino fortificado al 15,5% (v/v). Este parámetro es fundamental pues Carrasco y colaboradores [17] mencionan que, con la fermentación, las membranas de algunas levaduras se destruyen, mientras que algunas otras al ser sometidas al proceso aumentan la producción de acetaldehído, disminuyendo los azúcares y nitrógeno, pero aumentando los niveles de oxígeno [18].

Los resultados obtenidos mediante la identificación de las levaduras que sobrevivieron en los triplicados de las mezclas inoculadas en las bebidas fortificadas sugieren la capacidad de adaptación de las levaduras del velo de flor, que entre especies pueden estar mejor adaptadas y desplazarse unas a otras. Al contemplar la biomasa y la formación lenta del velo de flor de *P. kudriavzevii* y hacer la comparación entre los triplicados de cada monocultivo, se considera que la levadura *no Saccharomyces* consume los nutrientes de manera más lenta, sin embargo, al observar la biomasa se puede considerar que los consumen completamente [19], distinto a lo observado en los triplicados de *S. cerevisiae*. Sin embargo, se obtuvieron resultados variados respecto a las bebidas fortificadas con la mezcla de ambas levaduras. Por un lado, en el control, se determinó que se encontraban las levaduras *S. cerevisiae* en mayor proporción, como fueron identificadas desde el muestreo y como suelen encontrarse en la producción enológica. Sin embargo, en casos como las bebidas fortificadas con orujo, aguardiente de malta, alcohol neutro de grano y aguardiente de caña, se vieron

más beneficiadas las levaduras *P. kudriavzevii*. Es decir, de los ocho casos de fortificación, en cuatro casos incluidos el control, se detectó en mayor cuantía las *S. cerevisiae* y en los otros cuatro las *no-Saccharomyces*. Según [20] hay evidencia reciente que sugiere que un esquema de inoculación combinado puede aumentar la aptitud de *S. kudriavzevii* en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae*.

Como es bien sabido, cada vino presenta ciertas características sensoriales. Las levaduras del velo de flor, le confieren las propiedades organolépticas como el olor, el gusto y el color tan apreciadas en la crianza biológica en forma de compuestos volátiles. Se cree que la biosíntesis de estos compuestos depende de especies y cepas [21] algo observado evidentemente entre los perfiles de ambas levaduras, donde *S. cerevisiae* tenía más producción de estos, mientras que *P. kudriavzevii* tenía una menor cantidad, pero en la mezcla de ambos se veían favorecidos y promovidos estos compuestos, específicamente en el vino base fortificado con aguardiente de caña, con un perfil volátil similar al obtenido del vino fortificado con alcohol rectificado que actuaba como el control.

Entre los compuestos volátiles más importantes se encuentran carbonilos, ácidos orgánicos, alcoholes, ésteres, terpenos, entre otros [22]. El etanol es uno de los más importantes, éste es consumido por las levaduras como fuente de carbono y energía y se obtiene del acetaldehído con NADH con la enzima alcohol deshidrogenasa del azúcar del mosto de la uva, puede variar su concentración según la superficie del velo y el volumen de vino [23]. Otro compuesto destacable es el acetaldehído, que es precursor de varios compuestos que les brindan aroma a los vinos, se forma al oxidarse el etanol con la enzima alcohol deshidrogenasa II, es el que le da el aroma más pungente al vino Fino, además de ser precursor de acetales que dan origen a la acetoína y al 2,3-butanodiol [2].

Una razón por la cual no se esperaba obtener perfiles de aromas volátiles similares a los de un producto final de vino Fino, es pues las condiciones experimentales fueron distintas a las de las barricas y el tiempo de crianza fue mucho menor. De acuerdo con Avdanina y Zghun [16] la crianza del Sherry en barricas de madera es un paso importante en la elaboración de vinos en general, ya que este proceso confiere al producto final características organolépticas esperadas.

Los vinos del Marco de Jerez son distintivos por su método de criaderas-solera que implica un proceso de crianza biológica que es llevado a cabo por levaduras de velo de flor. Se dilucidó que el velo está constituido por levaduras *S. cerevisiae* y *no-Saccharomyces*; y que ambas están adaptadas a los ambientes hostiles de los vinos generosos puesto que es deficiente tanto en azúcares como en nitrógeno y por lo que pueden asimilar diferentes fuentes de carbono. Según lo anteriormente expuesto se puede concluir que durante la etapa de crianza biológica de los vinos Finos las levaduras que forman el velo de flor están sujetas a los factores ambientales y la situación del sustrato (vino) como los azúcares, el grado alcohólico, entre otros. Las levaduras son las responsables de las propiedades organolépticas del vino, depende de las especies y las cepas. En el velo de flor o en el caso de la

experimentación, los compuestos buscados en la producción se ven favorecidos por el sinergismo de levaduras tanto *Saccharomyces* como *no-Saccharomyces*. El aguardiente de caña como alcohol fortificante de los vinos base es una alternativa sostenible y asequible para las bodegas que con un velo de flor adecuado puede lograr perfiles de compuestos volátiles promisorios, especialmente del más importante, el acetaldehído.

## References

1. G. J. Tredoux y A. C. S. Ferreira, «7 - Fortified wines: styles, production and flavour chemistry», en *Alcoholic Beverages*, J. Piggott, Ed. Woodhead Publishing, 2012, pp. 159-179. doi: <https://doi.org/10.1533/9780857095176.2.159>
2. M. Ángeles Pozo-Bayón y M. Victoria Moreno-Arribas, «Sherry wines», *Advances in Food and Nutrition Research* **63**, pp. 17-40, 2011, doi: [10.1016/B978-0-12-384927-4.00002-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384927-4.00002-6)
3. M. L. Morales *et al.*, «Volatile metabolites produced by different flor yeast strains during wine biological ageing», *Food Research International*, vol. 128, n. November 2019, p. 108771, 2020, doi: [10.1016/j.foodres.2019.108771](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108771)
4. M. Ruiz-Muñoz, G. Cordero-Bueso, F. Benítez-Trujillo, S. Martínez, F. Pérez, y J. M. Cantoral, «Rethinking about flor yeast diversity and its dynamic in the “criaderas and soleras” biological aging system», *Food Microbiology* **92**, May, p. 103553, 2020, doi: [10.1016/j.fm.2020.103553](https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103553)
5. J. Moreno-García, A. L. Coi, G. Zara, T. García-Martínez, J. C. Mauricio, y M. Budroni, «Study of the role of the covalently linked cell wall protein (Ccw14p) and yeast glycoprotein (Ygp1p) within biofilm formation in a flor yeast strain», *FEMS Yeast Research* **18**(2), p. foy005, mar. 2018, doi: [10.1093/femsyr/foy005](https://doi.org/10.1093/femsyr/foy005)
6. J. L. Legras, C. Erny, y C. Charpentier, «Population structure and comparative genome hybridization of European flor yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome», *PLoS ONE* **9**(10), 2014, doi: [10.1371/journal.pone.0108089](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108089)
7. Esteve-Zaroso, M. J. Peris-Torán, E. García-Maiquez, F. Uruburu, y A. Querol, «Yeast Population Dynamics during the Fermentation and Biological Aging of Sherry Wines», *Applied and Environmental Microbiology* **67**(5), pp. 2056-2061, 2001, doi: [10.1128/AEM.67.5.2056-2061.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2056-2061.2001)
8. G. Cordero-Bueso *et al.*, «Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grapeberries», *International Journal of Food Microbiology* **145**(1), pp. 132-139, 2011, doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.010](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.010)

- 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040
9. J. Sabate, J. Cano, B. Esteve-Zarzoso, y J. M. Guillamón, «Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA», *Microbiological Research* **157**(4), pp. 267-274, 2002, doi: 10.1078/0944-5013-00163
  10. Esteve-Zarzoso, M. T. Fernández-Espinar, y A. Querol, «Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* “flor” yeast races involved in sherry ageing», *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **85**(2), pp. 151-158, 2004, doi: 10.1023/B:ANTO.0000020282.83717.bd
  11. Vaudano y E. Garcia-Moruno, «Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis», *Food Microbiology* **25**(1), pp. 56-64, 2008, doi: 10.1016/j.fm.2007.08.001
  12. Vaudano, G. Quinterno, A. Costantini, L. Pulcini, E. Pessione, y E. Garcia-Moruno, «Yeast distribution in Grignolino grapes growing in a new vineyard in Piedmont and the technological characterization of indigenous *Saccharomyces* spp. strains», *International Journal of Food Microbiology* **289**, May 2018, pp. 154-161, 2019, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.016
  13. C. Geijer, R. Ledesma-Amaro, y E. Tomás-Pejó, «Unraveling the potential of non-conventional yeasts in biotechnology», *FEMS Yeast Research*, **22**(1), p. foab071, ene. 2022, doi: 10.1093/femsyr/foab071
  14. J. Carbonero-Pacheco, J. Moreno-García, J. Moreno, T. García-Martínez, y J. C. Mauricio, «Revealing the Yeast Diversity of the Flor Biofilm Microbiota in Sherry Wines Through Internal Transcribed Spacer-Metabarcoding and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry.», *Front Microbiol* **12**, p. 825756, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.825756
  15. M. Ruiz-Muñoz, M. Hernández-Fernández, G. Cordero-Bueso, S. Martínez-Verdugo, F. Pérez, J.M. Cantoral, J.M. (2022). Non-Saccharomyces are also forming the veil of flor in Sherry wines. Fermentation (en prensa).»
  16. D. Avdanina y A. Zghun, «Sherry Wines: Worldwide Production, Chemical Composition and Screening Conception for Flor Yeasts», *Fermentation* **8**(8), p. 381, ago. 2022, doi: 10.3390/fermentation8080381
  17. D. Carrasco *et al.*, «Allelic variation in the VvMYBA1 and VvMYBA2 domestication genes in natural grapevine populations (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*)», *Plant Systematics and Evolution* **301**(6), pp. 1613-1624, 2015, doi: 10.1007/s00606-014-1181-y
  18. M. E. Rodríguez, H. Orozco, J. M. Cantoral, E. Matallana, y A. Aranda, «Acetyltransferase SAS2 and sirtuin SIR2, respectively, control flocculation and biofilm formation in wine yeast», *FEMS Yeast Research* **14**(6), pp. 845-857, 2014, doi: 10.1111/1567-1364.12173
  19. T. Qin, J. Liao, Y. Zheng, W. Zhang, y X. Zhang, «Oenological Characteristics of Four Non-Saccharomyces Yeast Strains With  $\beta$ -Glycosidase Activity.», *Front Microbiol* **12**, p. 626920, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.626920
  20. A. A.-N. Zilelidou Aspasia, «Understanding Wine through Yeast Interactions», *Microorganisms* **9**(8), 2021, doi: 10.3390/microorganisms9081620
  21. R. Escribano *et al.*, «Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-Saccharomyces species and clones», *Journal of applied microbiology* **124**(6), pp. 1521-1531, 2018
  22. E. Durán-Guerrero, R. Castro, M. de V. García-Moreno, M. del C. Rodríguez-Dodero, M. Schwarz, y D. Guillén-Sánchez, «Aroma of Sherry Products: A Review», *Foods* **10**(4), p. 753, 2021
  23. Alexandre, «Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*-Their ecology, genetics and metabolism», *International Journal of Food Microbiology* **167**(2), pp. 269-275, 2013, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.021