

**INCIDENCIA DE LA COMPOSICIÓN
NITROGENADA Y AZÚCARES
REDUCTORES DEL MOSTO SOBRE LOS
AROMAS FERMENTATIVOS DE VINOS
CV. MALBEC DE TRES ZONAS
VITÍCOLAS DE MENDOZA**

Brom. María de los Angeles Bucolo

TESIS DE GRADO

LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Facultad de Cs. Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo

Mendoza, 2020

**INCIDENCIA DE LA COMPOSICIÓN
NITROGENADA Y AZÚCARES
REDUCTORES DEL MOSTO SOBRE
LOS AROMAS FERMENTATIVOS DE
VINOS CV. MALBEC DE TRES ZONAS
VITÍCOLAS DE MENDOZA**

Brom. María de los Angeles Bucolo

DIRECCIÓN POSTAL: San Martín 1573, Las Heras, Mendoza, Argentina. (5539)

CORREO ELECTRÓNICO: angiebucolo@hotmail.com / angiebucolo@gmail.com

DIRECTORA: Dra. Mariela Assof.

CO DIRECTORA: Dra. Viviana Jofré.

MIEMBROS DEL COMITÉ EVALUADOR:

Presidente: MSc Jorge Nazrala

Vocales: Ing. Agr. Ignacio Galarraga

Lic. Santiago Palero

Suplente: Ing. Agr. Francisco Gómez

RESUMEN

Los aromas fermentativos son compuestos volátiles de gran importancia debido a su impacto positivo o negativo en el perfil sensorial de los vinos. Proviene principalmente del metabolismo de las levaduras sobre carbohidratos, lípidos y compuestos nitrogenados de los mostos. Diversos estudios han demostrado que los aromas fermentativos están directamente influenciados por la composición nitrogenada de los mostos, la que a su vez depende del cepaje, la zona de cultivo, las prácticas culturales y enológicas. Estudios recientes en el cultivar Malbec han demostrado que la zona geográfica incide sobre la composición fenólica de uvas y vinos. Sin embargo, el conocimiento de la influencia de la zona de procedencia sobre la composición volátil fermentativa en vinos Malbec y sus precursores en los mostos es escaso. En este marco, se propone determinar influencia del ión amonio y las hexosas de mostos de uvas cv. Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza sobre los aromas fermentativos en sus vinos. Se elaboraron vinos Malbec a partir de uvas cosechadas a 25 °Brix. Las uvas fueron obtenidas de viñedos de Mendoza localizados en La Libertad (Rivadavia, 667 msnm), Agrelo (Luján de Cuyo, 952 msnm) y Gualtallary (Tupungato, 1483 msnm). Se elaboraron vinos por triplicado inoculando en los mostos una cepa de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* comercial. Se realizó el seguimiento y control de los mostos durante la fermentación alcohólica. Se extrajeron muestras cada dos días hasta la obtención de los vinos, conservándose a -18°C hasta el momento de su análisis. Se determinó el contenido de amonio y glucosa/fructosa enzimáticamente por Espectrofotometría UV-Visible y los aromas fermentativos por Microextracción en Fase Sólida en Espacio de Cabeza y GC-MS Cromatografía de Gases con Detector de Masas. Se empleó el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.1 para el análisis de los datos. La relación glucosa/fructosa fue superior a 1 en todos los mostos indicando un adecuado contenido de glucosa para el desarrollo de las fermentaciones. Los mostos de las tres zonas mostraron diferencias significativas en el contenido de ión amonio (Tukey, $p < 0,05$) y fue menor en mostos de Gualtallary. Las fermentaciones desarrolladas a partir de mostos Malbec de Gualtallary finalizaron a los 13 días, mientras que los de La Libertad y Agrelo lo hicieron en 7 días. Esta diferencia podría deberse a la menor disponibilidad de fuentes nitrogenadas que tienen las levaduras en los mostos de Gualtallary. Los vinos de La Libertad y Agrelo no mostraron diferencias significativas en el contenido total de ésteres, alcoholes superiores y terpenoides y su contenido fue superior al encontrado en los vinos de Gualtallary. Los resultados obtenidos demostraron que el contenido de ión amonio en mostos Malbec, influenciado por la zona de procedencia de sus uvas, junto con otras fuentes nitrogenadas, incidiría en el perfil volátil fermentativo de sus vinos.

Palabras clave: Malbec, zona geográfica, hexosas, fermentación, amonio.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, novio y amigas, por el apoyo incondicional que me brindaron durante este proceso.

A mi Directora por la ayuda, el acompañamiento, y la generosidad de compartir su conocimiento y su tiempo.

A mi Codirectora por el acompañamiento y las sugerencias basadas en su experiencia y conocimiento.

Al Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales del INTA, por su generosidad en cuanto a reactivos e instrumental para realizar los ensayos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCION	8
1.1- HISTORIA DE LA VID Y SU LLEGADA A MENDOZA.....	8
1.2- REGIONES VITIVINICOLAS.....	9
1.2.1 Regiones vitícolas en Argentina	9
1.2.2- Regiones vitícolas en Mendoza	9
1.2.2.1- Zona Centro – Agrelo, Luján de Cuyo	10
1.2.2.2. Zona Este- La Libertad, Rivadavia.....	10
1.2.2.3. Valle de Uco – Gualtallary, Tupungato	10
1.3- EL VINO, BEBIDA NACIONAL Y LA IMPORTANCIA DEL MALBEC.....	11
1.4- CONTEXTO ACTUAL DEL VINO ARGENTINO	12
1.4- PROCESO DE ELABORACION DE VINOS TINTOS	14
1.4.1- Muestreo.....	15
1.4.2- Cosecha	15
1.4.3- Transporte.....	15
1.4.4- Recepción	16
1.4.5- Molienda.....	16
1.4.6- Descobajado o desraspado.....	16
1.4.7- Encubado	16
1.4.8- Fermentaciones	17
1.4.8.1- Maceración.....	18
1.4.9- Descube	18
1.4.10- Prensado.....	18
1.4.11- Trasiegos.....	18
1.4.12- Fermentación maloláctica.....	19
1.4.13- Estabilización.....	19
1.4.14- Fraccionamiento	20
1.5- COMPUESTOS QUIMICOS DE IMPACTO EN LA ELABORACION DE VINOS: HIDRATOS DE CARBONO Y COMPUESTOS NITROGENADOS.....	20
1.5.1- Principales hidratos de carbono en mostos	20
1.5.2- Compuestos nitrogenados en mostos	21
1.5.3- Metabolismo de compuestos nitrogenados y hexosas durante la fermentación alcohólica	22

1.5.4- Hidratos de carbono en vinos.....	23
1.5.5- Compuestos nitrogenados en vinos.....	23
1.6-COMPOSICIÓN VOLÁTIL EN VINOS.....	24
1.6.1- Compuestos volátiles varietales:.....	25
1.6.2- Compuestos volátiles prefermentativos:.....	25
1.6.3- Compuestos volátiles fermentativos:.....	25
1.6.4- Aromas de conservación y añejamiento:.....	27
2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
2.1- HIPÓTESIS	28
2.2- OBJETIVO GENERAL	28
2.3- OBJETIVOS ESPECIFICOS	28
3- MATERIALES Y METODOS	29
3.1- Obtención de mostos y vinos Malbec.....	29
3.2- Determinación de parámetros generales en mostos y vinos.....	30
3.3- Determinación de glucosa y fructosa por reacción enzimática y espectrofotometría UV-Visible.....	30
3.3.1.- Preparación de la muestra y reactivos.....	30
3.3.2- Procedimiento	31
3.4- Determinación de ión amonio por reacción enzimática y espectrofotometría UV-Visible.....	32
3.4.1.- Preparación de la muestra y reactivos.....	32
3.4.2- Procedimiento.....	32
3.5- Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA).....	33
3.6- Determinación de aromas fermentativos por microextracción en fase sólida y cromatografía gaseosa con detección de masas	33
3.6.1- Preparación de muestra.....	33
3.6.2- Extracción y preconcentración.....	34
3.6.3- Separación de compuestos volátiles	34
3.6.4- Detección, identificación y cuantificación.....	34
3.7- Análisis estadístico.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
4.1- Parámetros generales en mostos	35
4.2- Evolución de los parámetros generales durante las fermentaciones	36
4.3- Evolución del ión amonio, glucosa y fructosa durante las fermentaciones alcohólicas	37
4.4- Relación entre los compuestos nitrogenados y hexosas en mostos Malbec y los compuestos volátiles en vinos	41

4.4.1. Alcoholes superiores	42
4.4.2. Esteres.....	43
4.4.3. Terpenoides	43
5- CONCLUSIONES.....	44
6- PRESENTACION EN CONGRESO.....	45
7- AGRADECIMIENTOS ESPECIALES	45
8- BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUCCION

1.1- HISTORIA DE LA VID Y SU LLEGADA A MENDOZA

El origen de la vitivinicultura en el mundo se habría situado en las orillas del Nilo con la cultura egipcia, aunque algunos afirman que se remonta al 3000 a.C. en el área del Mar Negro y Caspio (zona considerada cuna de la vid). Su expansión sobre el continente europeo estuvo dada por el avance de los romanos durante sus conquistas, ya que para ellos el vino era el principal producto utilizado para trueque comercial. En aquel entonces, España e Italia eran las principales zonas productivas de vino (Lacoste, 2013; Lanzarini & Mangione, 2015).

Durante la invasión otomana a Europa, a partir de 1453, muchas vides fueron erradicadas ya que el islam prohibía el consumo de vino. A pesar de ello, su permanencia fue posible gracias a que los monjes católicos utilizaban el vino en la liturgia cristiana. De esta forma, contribuyeron a que la tradición vitivinícola no se perdiera, cultivando la vid en abadías y monasterios para luego distribuirla por toda Europa y América (Lacoste, 2013; Lanzarini & Mangione, 2015).

La vid desembarcó en América, más precisamente en Santo Domingo, durante el segundo viaje de Colón, lugar donde el cultivo no prosperó dado el clima tropical circundante. México, Perú y Chile fueron zonas donde se arraigó perfectamente y el cepaje que se adaptó a este nuevo continente se denominó "Criollo". A pesar de que existían vides silvestres en la América precolombina, éstas no eran aptas para la elaboración de vino, es por eso que los españoles son considerados los predecesores del desarrollo vitivinícola en nuestro continente (Girini, 2014).

De las tres corrientes colonizadoras que poblaron el territorio de nuestro país la que provenía del Oeste, a través de Chile, trajo las primeras estacas y semillas de vid, las que fueron implantadas en Santiago del Estero en 1553, y luego en Mendoza y San Juan en la década siguiente. (Lanzarini & Mangione, 2015).

Entre 1816 y 1885 con la declaración de la independencia y la llegada del ferrocarril, se producen cambios en el equipamiento de las bodegas, la creación de la Quinta Normal de Agricultura (1853), la introducción de cepas francesas y la capacitación técnica de los productores (Girini, 2014).

Mendoza es el centro vitivinícola argentino más importante, siendo ésta una de las principales actividades económicas de la región (Lanzarini & Mangione, 2015), con el

Malbec como principal cepaje tinto producido. Durante la última década, se han desarrollado diversos estudios del cultivar Malbec, variedad insignia de Argentina, orientados a conocer su comportamiento fenológico en función de las condiciones agroclimáticas de la zona implantada, y tecnológico, de acuerdo a las variables productivas utilizadas. Dichas variables, tendrán impacto en la composición química y, por tanto, en los atributos sensoriales de los vinos obtenidos (Casassa & Sari, 2015; de Rosas et al., 2017; M. L. Fanzone, 2012).

1.2- REGIONES VITIVINICOLAS

1.2.1 Regiones vitícolas en Argentina

Las diferencias geográficas hacen de Argentina un país donde es posible adecuar, en sus distintas regiones, diferentes variedades de uva. La principal zona vitivinícola argentina se encuentra ubicada al oeste del mapa, y se extiende desde los 22° hasta los 40° de latitud sur. Esta franja puede ser dividida en tres regiones bien diferenciadas por sus características ecológicas netamente definidas y la diversidad de sus suelos: Noroeste, Centro Oeste y Sur (Pandolfi & Cuello, 2003).

Dichas zonas se caracterizan por encontrarse a diferentes latitudes, abarcando distintas provincias argentinas:

- Noroeste: 22° a 29° de latitud sur, abarca las provincias de Salta, Catamarca y La Rioja.
- Centro Oeste: 29,5° a 36° de latitud sur, abarca a San Juan y a Mendoza. El 91,7% de la superficie de viñedos del país está en esta zona.
- Sur: 37° a 40° de latitud sur, abarca las provincias de Neuquén y Río negro (Goldin, 2004).

1.2.2- Regiones vitícolas en Mendoza

La vitivinicultura es una de las principales actividades económicas de Mendoza, ya que las condiciones climáticas y de suelo son ideales para el adecuado desarrollo de la vid. Los suelos predominantes en las regiones vitícolas son, en general, francos a franco arcillosos, permeables y con poca materia orgánica; en las regiones altas y ventosas presentan textura franco arenosa y arena limosa y pedregosa; y en el Este provincial son ricos en potasio (Vallone, 2007).

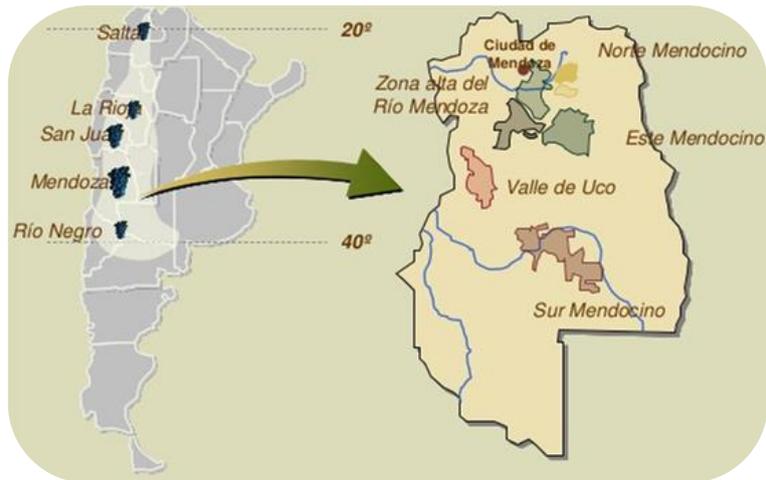


Figura 1: Principales regiones vitivinícolas de Argentina y Mendoza.

Fuente: <https://es.slideshare.net/pinzherreramiguel/vinos-48306632>

Dentro de la provincia se pueden diferenciar 5 regiones vitivinícolas (Fig. 1): Norte (Lavalle y Las Heras); Centro (Luján de Cuyo, Maipú, Guaymallén y Godoy Cruz); Este (San Martín, Rivadavia, Junín, Santa Rosa y La Paz); Valle de Uco (Tunuyán, Tupungato y San Carlos) y el Sur (San Rafael y General Alvear) (Pandolfi & Cuello, 2003).

1.2.2.1- Zona Centro – Agrelo, Luján de Cuyo

La óptima llegada de luz solar, el índice de frescor nocturno, y las características particulares de la tierra (suelos profundos, arenosos y pedregosos con muy poca arcilla), otorgan una calidad única a los viñedos ubicados alrededor de los 1.000 msnm. La zona de piedemonte cuenta con una buena pendiente, esta característica hace que sea ideal para favorecer el drenaje de sus suelos.

1.2.2.2. Zona Este- La Libertad, Rivadavia

El clima templado y las horas sol que tienen sus cultivos, permiten una óptima maduración de la uva. En esta zona hay una amplia disponibilidad de terrenos que se encuentran entre los 650 y los 750 msnm (Wines of Argentina, 2011).

1.2.2.3. Valle de Uco – Gualtallary, Tupungato

Los viñedos implantados a mayor altitud en Mendoza se encuentran en Gualtallary, Tupungato, dentro del Valle de Uco. Algunos de ellos se encuentran emplazados a 1550

msnm, por lo que en dichas zonas las temperaturas máximas son moderadas, con una baja humedad relativa ambiental y gran exposición a la luz solar. Estas características climáticas permiten que sus frutos biosinteticen altos contenidos de compuestos fenólicos (Berli, Fanzone, Piccoli & Bottini, 2011; M. Fanzone, Peña-Neira, Jofré, Assof & Zamora, 2010). La zona posee suelos rocosos, arenosos o aluvionales, por lo que tienen una buena permeabilidad y drenaje y bajos niveles de nitrógeno (Vallone, 2007; Wines of Argentina, 2011).

1.3- EL VINO, BEBIDA NACIONAL Y LA IMPORTANCIA DEL MALBEC

El Código Alimentario Argentino (C.A.A.), en su artículo 1093 del Capítulo XIII, define al vino genuino como aquel que es obtenido por la fermentación alcohólica de la uva fresca y madura o del mosto de la uva fresca, elaborados dentro de la misma zona de producción. En tanto que el mosto virgen de uva ha sido denominado por la Ley 14.878 como aquel que proviene de la molienda o prensado de la uva fresca en tanto no haya empezado a fermentar (Fermentadas, 1998; Instituto Nacional de Vitivinicultura, 1959).

En Argentina, el vino fue declarado bebida nacional y publicado en el boletín oficial de la Nación (Ley 26.870) el día 2 de agosto de 2013, con el fin de impulsar su promoción en el mundo. Este esfuerzo por promover y difundir al vino argentino, principal actividad económica en la región Cuyo, estuvo acompañada por el Plan Estratégico Vitivinícola 2020 impulsado por la Corporación Vitivinícola Argentina-COVIAR. Se suma a esta importante estrategia el hecho de que Mendoza fuese designada como una de las más importantes capitales mundiales del vino (COVIAR, 2001).

El Malbec es originario de Cahors, Francia donde es conocido como Cot o Auxerrois. Sin embargo, el cepaje implantado en nuestro país, logró diferenciarse ampliamente del Cot cultivado en Francia. En Argentina las principales zonas de cultivo se ubican hacia el Oeste, en regiones bien diferenciadas topográfica y agroecológicamente (Goldin, 2004).

Ampelográficamente, se describe como una variedad de hojas orbiculares y cuneiformes, desiguales, y rugosas, presentando 3 lóbulos débiles, y uno medio más largo, con dientes rectos y medianos (Fig.2). Presenta bimorfismo foliar, con hojas enteras y trilobadas. En abril-mayo se vuelven rojizas hasta llegar a tener tonalidades bordó.

Los racimos se caracterizan por ser cónicos, de tamaño mediano, sin la presencia de granos apretados, sus bayas tienen piel gruesa, con mucho color, taninos fuertes, y sabores acentuados (Catania & Avagnina, 2010; Goldin, 2004).



Figura 2: Característica ampelográfica de la hoja del cepaje Malbec.

En general, los vinos del cultivar Malbec se caracterizan por su color rojo rubí intenso con tonos violáceos, pudiendo presentar aromas predominantes a ciruela y a frutos rojos. En boca cuenta con buena estructura y concentración, con baja astringencia, debido a sus taninos suaves, sabor levemente dulce y proporcionada acidez. Estas notas gustativas incrementan su intensidad cuando los vinos son elaborados con uvas de zonas de mayor altitud (Goldin, 2004).

1.4- CONTEXTO ACTUAL DEL VINO ARGENTINO

Argentina se ha posicionado en las últimas décadas como uno de los países productores de vinos de calidad. Esto ha sido validado por la designación de Mendoza como la octava capital mundial del vino por la Organización Internacional de la Viña y el Vino, teniendo como cepaje emblemático el cultivar Malbec (Wines of Argentina, 2013). La superficie de vid en Argentina al 2018 es de 218233 ha, en Mendoza representa el 70,1% del total del país, es decir, 153.029 ha, de las cuales 36586 ha están destinadas al cultivo del cepaje Malbec. Argentina cuenta con cerca de 895 bodegas elaboradoras de vino, la mayoría de ellas situadas en la provincia de Mendoza. La estadística vitivinícola aportada por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) indica que en 2018 en el país se cosecharon 25.733.114 quintales de uva tanto para consumo en fresco, elaboración de mostos y vinos (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2018a).

El vino es, actualmente, la segunda bebida alcohólica más consumida por los argentinos (Urrutia, 2015). El volumen de vinos varietales autorizados para consumo tuvo una disminución del 5,2% el último año (2017), comportamiento también observado en el

consumo interno (Fig. 3), con una reducción del 6,4% respecto de 2016 (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2018c, 2018b).

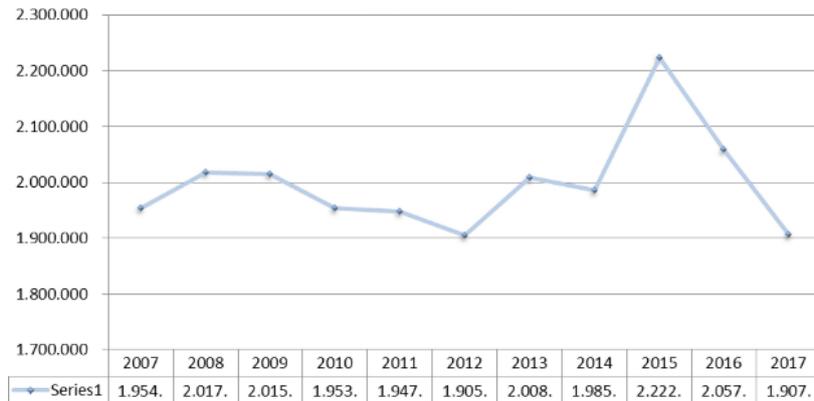


Figura 3: Comportamiento del mercado interno de vinos varietales en el período 2007-2017 en Argentina. Fuente: (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2018a).

La exportación de vinos varietales argentinos representa el 87% del total de vinos aptos para venta, como lo muestra la Figura 4 (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2018b).

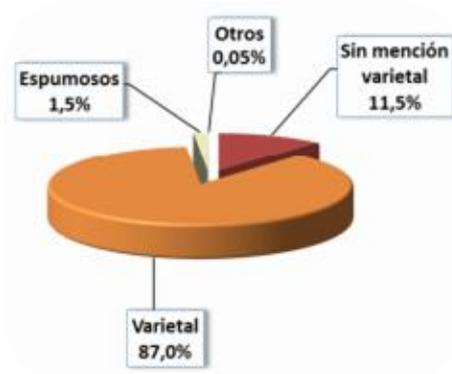


Figura 4: Volumen de exportación de vinos correspondiente a la vendimia 2017 donde se observa la importancia de los vinos varietales argentinos en los mercados internacionales. Fuente: (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2018b).

El Malbec sigue siendo el cultivar que lidera el mercado interno de consumo y de exportaciones (Fig.5), representado por un 38,1% y 61,42%, respectivamente, del total de vinos tanto monovarietales como blends. (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2018b)

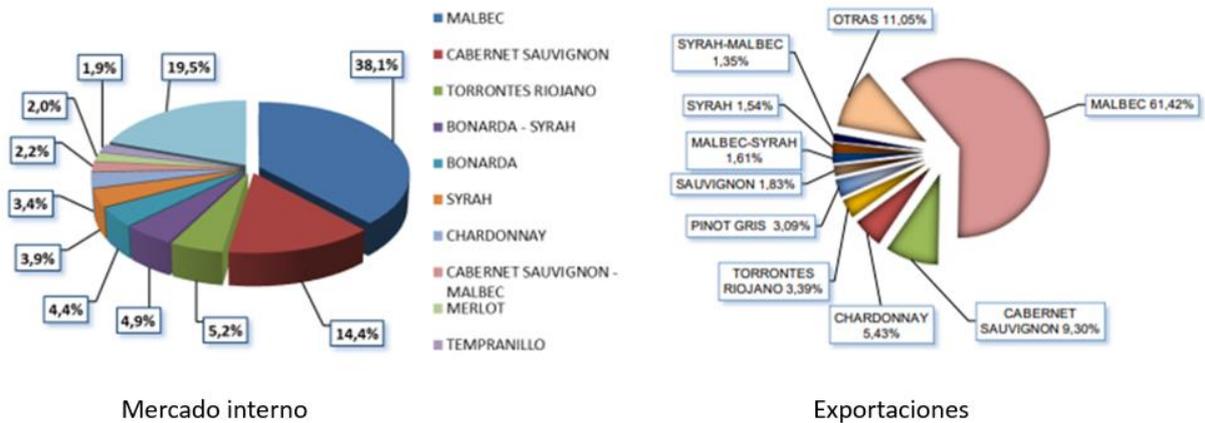


Figura 5: Comportamiento de los vinos monovarietales y blends de diferentes cepajes tanto en el mercado interno como en las exportaciones correspondientes a la vendimia 2017.
 Fuente: (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2018c)

Esto evidencia la importancia económica que tiene el Malbec en Argentina y la necesidad de conocer aún más este cultivar, desde el punto de vista vitícola y tecnológico para continuar ofreciendo tanto al mercado regional como internacional un producto que siga destacándose en calidad.

1.4- PROCESO DE ELABORACION DE VINOS TINTOS

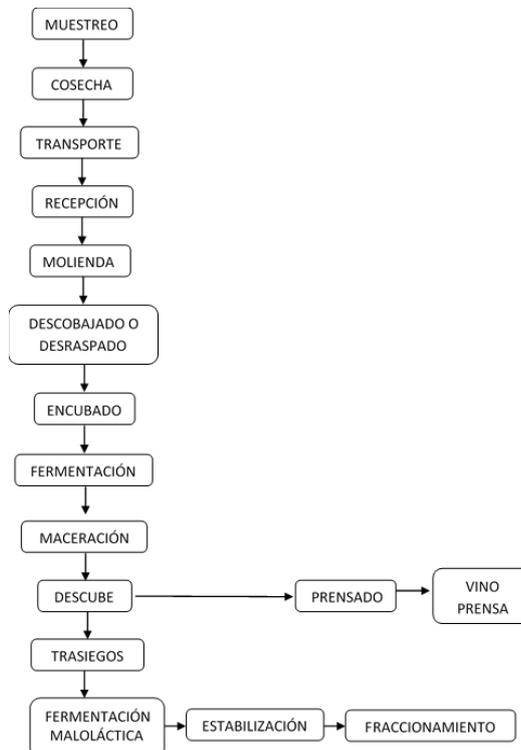


Figura 6: Esquema del proceso de elaboración de vinos tintos.

1.4.1- Muestreo

El muestreo de uvas es esencial para definir el momento de cosecha. En las uvas muestreadas se determina el contenido de azúcares (sólidos solubles) empleando un refractómetro y expresando los resultados en °Bx o en g.L^{-1} de sólidos solubles. En base a este parámetro, podemos tener una idea del alcohol potencial del vino y establecer el punto adecuado de cosecha. La degustación de la uva por personal capacitado, es una forma de determinar el grado de madurez, juzgando el potencial fenólico que se aprecia al probarla (P. Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean & Dubourdiu, 2006). Un indicador visual del grado de madurez es considerado, según Goldin (2004), como el momento donde, al presionar la baya, sale primero un jugo dulce y después una pulpa íntegra y casi transparente, con semillas marrón brillantes.

1.4.2- Cosecha

En Mendoza, la vendimia comienza hacia finales del verano, pudiendo extenderse hasta abril (Goldin, 2004). El momento de cosecha dependerá de las condiciones climáticas imperantes. Las condiciones climáticas son importantes en este momento, ya que es recomendable cosechar evitando días lluviosos, para que las uvas estén secas y así evitar la dilución de los azúcares. Días demasiado cálidos podrían generar ruptura de las bayas, por lo cual se perdería parte del jugo y serían más susceptibles a contaminaciones microbianas. La cosecha puede ser manual o mecánica, ambas tienen sus beneficios y sus defectos. La cosecha manual mantiene mejor la calidad de las bayas y permite discriminar los racimos según distintos criterios, pero es lenta y requiere de mucho capital humano. Por otro lado, la mecánica es rápida, es de fácil empleo, pero generalmente disminuye la calidad de la uva cosechada, y no puede ser llevada muy lejos, a menos que la cosecha sea cuidadosa, con una máquina regulada adecuadamente. (Flanzy, 2002; Pascal Ribéreau-Gayon, Dubourdiu, Donèche & Lonvaud, 2005).

1.4.3- Transporte

El objetivo es que los racimos lleguen enteros y sin modificaciones posteriores a la cosecha, por este motivo los recipientes deben ser lo menos profundos posibles (hasta 0,6m), de un material adecuado y de fácil limpieza. En el caso que no se cuente con este tipo de envase, pueden emplearse carpas que cubran la superficie del acoplado del camión para que la uva no entre en contacto con el material y no se pierda mosto. También está permitido el uso de bins de material plástico de hasta 400 kg. En general, la mejor estrategia de transporte para

conservar en adecuadas condiciones la uva, evitando fermentaciones anticipadas, es realizarlo con la mayor rapidez posible (Flanzy, 2002; Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

1.4.4- Recepción

En esta etapa se realiza un control de peso, se corrobora la variedad, el estado sanitario, el tenor azucarino.

1.4.5- Molienda

Una vez recibida la uva, se descarga en lagares de acero inoxidable para molerla. En la moledora se realiza la determinación por refractometría del tenor azucarino. Es en este momento cuando pueden agregarse diferentes compuestos que faciliten el normal desarrollo de las fermentaciones, como es el caso de la adición de SO₂ (como metabisulfito de sodio) para inhibir la actividad de los microorganismos que trae la uva (Flanzy, 2002; Goldin, 2004). Existen dos tipos de estrujadores, a rodillos y los rotativos, estos últimos utilizan la fuerza centrífuga para estallar los granos contra un cilindro cribado, permitiendo el paso de los granos estallados por las perforaciones, quedando el raspón retenido, por lo que este tipo de estrujadora produce también el descobajado. Otros métodos modernos emplean los principios de los tradicionales métodos, empleando otros sistemas mecánicos, como es el caso del *flash detente* (Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

1.4.6- Descobajado o desraspado

Consiste en la eliminación del raspón y es realizado por una maquinaria formada por un cilindro cribado, con un eje rotatorio con paletas en su interior. La pulpa y el hollejo pasan por las perforaciones, y el raspón se elimina al final del tubo. Posterior a este paso hay una bomba que sirve para distribuir el mosto por diferentes cubas (Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

1.4.7- Encubado

Es el llenado de las vasijas fermentativas con el mosto obtenido. El llenado se realiza dejando aproximadamente un 20% vacío, debido a que durante la fermentación se libera mucho CO₂ (Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005). Es de gran importancia la limpieza de las cubas con agua, antes y después del encubado, para evitar contaminación con bacterias y hongos indeseables (Flanzy, 2002).

Durante esta etapa, el gas lleva el orujo hacia arriba formando el sombrero, que durante la fermentación está protegido de oxidaciones y del ataque de bacterias acéticas por el mismo

CO₂ liberado. Una vez que se reduce la liberación de este gas, es necesario hundir el sombrero, junto con los microorganismos aerobios que contiene. Este proceso puede hacerse manualmente en cubas pequeñas, o mecánicamente, y se denomina bazuqueo. Como consecuencia de esta intervención, también se produce la extracción de compuestos deseables del orujo (como antocianinas y taninos), la aireación del mosto y la homogeneización de la temperatura (Ribéreau-Gayon Pascal, Dubourdieu, Donèche & Lonvaud, 2006).

1.4.8- Fermentaciones

Para el adecuado inicio del proceso fermentativo, es importante llevar el mosto a una temperatura adecuada, 20°C aproximadamente, para poder inocular las levaduras que llevarán a cabo la fermentación. La temperatura de fermentación no debería superar los 25°C para evitar paradas fermentativas, por lo que se recurre a la refrigeración, cuando se detecta un aumento de la misma.

Las vasijas fermentativas cerradas solían tener el problema del calentamiento y la falta de oxígeno, es por eso que en la actualidad se soluciona este inconveniente recurriendo a la refrigeración, y para lo segundo se realiza una operación denominada remontaje. Esta operación consiste en tomar líquido de la parte inferior de la cuba y rociarla por encima del sombrero. De ésta manera se homogeneizan las levaduras, el azúcar y la temperatura; se favorece la multiplicación de levaduras por la aireación; activa la fermentación; y moja el sombrero extrayendo compuestos de interés sensorial y evitando que se acetifique. El remontaje más eficaz es el realizado al segundo día de fermentación, porque las levaduras en la fase de crecimiento, tienen mayor requerimiento de oxígeno, y también se evitan pérdidas de alcohol por evaporación. Empíricamente se ha probado que una aireación deseable se da con dos remontajes a un intervalo de 24 horas, la cantidad de remontajes es importante, ya que, si se los utiliza en exceso, se pueden extraer demasiados taninos (Flanzy, 2002; Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Durante la fermentación es necesario controlar la temperatura, la velocidad de fermentación, y también verificar el fin de la fermentación mediante la obtención de menos de 2 g/L de materia reductora, que incluye a la glucosa y a la fructosa. Cuando está terminada es recomendable hacer el seguimiento del ácido málico, ya que la fermentación maloláctica debería comenzar después del agotamiento de los azúcares (Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005; Zamora, 2009).

1.4.8.1- Maceración

Comúnmente es llevada a cabo durante el encubado, así como también la fermentación alcohólica. En ambos procesos, la maceración favorece la extracción de compuestos de interés sensorial del orujo. Esta etapa permite el aporte al vino de compuestos fenólicos, colorantes, sustancias nitrogenadas, polisacáridos (pectinas mayoritariamente), minerales, y compuestos volátiles libres o ligados a azúcares (glicosil glicósidos), entre otros.

1.4.9- Descube

Es el proceso mediante el cual se vacía la cuba donde se maceró y se llevó a cabo parte o toda la fermentación alcohólica, para llevar el vino a otra vasija donde completará la fermentación alcohólica, si es necesario, y se desarrollará la fermentación maloláctica. Puede descubrirse y llevarse el vino directamente a barrica o a otra cuba. La determinación del momento de descube depende de varios factores: el tipo de vino buscado (cuerpo, aromas, color), de la materia prima (uvas poco maduras necesitan encubados cortos para evitar la extracción de taninos duros), de la vinificación, entre otros. Si el encubado es más extenso, hay un aumento en la extracción de taninos y los mismos sufren transformaciones que suavizan sensorialmente los vinos (Flanzy, 2002; Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

1.4.10- Prensado

En esta etapa el orujo es prensado extrayendo así el vino prensa. Es un proceso que debe hacerse rápido para evitar oxidaciones. Los dispositivos que pueden utilizarse son, prensas verticales hidráulicas, prensas horizontales a bandejas, prensas neumáticas, prensas continuas, cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas (Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005). A veces se mezcla el vino prensa con el vino gota para otorgar mayor estructura y concentración. Los sólidos obtenidos del prensado, podrían emplearse para la producción de aceite de uva, o se utiliza como abono en las plantaciones (Goldin, 2004).

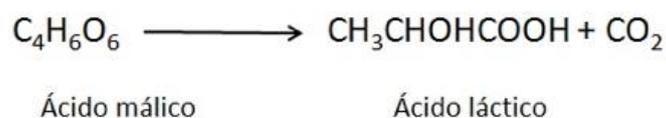
1.4.11- Trasiegos

Consisten en separar el vino de las borras que quedan en el fondo de las vasijas. Esta etapa permitiría, además, la evaporación del gas carbónico (Flanzy, 2002).

1.4.12- Fermentación maloláctica

Esta fermentación produce una reducción de la acidez del vino, por la conversión del ácido málico en ácido láctico realizada por bacterias lácticas. Sensorialmente el cambio es notable ya que aparece una sensación de acidez más suave en boca.

La reacción se explica como la descarboxilación del ácido málico, perdiendo una función ácida, la cual es liberada como CO₂.



Se controla su desarrollo mediante cromatografía de papel, donde se observa la desaparición del ácido málico y la aparición del ácido láctico. En esta etapa es recomendable controlar también la acidez volátil, ya que las bacterias lácticas podrían degradar el ácido cítrico y biotransformarlo en acético. Una vez terminada la fermentación maloláctica, las bacterias pueden metabolizar compuestos deseables como glicerol, ácido tartárico y otros, aumentando también la acidez volátil y la acidez total. Es necesario entonces, tomar precauciones para que esto no suceda, eliminando las bacterias, mediante medios físicos, como calor, o la filtración, o por medio de procedimientos químicos como el agregado de SO₂ o ciertos inhibidores como la lisozima (Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

1.4.13- Estabilización

Se realiza para evitar la aparición de precipitados en la botella. Este proceso incluye la clarificación, la filtración, y la estabilización tartárica. Los vinos que se someten a procesos de añejamiento, no necesariamente deben ser estabilizados, ya que el proceso se hace naturalmente con el tiempo.

1.4.13.1- Clarificación

Los vinos jóvenes necesitan la adición de clarificantes que eliminen las proteínas y la materia en suspensión; en tintos se utiliza normalmente la albúmina y la gelatina. Se añaden al vino y se dejan actuar un tiempo, para que los componentes que quieren eliminarse precipiten. Mediante pruebas en pequeña escala se evalúan las dosis de clarificantes que se deben utilizar.

1.4.13.2- Filtración

Una vez que el vino ha sido clarificado, se pasa por filtros de tierra; de membrana o cartuchos; o por filtro tangencial, para retener partículas que hayan quedado en suspensión.

1.4.13.3- Estabilización tartárica

Se realiza para eliminar el bitartrato de potasio, ya que tiende a precipitar a bajas temperaturas. Para llevarla a cabo, se enfría el vino hasta temperaturas cercanas a su punto de congelación, ésta depende del grado alcohólico del vino. El vino se mantiene en dicha temperatura durante 6 o 7 días, tiempo en el cual se van formando cristales de bitartrato que precipitan. El sobrenadante luego se filtra en frío para eliminar microcristales de bitartrato.

1.4.14- Fraccionamiento

Se realiza con máquinas llenadoras. En Argentina, hay aproximadamente 100 tipos de envases. Para Malbec se utiliza generalmente una botella de color verde, neutralizada con tonalidades caramelo o ahumados, para proteger el producto de la luz, la misma se conoce comúnmente como "Burdeos" (Goldin, 2004).

1.5- COMPUESTOS QUIMICOS DE IMPACTO EN LA ELABORACION DE VINOS: HIDRATOS DE CARBONO Y COMPUESTOS NITROGENADOS

En general mostos y vinos contienen cantidades variables de azúcares, ión amonio, péptidos, aminoácidos, proteínas y otros compuestos nitrogenados, minerales, vitaminas, compuestos lipídicos, compuestos volátiles y fenólicos diversos, entre otros (Flanzy, 2002).

1.5.1- Principales hidratos de carbono en mostos

Los azúcares en las uvas están conformados en su gran mayoría, por la glucosa y la fructosa (hexosas). Proviene del metabolismo primario de la planta y se encuentran en concentraciones entre 170 a 220 g.L⁻¹. El contenido de estos compuestos en uvas y mostos depende de factores climáticos y agronómicos que afectan la madurez de los frutos (Flanzy, 2002; Keller, 2015).

La formación de estos azúcares se da en la fotosíntesis, proceso a partir del cual se sintetiza la sacarosa, que luego es hidrolizada por acción enzimática en estas dos hexosas (Flanzy, 2002). Son transportados desde las hojas hacia los racimos en el momento del envero. Para que estos compuestos se movilicen dentro de la planta, es necesario que la sacarosa sea hidrolizada, con el fin de reducir el tamaño molecular y facilitar su transporte. El

contenido de glucosa y fructosa durante el proceso de maduración de las uvas cambia, en el envero, la relación glucosa/fructosa es 2:1 y en el estado maduro, es de 1 a 0,95. Esto demostraría que, además de la hidrólisis de la sacarosa, se producen isomerizaciones de las hexosas, por lo cual esta relación cambia desde el envero hasta alcanzar la madurez. Al final de la fermentación alcohólica esta relación disminuye a valores de entre 0,2 y 0,4 (Flanzy, 2002; Waterhouse, Sacks & Jeffery, 2016). y, como ya se expresó, la D-glucosa y la D-fructosa son los carbohidratos más abundantes, pero la glucosa es la que prefieren la mayoría de las levaduras. (Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005; Zamora, 2009).

1.5.2- Compuestos nitrogenados en mostos

Existe una amplia gama de compuestos nitrogenados en mostos y vinos. En general, se considera que el contenido de compuestos nitrogenados en ciertas regiones podría alcanzar los 390 mg N.L^{-1} . El contenido de compuestos nitrogenados en uvas y sus mostos depende del grado de madurez, de las condiciones edafoclimáticas, la fertilización del suelo, la sanidad de la planta, entre otros (Flanzy, 2002; Keller, 2015).

La vid absorbe a través de sus raíces sales de amonio y nitratos. Estos nitratos luego son reducidos enzimáticamente convirtiéndose en ión amonio, detoxificándose así de estos aniones (Flanzy, 2002). El amonio ingresa a la célula por difusión facilitada y, por cada amonio que ingresa, se expulsa un hidrógeno, con la utilización de una molécula de ATP. Ya en el citoplasma, el amonio es empleado para la biosíntesis de aminoácidos por la vía de la glutamato deshidrogenasa, o por la de la glutamina sintetasa (Terrier, Poncet-Légrand & Cheyner, 2009).

En los mostos se encuentran además compuestos nitrogenados orgánicos como péptidos, proteínas, manoproteínas, vitaminas y aminoácidos, entre otros (Waterhouse et al., 2016). Los aminoácidos son importantes desde el punto de vista tecnológico ya que junto con el ión amonio conforman el nitrógeno fácilmente asimilable y, adicionalmente, son precursores de los alcohóles superiores (Flanzy, 2002; Fugelsang & Edwards, 2007). Los aminoácidos en mostos se encuentran en cantidades variables ya que también depende del cepaje, las condiciones climáticas, el grado de madurez, el suelo, etc (Loulakakis et al., 2009; Waterhouse et al., 2016).

1.5.3- Metabolismo de compuestos nitrogenados y hexosas durante la fermentación alcohólica

El ión amonio es fácilmente asimilado por las levaduras y su concentración en los vinos es menor que en sus correspondientes mostos (Mas et al., 2014). Sin embargo, no ocurre lo mismo con los aminoácidos ya que las levaduras no los metabolizan a todos de igual forma. Por un lado, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* no son capaces de asimilar la prolina bajo las condiciones en las que se desarrollan las fermentaciones alcohólicas (Magasanik & Kaiser, 2002). Por otro lado, las levaduras catabolizan aminoácidos de manera selectiva, por lo que la disponibilidad de ciertos aminoácidos de fácil asimilación afectaría el desarrollo de las fermentaciones. Forman parte del nitrógeno fácilmente asimilable junto con el ión amonio, parámetro químico ampliamente utilizado en la elaboración de vinos. Este parámetro permite establecer niveles de nitrógeno fermentable adecuados para el normal desarrollo de las fermentaciones alcohólicas (Fugelsang & Edwards, 2007; Terrier et al., 2009).

Las levaduras generarán a partir de los azúcares, alcohol, dióxido de carbono y glicerol principalmente. Otros compuestos minoritarios serán biosintetizados a partir del metabolismo de carbono y nitrógeno, como es el caso de los compuestos volátiles fermentativos. Estos compuestos incluyen ésteres, alcoholes superiores, aldehídos, cetonas y ciertos terpenoides (Bayonove, Baumes, Crouzet & Gunata, 2003) y dan a vinos jóvenes el carácter fresco-vinoso, aportando notas frutales y florales principalmente (Waterhouse & Ebeler, 1998). Por otro lado, los carbohidratos, además de ser el sustrato necesario para las fermentaciones alcohólicas, cumplen un rol importante en el sabor de los vinos, y en la producción de glicerol, alcohol que da untuosidad en boca (Flanzy, 2002; Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

El metabolismo de los carbohidratos por parte de las levaduras depende de su disponibilidad en el sustrato y de las condiciones donde se desarrolle, siendo un factor limitante la disponibilidad de oxígeno. Así, en presencia de oxígeno, las levaduras llevarán a cabo la respiración, proceso que ocurre en las mitocondrias con un elevado rendimiento energético. En cambio, en condiciones limitantes de oxígeno, las levaduras desarrollan fermentaciones cuyo rendimiento energético es menor que el desarrollado en la respiración (Fugelsang & Edwards, 2007; Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

En el caso del mosto, aún en presencia de oxígeno, *Saccharomyces* solo puede fermentar los azúcares, debido a que la concentración de azúcar es mayor a 9 g/L, lo que produce una

represión catabólica por la glucosa o efecto Crabtree. En este caso, la mitocondria se degenera, y en simultáneo, las enzimas del ciclo de Krebs y los constituyentes de la cadena respiratoria son reprimidos (M. Victoria Moreno-Arribas & Polo, 2009; Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

1.5.4- Hidratos de carbono en vinos

Los azúcares que quedan de las uvas en el vino, son en su mayoría glucosa y fructosa, y minoritariamente arabinosa y xilosa. Otorgan a los vinos gusto dulce, aporte que también realizan ciertos alcoholes como el etanol, el glicerol, y el butilenglicol, así como el inositol, el manitol, el xilitol, el arabitol, el eritritol, y el sorbitol (Pellerin & Cabanis, 2003).

1.5.5- Compuestos nitrogenados en vinos

En vinos, la composición nitrogenada se modifica cuali y cuantitativamente respecto de lo encontrado en los mostos. Esto se debe principalmente, a que ha intervenido el metabolismo de las levaduras durante el proceso fermentativo (Waterhouse et al., 2016). Las levaduras consumen selectivamente las fuentes nitrogenadas disponibles y biosintetizan aquellos compuestos necesarios para cumplir funciones metabólicas, pudiendo liberarlos al medio, como se muestra en la Figura 7 (Ough, Z, An & Stevens, 1991). La autólisis de las levaduras cuando alcanzan su fase de muerte, aporta también al medio, aminoácidos que se encuentran intracelularmente o en sus paredes celulares (Babayán & Bezrukov, 1985). Además, en la elaboración de vinos tintos, la maceración es un proceso que podría aportar compuestos nitrogenados presentes en las partes sólidas (hollejos, pulpa, semillas en menor proporción) al vino (Hernández-Orte et al., 1998).

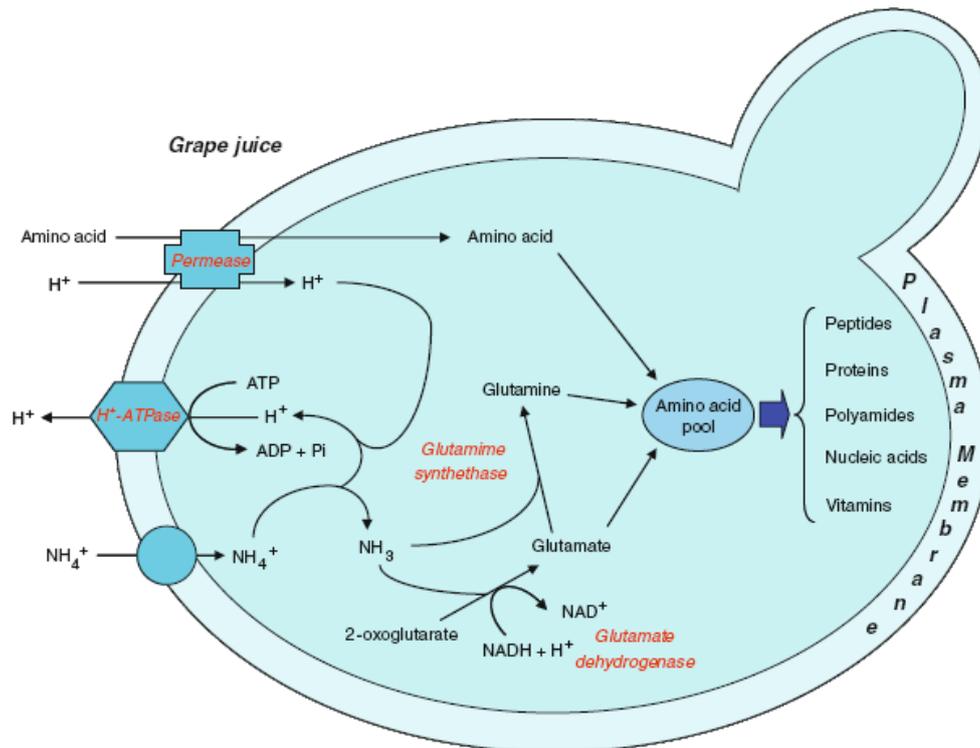


Figura 7: Esquema del metabolismo nitrogenado de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* donde se observa la capacidad de asimilar distintos compuestos nitrogenados y producirlos intracelularmente.

1.6-COMPOSICIÓN VOLÁTIL EN VINOS

Los compuestos químicos del vino son responsables de las diferentes sensaciones olfativas, gustativas, táctiles, y quimioestésicas (Bayonove et al., 2003). Los compuestos volátiles presentes forman el aroma del vino y surgen a partir de diferentes reacciones bioquímicas que ocurren en los procesos tecnológicos y biológicos durante su producción.

Los compuestos volátiles (o aromas) se pueden encontrar en forma libre (odorante) o ligada (no odorante) tanto en la uva, el mosto y el vino. Los compuestos ligados, o precursores de aromas, tienen la capacidad de liberar la aglicona (compuesto volátil) de la glicona, por ruptura de enlaces β -glicosídicos. Estos compuestos se consideran un reservorio aromático para los vinos ya que la liberación de la fracción volátil se dará bajo ciertas condiciones de pH y temperatura durante el proceso de elaboración y conservación de los vinos (Liu, Zhu, Ullah & Tao, 2017; Waterhouse et al., 2016). La composición volátil de los vinos está influenciada por diversos factores involucrados en las diferentes etapas de la cadena productiva. Las condiciones agroclimáticas (temperatura, radiaciones solares, suelo, entre otros), las prácticas culturales (poda, raleo, orientación de hileras, etc), las prácticas

tecnológicas (levaduras y bacterias empleadas, uso de aditivos, maceraciones, etc) y las condiciones de conservación, influirán en el contenido y diversidad de compuestos volátiles que pueden encontrarse en un vino (Flanzy, 2002; Moreno-Arribas & Polo, 2009; Pascal Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Los compuestos volátiles, o aromas, pueden clasificarse según su origen en:

1.6.1- Compuestos volátiles varietales:

Proviene de la uva y los compuestos característicos son: las pirazinas, norisoprenoides, ciertos terpenoides, tioles volátiles, entre otros. Existen ciertos compuestos volátiles que han sido encontrados sólo en algunos cepajes, por tanto, se los considera "marcadores de la variedad". Tal es el caso de las pirazinas en Cabernet sauvignon, que aporta aromas a pimiento, pimienta molida o tierra y algunos compuestos azufrados en Sauvignon blanc con aromas típicos a maracuyá o frutos tropicales (Belancic & Agosin, 2007; Styger, Prior & Bauer, 2011).

1.6.2- Compuestos volátiles prefermentativos:

Se originan por procesos mecánicos ocurridos desde la cosecha hasta el comienzo de la fermentación y están representados por alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos, saturados e insaturados, de 6 a 9 átomos de carbono. La presencia de estos compuestos en los vinos es baja si la madurez de la uva es la adecuada (uvas inmaduras presentan mayores contenidos de estos compuestos) y sus descriptores son netamente herbáceos, relacionados a descriptores como pasto cortado y hojas verdes (Oliveira, Faria, Sá, Barros & Araújo, 2006).

1.6.3- Compuestos volátiles fermentativos:

Se producen como consecuencia del metabolismo de carbohidratos y compuestos nitrogenados por parte de levaduras y bacterias, aunque éstas últimas en mucha menor proporción. Están conformados por alcoholes, ésteres, cetonas, ácidos orgánicos, aldehídos, terpenoides, compuestos azufrados y fenoles volátiles, entre otros. Son los compuestos que se encuentran en mayor concentración en los vinos tintos, mientras que en blancos los terpenoides podrían ser los más abundantes. Aportan a los vinos jóvenes notas frutales frescas o flores, mientras que algunos compuestos están asociados a aromas a alcohol *fusel* o solvente (Flanzy, 2002; Lambrechts & Pretorius, 2000).

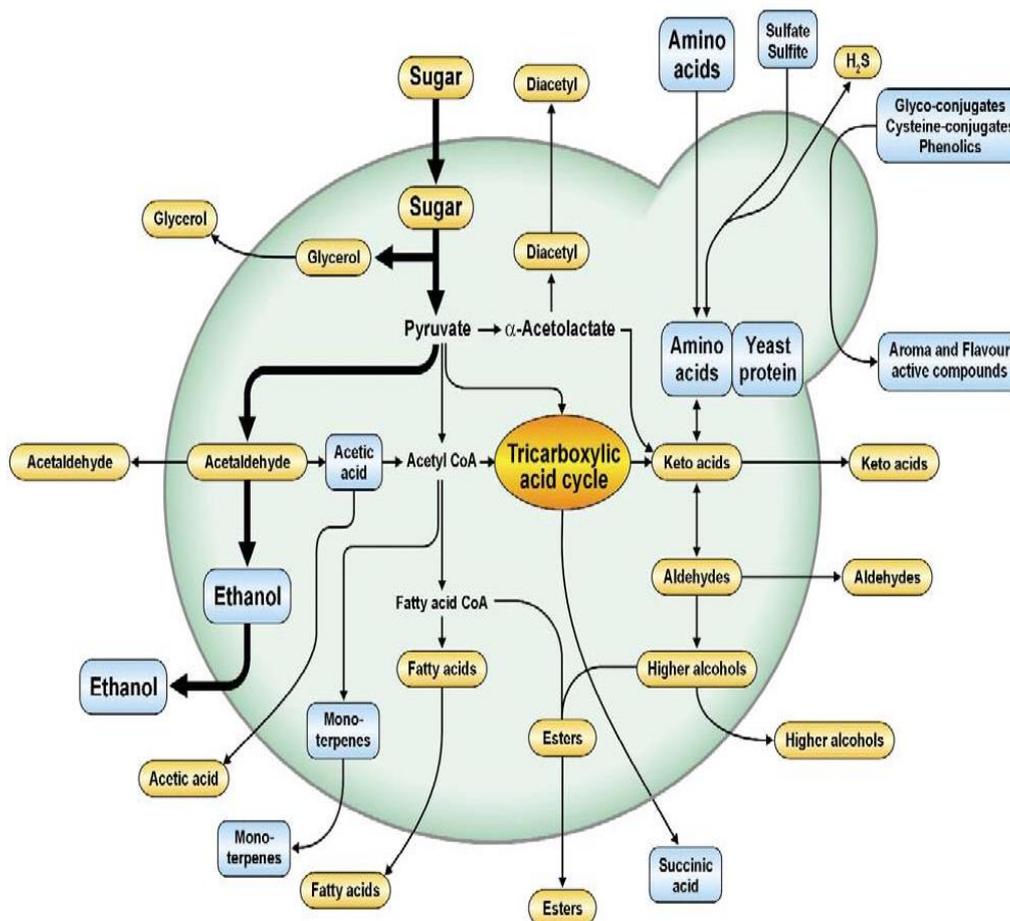


Figura 8: Esquema metabólico simplificado de las levaduras *S. cerevisiae* donde se observa la producción de metabolitos primarios, como el etanol y secundarios, como alcoholes superiores, ésteres, ácidos grasos, monoterpenos, etc.

Fuente: Swiegers, Bartowsky, Henschke & Pretorius (2005)

Los principales aromas fermentativos son:

1.6.3.1. Alcoholes superiores o alcoholes fusel

Estos compuestos se forman durante la fermentación alcohólica desarrollada por las levaduras por dos vías: a) por catabolismo de aminoácidos, por descarboxilación y reducción de los α -cetoácidos obtenidos por transaminación y b) por el anabolismo de los mismos, a partir de los α -cetoácidos obtenidos de los azúcares. Su presencia en vinos depende fuertemente de la disponibilidad de fuentes nitrogenadas que existan en los mostos durante las fermentaciones alcohólicas. Aportan a los vinos notas desagradables a solventes, exceptuando el 2-feniletanol cuyos descriptores olfativos están asociados a las rosas (Hernandez-Orte, Cacho & Ferreira, 2002; Waterhouse et al., 2016).

1.6.3.2. Ácidos grasos y ésteres

Los ácidos grasos de 2 a 10 átomos de carbono pueden encontrarse en forma libre o esterificados formando los ésteres etílicos de ácidos grasos. Por su parte, los alcoholes superiores que se acetilan forman los acetatos de alcoholes superiores. Los ésteres etílicos de ácidos grasos son los responsables del aroma afrutado, exceptuando el acetato de etilo, que no presenta olor desagradable en concentraciones menores a los 100 mg.L⁻¹. Los ácidos grasos en cambio tienen en su mayoría un impacto negativo en el aroma del vino, principalmente los de cadenas cortas. Estos compuestos también se forman como producto del metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica (Bayonove et al., 2003; Waterhouse & Ebeler, 1998).

1.6.3.3. Terpenoides

Las levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* son capaces de biosintetizar pequeñas cantidades de terpenoides durante el desarrollo de las fermentaciones alcohólicas. Por otro lado, la actividad β-glicosidasa y las condiciones de acidez del medio, generarían la hidrólisis de los precursores de aromas liberando aquellos terpenoides que se encuentren glicosilados (Carrau et al., 2005).

1.6.3.4. Compuestos volátiles azufrados

Durante el desarrollo de las fermentaciones, las levaduras pueden metabolizar aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y producir compuestos azufrados de bajo y de alto peso molecular. Los primeros están generalmente asociados a olores desagradables, mientras que los segundos aumentan en complejidad el aroma del vino aportando descriptores a ajo, coliflor o frutas tropicales como el maracuyá (Swiegers & Pretorius, 2007). En general, estos compuestos se encuentran por debajo del umbral de percepción, sin embargo, pueden alcanzar valores indeseados debido a la influencia de la temperatura de fermentación, la cepa de levadura empleada y el nitrógeno asimilable, entre otros (Bayonove et al., 2003).

1.6.4- Aromas de conservación y añejamiento:

Son producidos por reacciones químicas sobre compuestos ya existentes (hidrólisis, ciclaciones) o puede ocurrir la aparición de compuestos nuevos, producto de la hidrólisis de precursores glicosilados. Por otro lado, se incluyen en esta categoría los compuestos volátiles que cede la madera, ya sea de barrica, duelas, chips o polvo (Bayonove et al., 2003; Clarke & Bakker, 2011).

2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1- HIPÓTESIS

El contenido de ión amonio y hexosas de mostos de uvas cv. Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza generan diferentes contenidos de aromas fermentativos en los vinos.

2.2- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia del contenido de ión amonio y las hexosas de mostos de uvas cv. Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza sobre los aromas fermentativos de sus vinos.

2.3- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el contenido de ión amonio, glucosa y fructosa en mostos, mostos en fermentación y vinos Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza.
- Determinar el contenido total de alcoholes, ésteres y terpenoides en vinos cv. Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza.
- Evaluar la relación de compuestos nitrogenados y azúcares reductores sobre la biosíntesis de aromas fermentativos.

3- MATERIALES Y METODOS

3.1- Obtención de mostos y vinos Malbec

Este trabajo fue desarrollado empleando uvas Malbec cosechadas de viñedos homogéneos en vigor, de acuerdo a los parámetros establecidos por Bodegas Esmeralda S.A. (datos no mostrados) que se encuentran en tres zonas vitícolas de Mendoza. Las tres zonas empleadas se diferencian principalmente por la altitud (Tabla 1) y las condiciones climáticas tal como temperaturas mínimas y máximas a lo largo del ciclo vegetativo.

Tabla 1: Características geográficas de las zonas seleccionadas

Localidad	Abreviatura	Departamento	Altitud (m.s.n.m.)	Fecha de cosecha
La Libertad	LLIB	Rivadavia	667	7 de marzo
Agrelo	AGR	Luján de Cuyo	952	13 de marzo
Gualtallary	GU	Tupungato	1483	27 de marzo

Se seleccionaron viñedos homogéneos en vigor, conducidos en espaldero y con un sistema de riego por goteo con regímenes hídricos estándares empleados por la Bodega Esmeralda S.A. Se realizó la cosecha manual de racimos a aproximadamente 25°Brix. Para la cosecha de cada parcela, conformada por una hilera (réplica), se seleccionaron 5 claros al azar y se procedió a la cosecha manual.

Los vinos fueron elaborados según protocolo estándar del Laboratorio de Enología de INTA Mendoza. La uva fue descobajada, molida y 20 kg del mosto resultante fueron encubados en bidones de plástico de grado alimentario. Se inhibieron las fermentaciones alcohólica y láctica espontáneas mediante el agregado de metabisulfito de potasio (100 mg.L^{-1}) y lisozima (25 mg.hL^{-1}). Los mostos fueron homogeneizados e inoculados con 30 g.hL^{-1} de una cepa de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* YSEO Lalvin ICV D254 (Lallemend) y colocados en cámaras de temperatura controlada. A fin de evaluar la influencia de las condiciones agroclimáticas de las distintas zonas sobre la composición química de los mostos y su influencia en la producción de aromas fermentativos en los vinos, los mostos no fueron suplementados con fuentes nitrogenadas.

Se realizó el control de fermentaciones por medición de peso de tanque, densidad y temperatura hasta alcanzar el final de fermentación. Se efectuaron remontajes y bazuqueos previos a la toma de muestras para el control diario y muestras para análisis químicos. Se realizó el ajuste de la acidez total de los vinos obtenidos por adición de ácido tartárico de

uso enológico, hasta alcanzar una concentración final de 7 g.L^{-1} . Se realizó el descube y los vinos fueron colocados en recipientes de vidrio. Las muestras extraídas fueron conservadas a -18°C hasta el momento de su análisis.

3.2- Determinación de parámetros generales en mostos y vinos

Se realizó la evaluación de los parámetros generales como pH, contenido de alcohol, acidez total, azúcares residuales y acidez volátil (Zoecklein, Fugelsang, Gump & Nury, 1999).

3.3- Determinación de glucosa y fructosa por reacción enzimática y espectrofotometría UV-Visible

Los métodos enzimáticos fueron puestos a punto durante el desarrollo de este trabajo, evaluando principalmente la interferencia de compuestos fenólicos en su medición (datos no mostrados).

La glucosa y la fructosa son los principales azúcares reductores que se encuentran en mostos y vinos. El análisis de estas hexosas por método enzimático consiste en un primer paso donde ocurre la fosforilación de la D-glucosa y D-fructosa en presencia de la enzima hexokinasa y adenosina-5-trifosfato (ATP). A partir de dicha reacción se forma adenosina-5-disfosfato (ADP) y glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. Estos compuestos, en presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfoglucosa isomerasa son oxidados en presencia de fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADP) a gluconato6-fosfato y el NADP reducido a NADPH. La cantidad de NADPH formado es estequiométricamente igual al contenido de D-glucosa y D-fructosa y su absorbancia es medida a 340 nm .

3.3.1.- Preparación de la muestra y reactivos

Para la determinación de glucosa y fructosa se procedió de acuerdo a las especificaciones del protocolo de fábrica. Por un lado, se realizó la dilución de la muestra para que la concentración de glucosa y fructosa se encuentre dentro del rango lineal del método. Una vez realizada la dilución se procedió a tratar las muestras con polivinil polipirrolidona (PVPP) para eliminar interferentes (compuestos fenólicos) y se ajustó el pH a 8 con solución de hidróxido de sodio 2N. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas y filtradas en filtro de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ de poro y colocadas en viales de vidrio color caramelo de 2 mL hasta el momento de su análisis.

Por otro lado, los reactivos y soluciones del kit enzimático se prepararon por adición de agua pura calidad MilliQ: para la solución 1 (buffer) se agregó al vial 27 mL de agua pura calidad

MilliQ, para la solución 2 (complejo enzimático) 2,8 mL y para la solución 3 (para análisis de fructosa) 1120 uL de agua.

3.3.2- Procedimiento

1. Encender el espectrofotómetro y seleccionar la longitud de onda de 340 nm. Asegurarse que el equipo se encuentre trabajando en fuente visible. Esperar 10 minutos.
2. En dos cubetas de 1 cm de paso óptico de plástico (volumen reducido) agregar agua bidestilada, secar externamente con papel tissue y colocarlas en las posiciones **S** y **R** del compartimento del espectrofotómetro. Llevar a cero de absorbancia.
3. Tomar 600 uL del mosto y vino diluido y de pH ajustado. Colocar en cubeta plástica de 1 cm de paso óptico y volumen reducido.
4. Adicionar 300 μL de solución 1 del kit enzimático a la cubeta con el blanco (E) y a la cubeta con la muestra de vino (C). Agitar por inversión empleando parafilm. Agitar con agitador orbital durante 10 minutos.
5. Retirar la cubeta con agua de la posición S y colocar la cubeta con E. Repetir lo mismo para la cubeta con C.
6. Leer absorbancia ($\lambda= 340 \text{ nm}$) **A₁**.
7. Adicionar 50 μL de solución 2 (kit) a la cubeta con el blanco (**E**) y a la cubeta con la muestra de vino (C). Agitar por inversión empleando parafilm. Agitador orbital durante 20 minutos.
8. Leer absorbancia ($\lambda= 340 \text{ nm}$) **A₂**.
9. Para la determinación de fructosa adicionar a las cubetas con el blanco (**E**) y la muestra (**C**) 20 uL de solución 3. Agitar por inversión empleando parafilm. Agitar en orbital durante 10 minutos y leer absorbancia **A₃**.
10. Realizar el cálculo de acuerdo a la siguiente ecuación general:

$$C = \frac{V \times PM}{E \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

- $\Delta A_{D\text{-glucosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$
- $\Delta A_{D\text{-fructosa}} = (A_3 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanco}}$

donde V es el volumen final (mL), v es el volumen de muestra (mL), PM es el peso molecular de la glucosa o fructosa ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), d es el paso óptico de la cubeta (cm) y E es el coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm es de $6,3 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.4- Determinación de ión amonio por reacción enzimática y espectrofotometría UV-Visible.

El análisis del ión amonio por método enzimático se basa en que este ión reacciona con 2-oxoglutarato dando L- glutamato, en presencia de glutamato deshidrogenasa (GIDH) y nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), con oxidación del NADH.

La cantidad de NADH oxidado en la reacción anterior, es estequiométrica con la cantidad de amonio, y se mide por medio de su absorbancia a 340 nm.

3.4.1.- Preparación de la muestra y reactivos.

Luego de múltiples pruebas se decidió preparar las muestras, ajustando el pH de las mismas entre 7 y 8 con NaOH 5N y HCl 1N. Posteriormente se decoloraron con carbón activado (30mg de CA en 1,5 ml de muestra) y se ultracentrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos. Después se filtraron, en filtro de $0,45 \mu\text{m}$, debido a que después de la centrifugación la muestra continuaba muy oscura. Por último, se colocaron en viales de vidrio color caramelo, hasta el momento de su análisis.

Por otro lado, los reactivos del kit enzimático se prepararon disolviendo la tableta de la botella 2 con 1ml de solución de la botella 1, las botellas 1 y 3 se utilizaron sin diluir. Todos los reactivos se conservaron refrigerados.

3.4.2- Procedimiento.

Se analizaron las muestras utilizando kit enzimático, de la siguiente manera:

1. En una cubeta de un cm de paso de luz, colocar:

Para el blanco:

- 500 μl de mezcla de reacción 2.
- 1000 μl de agua bidestilada.

Para la muestra:

- 500 μl de mezcla de reacción 2.
- 50 μl de muestra.
- 950 μl de agua bidestilada.

2. Mezclar por inversión con parafilm.

3. Esperar 5 minutos a 20 – 25°C.
4. Leer las absorbancias (A1).
5. Añadir 10 µl de solución 3 (al blanco y a las muestras)
6. Mezclar por inversión con parafilm.
7. Esperar 20 minutos.
8. Leer las absorbancias (A2).
9. Realizar el cálculo de acuerdo a la siguiente ecuación general:

$$C = \frac{V \times PM}{E \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

$$\Delta A_{\text{amonio}} = (A1-A2)_{\text{muestra}} - (A1-A2)_{\text{blanco}}$$

donde V es el volumen final (mL), v es el volumen de muestra (mL), PM es el peso molecular del amonio (g.mol⁻¹), d es el paso óptico de la cubeta (cm) y E es el coeficiente de extinción del NADH a 340 nm es de 6,3 L.mmol⁻¹.cm⁻¹).

3.5- Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA).

Se determinó el contenido de Nitrógeno fácilmente asimilable mediante la sumatoria del contenido de ión amonio y de aminoácidos totales, exceptuando la prolina. Los aminoácidos fueron determinados por derivatización precolumna y Cromatografía Líquida de Alta Resolución según Fabiani (2002) (datos no mostrados).

3.6- Determinación de aromas fermentativos por microextracción en fase sólida y cromatografía gaseosa con detección de masas

Los compuestos volátiles en vinos fueron extraídos y preconcentrados por Microextracción en Fase Sólida en Espacio de Cabeza (siglas en inglés HS-SPME) y la separación y cuantificación se realizó por Cromatografía Gaseosa con Detector de Masas Trampa Iónica (siglas en inglés GC-ITMS). Este método fue validado por el Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales de INTA Mendoza (V.P. Jofré, 2011).

3.6.1- Preparación de muestra

La extracción de los compuestos volátiles se realizó en viales color caramelo de 20 mililitros de capacidad en los cuales se colocó 5 mL de muestra, 10 µL de solución de estándar interno (50 µg/L de anisol), 3g NaCl y 4990 µL de agua purificada Milli-Q (Millipore,

Bedford, MA, USA). Los viales fueron tapados con tapas de aluminio y septas de silicona/PTFE y posteriormente colocados en agitación magnética con control de temperatura.

3.6.2- Extracción y preconcentración

Se realizó el preacondicionamiento de la muestra por 15 minutos a 40°C y 1000 rpm y luego se expuso la fibra de PDMS/DVB en el espacio de cabeza durante 30 minutos para la extracción de los analitos afines a la fibra.

3.6.3- Separación de compuestos volátiles

Se realizó la desorción térmica de dichos compuestos en el puerto de inyección del Cromatógrafo de Gases a 250°C. Se utilizó gas Helio 5.0 como gas carrier y se trabajó en modo split/splitless. La separación de los compuestos se realizó en una columna Factor Four VF5ms (30 m x 0,25 mm). Se trabajó con rampa de temperatura en columna como se muestra a continuación: 50°C (5 min), 100°C (1 min) aumentando la temperatura 1,5°C/min y luego a 3°C/min hasta alcanzar 215°C.

3.6.4- Detección, identificación y cuantificación

La detección de los analitos se realizó en modo Scan, la identificación se realizó a través de la Librería NIST 2.0 y la determinación del Índice de Retención Lineal (IRL) según Van den Dool (Van den Dool & Kratz, 1963) y la cuantificación por método del estándar interno, comparando las áreas de los compuestos de interés con el área y concentración del estándar interno y expresando los resultados en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (V.P. Jofré, 2011).

Los compuestos volátiles obtenidos fueron clasificados de acuerdo a su estructura en las diferentes familias químicas y se procedió a la sumatoria para obtener contenidos totales de alcoholes superiores, ésteres y terpenoides

3.7- Análisis estadístico

Mediante el empleo del software Statgraphics Centurion XVI.I (Copyright 1982-2010 Stat Point Technologies Inc.) se realizó la evaluación estadística de los datos obtenidos empleando un nivel de significancia del 95% mediante Test de Tukey.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1- Parámetros generales en mostos

Las uvas fueron cosechadas en grado de madurez tecnológica (25°Brix) y una vez obtenidos los mostos se determinó el pH y acidez total expresada como gramos de ácido tartárico por litro (Tabla 1). Se observó que el pH de los mostos es menor (acidez mayor) en zonas de mayor altitud (Gualtallary). Este mismo comportamiento fue observado por Barroso et al. (2015) donde se estudiaron características físico-químicas y sensoriales de vinos de altura del noroeste argentino. Durante la madurez de los frutos, después del invierno, se inactiva la glucólisis y se activa la respiración del malato por el ciclo del ácido tricarbónico. Este metabolismo de ácidos orgánicos está influenciado por las temperaturas nocturnas, así, las bajas temperaturas ralentizan este proceso mientras que temperaturas más cálidas lo activan (E.C.Brands, 2017; González et al., 2009; Keller, 2015).

En la Tabla 1 se observa que la relación glucosa/fructosa fue superior a 1 en los tres mostos evaluados, no mostrando diferencias significativas para los mostos de La Libertad y Gualtallary. La relación glucosa/fructosa resultaría un indicador de la calidad de azúcares fermentables que contienen las uvas y mostos. Relaciones glucosa/fructosa próximas o superiores a 1 indicarían que las uvas contienen una proporción adecuada de glucosa respecto de fructosa. Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* muestran un carácter glucofílico, por lo tanto, los mostos con mayores niveles de glucosa respecto de la fructosa asegurarían adecuadas tasas fermentativas (Berthels, Cordero Otero, Bauer, Thevelein & Pretorius, 2004; Cosme, Gonçalves, Ines, Jordão & Vilela, 2016).

La concentración de ión amonio y el nitrógeno fácilmente asimilable mostraron diferencias significativas en los mostos de las tres zonas, observándose un menor contenido de ambos parámetros en los mostos iniciales de Gualtallary. Los menores contenidos de ambos parámetros podrían deberse a las características de los suelos de los viñedos implantados en Gualtallary. Estos suelos estarían erosionados por las lluvias y los vientos, y parte de los componentes serían arrastrados, dejando así suelos calcáreos, rocosos, con un drenaje óptimo pero pobres en nitrógeno (Iglesias, 2015; Rutini wines, 2019; Brand, 2017).

Tabla 1: Parámetros generales en mostos Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza, Argentina.

Parámetros químicos	Zona		
	La Libertad	Agrelo	Gualtallary
pH	3,60 (0,01)c	3,50 (0,02)b	3,36 (0,01)a
Acidez total (g.L ⁻¹)	4,13 (0,01)a	5,62 (0,00)b	6,60 (0,01)c
Relación glucosa/fructosa	1,32 (2,29)b	1,23 (1,77)a	1,32 (4,62)a
Amonio (mg.L ⁻¹)	43,51(0,61)b	74,72(1,11)c	36,03(1,44)a
Nitrógeno fácilmente asimilable (mg.L ⁻¹)	90,80 (0,68)c	85,16 (1,38)b	44,45 (3,78)a

4.2- Evolución de los parámetros generales durante las fermentaciones

Durante el desarrollo de las fermentaciones alcohólicas se observó el descenso del peso de los tanques (Figura 1), lo que evidencia la transformación de los azúcares en alcohol y dióxido de carbono (Flanzy, 2002). Los tanques de Gualtallary mostraron una pérdida de peso hasta el día 12-13, mientras que en La Libertad y Agrelo la estabilidad se alcanza al séptimo día. El mismo comportamiento fue evidenciado con el control de densidad (Figura 2).

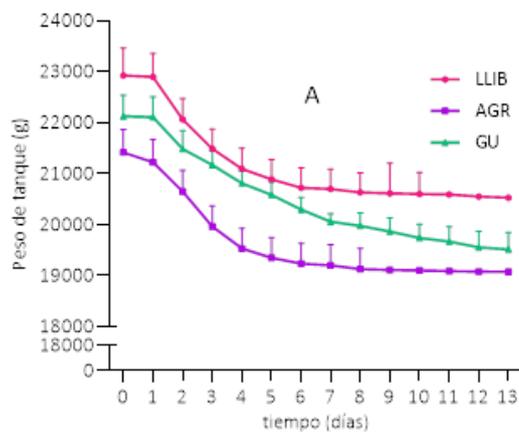


Figura 1: Pérdida de peso de tanque durante el desarrollo de las fermentaciones alcohólicas de mostos Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza.

Zonas: LLIB La Libertad (Rivadavia), AGR Agrelo (Luján de Cuyo), GU Gualtallary (Tupungato).

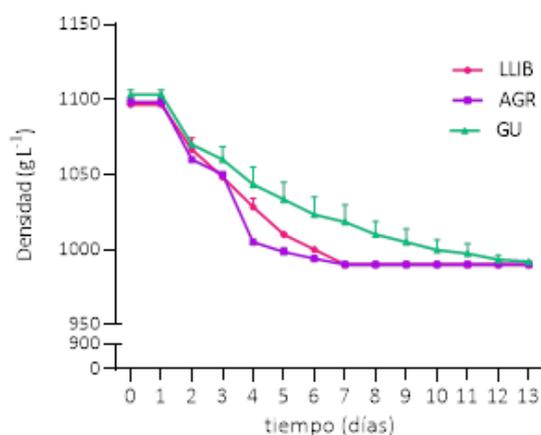


Figura 2: Evolución de la densidad de mostos Malbec durante la fermentación alcohólica.

Zonas: LLIB La Libertad (Rivadavia), AGR Agrelo (Luján de Cuyo), GU Gualtallary (Tupungato).

Esta dinámica fermentativa que transcurre más lentamente en los mostos de uvas provenientes de viñedos de Gualtallary, podría deberse al menor contenido de nitrógeno fácilmente asimilable que mostraron sus mostos en comparación con las zonas restantes, como se muestra en la Tabla 1.

4.3- Evolución del ión amonio, glucosa y fructosa durante las fermentaciones alcohólicas

Durante las primeras 24 horas de inoculadas las levaduras, se produjo el mayor descenso en el contenido de ión amonio. El consumo de ión amonio en los tres mostos evaluados fue aproximadamente del 67% para La Libertad y Gualtallary y del 78% para Agrelo. Los mostos de Agrelo mostraron mayor contenido de ión amonio que las zonas restantes (Tabla 1) y las levaduras *S. cerevisiae* en este mosto lo consumieron más rápidamente. Sin embargo, luego de las 24 horas, el contenido de ión amonio es consumido más rápidamente en los mostos de Gualtallary (Fig.3), donde se presentó el menor contenido inicial de este compuesto nitrogenado. Aunque el consumo de ión amonio en estos mostos fue más rápido, no fue suficiente para finalizar la fermentación alcohólica en 7 días como ocurrió en mostos de La Libertad y Agrelo.

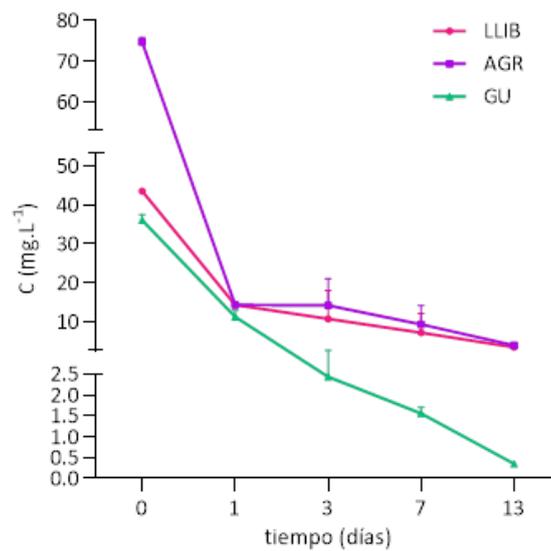


Figura 3: Evolución del ión amonio durante las fermentaciones alcohólicas de mostos cv. Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza.

Zonas: LLIB La Libertad (Rivadavia), AGR Agrelo (Luján de Cuyo), GU Gualtallary (Tupungato).

Los vinos Malbec de Gualtallary mostraron también menor contenido de ión amonio (Tabla 2), aproximadamente un 10% de lo encontrado en los vinos de La Libertad y Agrelo. Estos últimos vinos no mostraron diferencias significativas en el contenido de ión amonio.

Los tres vinos finalizaron la fermentación alcohólica con un bajo contenido de ión amonio (menos de 5 mg.L^{-1}). Esto resulta favorable para evitar la aparición de contaminaciones microbianas que pueden generar la aparición de defectos odorantes en los vinos (fenoles volátiles) (Sturm et al., 2015).

Tabla 2: Parámetros generales en vinos cv. Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza, Argentina.

Parámetros químicos	Zona		
	La Libertad	Agrelo	Gualtally
Azúcares reductores (g.L ⁻¹)	< 1,8	< 1,8	< 1,8
Etanol (% V/V)	13,76(0,15)a	14,13(0,06)b	13,67(0,06)a
pH	3,67 (0,02)a	3,81 (0,03)b	3,64 (0,02)a
Acidez total (g.L ⁻¹)	5,05 (0,23)a	5,13 (0,08)b	5,48 (0,20)ab
Acidez volátil (g.L ⁻¹)	0,46(0,03)a	0,62(0,03)b	0,69(0,02)b
SO ₂ libre (mg.L ⁻¹)	17,73(1,58)b	17,04(0,12)ab	14,67(0,09)a
SO ₂ total (mg.L ⁻¹)	28,05(1,58)a	25,73(0,82)ab	23,45(0,84)a
Glucosa (g.L ⁻¹)	0,18(0,01)b	0,34 (0,02)a	1,60 (0,15)c
Fructosa (g.L ⁻¹)	0,35 (0,01)a	0,33 (0,01)a	0,61 (0,61)b
Amonio (mg.L ⁻¹)	3,49 (0,14)b	3,78 (0,37)b	0,35 (0,03)a

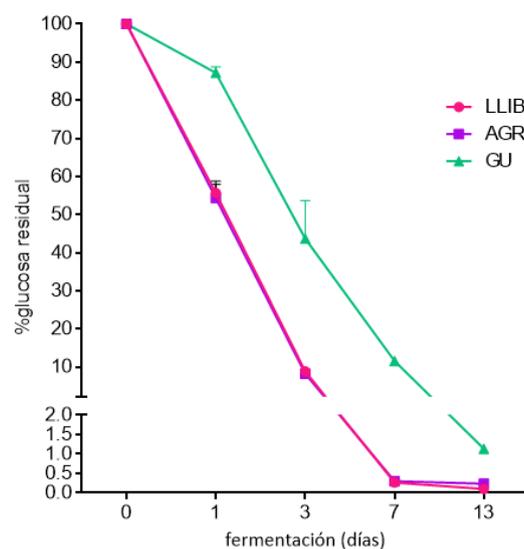


Figura 4: Evolución del contenido porcentual de glucosa residual durante las fermentaciones alcohólicas de mostos cv. Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza.

Zonas: LLIB La Libertad (Rivadavia), AGR Agrelo (Luján de Cuyo), GU Gualtally (Tupungato).

Las levaduras *S. cerevisiae* inoculadas en mostos Malbec de Gualtally consumieron más lentamente la glucosa y los vinos obtenidos mostraron un contenido de glucosa residual superior que los vinos restantes (Fig. 4, Tabla 2). El contenido de fructosa fue consumido

más rápidamente durante los primeros tres días en mostos de La Libertad que en Agrelo y Gualtallary. Sin embargo, luego del tercer día, la fructosa evolucionó de forma similar en La Libertad y Agrelo y finalizan la fermentación con un contenido residual que no mostró diferencias significativas (Tabla 2). Por su parte, los vinos de Gualtallary, al igual que lo observado con el contenido de glucosa residual, presentaron un contenido superior de fructosa que los vinos de las otras zonas.

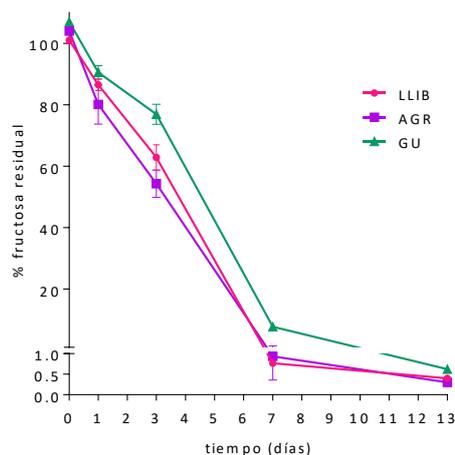


Figura 5: Evolución del contenido porcentual de fructosa residual durante las fermentaciones alcohólicas de mostos Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza.

Zonas: LLIB La Libertad (Rivadavia), AGR Agrelo (Luján de Cuyo), GU Gualtallary (Tupungato).

Por otro lado, el contenido de ión amonio en los vinos fue menor que en sus correspondientes mostos, y las levaduras asimilaron el 99% de este recurso en mostos de Gualtallary, mientras que en La Libertad y Agrelo fue del 92 y 95%, respectivamente (Tabla 1 y 2).

El comportamiento observado en los mostos y vinos de Gualtallary (mayores contenidos residuales de glucosa y fructosa, fermentaciones más lentas) indicaría que el contenido de ión amonio ha sido un factor condicionante en el desarrollo de las fermentaciones alcohólicas.

Palma et al. (2012) estudiaron la influencia del nitrógeno en la capacidad de asimilación de glucosa por parte de la cepa de levaduras *S. cerevisiae* PYCC 4072. Los autores observaron que, al inicio de las fermentaciones, la capacidad de asimilación de glucosa es máxima e independiente del contenido de nitrógeno. Sin embargo, una vez transcurrida esta etapa, la asimilación se vuelve dependiente de la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Esto podría confirmar el comportamiento observado en los mostos de Gualtallary, donde las

levaduras metabolizaron más lentamente los azúcares que en las zonas restantes y finalizaron las fermentaciones 6 días después.

Las levaduras emplean las fuentes nitrogenadas para la síntesis de hexosas permeasas, proteínas que favorecen la incorporación de glucosa en las células (Palma et al., 2012; Reifenberger, Boles & Ciriacy, 1997). Por lo tanto, si la disponibilidad de fuentes nitrogenadas es limitada, la síntesis de estas proteínas transportadoras se vería afectada, como así también la asimilación de azúcares, más teniendo en cuenta el carácter glucofílico que posee *S. cerevisiae* (Tronchoni, Gamero, Arroyo-López, Barrio & Querol, 2009).

4.4- Relación entre los compuestos nitrogenados y hexosas en mostos Malbec y los compuestos volátiles en vinos

Los compuestos volátiles o aromas fermentativos determinados en vinos por Cromatografía Gaseosa (ver Materiales y Métodos, apartado 3.6), fueron agrupados como alcoholes superiores, ésteres y terpenoides, como se observa en la Fig. 6:

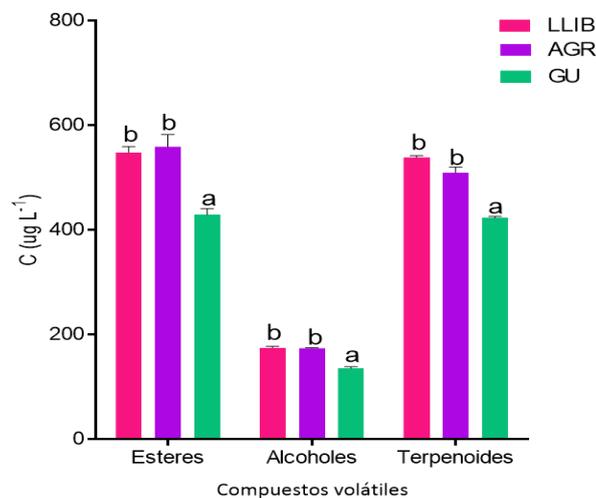


Figura 6: Concentración en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de los compuestos volátiles fermentativos (ésteres totales, alcoholes superiores totales y terpenoides totales) de vinos cv. Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza.

Zonas: LLIB La Libertad (Rivadavia), AGR Agrelo (Luján de Cuyo), GU Gualtallary (Tupungato).

Al evaluar los resultados obtenidos a partir del análisis de hexosas e ión amonio en mostos y el contenido de compuestos volátiles fermentativos totales en vinos se observó que:

- a- Los mostos iniciales de Gualtallary mostraron menor contenido de ión amonio (Tabla 1), no mostraron diferencias significativas en el contenido de glucosa respecto de los mostos restantes (en promedio de 142 g.L⁻¹) y sus vinos mostraron un menor contenido de ésteres totales, alcoholes y terpenoides totales.
- b- Los mostos iniciales de La Libertad y Agrelo mostraron diferencias significativas en el contenido de ión amonio (Tabla 1), no mostraron diferencias significativas en el contenido de glucosa y sus vinos no mostraron diferencias significativas en el contenido de ésteres, alcoholes superiores y terpenoides totales. Esto podría deberse a que las levaduras *S. cerevisiae* que desarrollaron las fermentaciones alcohólicas en los mostos de ambas zonas mostraron una dinámica fermentativa similar y el NFA fue similar en ambos mostos (Fig. 1,2 y 4).

4.4.1. Alcoholes superiores

El contenido de alcoholes superiores fue inferior en los vinos de Gualtallary, cuyos mostos iniciales mostraron menor contenido de nitrógeno fácilmente asimilable que las zonas restantes (Tabla 1). Diversos autores han demostrado que cuando el nitrógeno disponible se incrementa hasta alcanzar los 200 mg.L⁻¹, el contenido de alcoholes superiores aumenta y cuando se supera ese umbral, el contenido disminuye (Mouret et al., 2014; Vilanova et al., 2007). Los tres mostos evaluados no superaron ese umbral, por lo tanto, los resultados son consistentes con lo observado por estos autores.

El menor contenido de alcoholes superiores en Gualtallary ocurriría presumiblemente por dos causas:

- a- Por un lado, el menor contenido de ión amonio afecta la asimilación de la glucosa y esta hexosa es precursora de los α -cetoácidos, los cuales posteriormente serán transformados a aldehídos por descarboxilación y finalmente reducidos a alcoholes superiores (Carrau et al., 2008; Styger, 2011).
- b- Por otro lado, el ión amonio es empleado por las levaduras para la biosíntesis de nuevos aminoácidos, los cuales también pueden ser biotransformados en alcoholes, por lo tanto, a menor contenido de ión amonio, menor disponibilidad de nuevos precursores de alcoholes superiores.

Los alcoholes superiores otorgan a los vinos olores desagradables a solventes, exceptuando el 2-feniletanol, que aporta notas a rosas. Es por ello fundamental asegurar un adecuado contenido de compuestos nitrogenados en los mostos para evitar la aparición de aromas desagradables en los vinos (Flanzy, 2002). El contenido de hexosas no demostró tener influencia directa en la biosíntesis de alcoholes superiores, pero sí indirecta debido a que la asimilación de azúcares por parte de las levaduras está condicionada por la disponibilidad de fuentes nitrogenadas en los mostos (Palma et al., 2012) y por ser precursores de los α -cetoácidos.

4.4.2. Esteres

Existen diferentes tipos de ésteres en los vinos que provienen, principalmente de la actividad metabólica de las levaduras (Díaz-Maroto, Schneider & Baumes, 2005). Los ésteres totales están conformados por ésteres etílicos de ácidos grasos, acetatos de alcoholes superiores y en menor medida por ésteres de alcoholes superiores. Estos compuestos volátiles aportan a los vinos notas frutales y florales características de los vinos jóvenes (Swiegers et al., 2005).

El contenido total de ésteres en vinos de La Libertad y Agrelo no mostró diferencias significativas y fue un 23% superior que en los vinos de Gualtallary. Esto podría deberse a que la biosíntesis de ésteres está influenciada por la disponibilidad de fuentes nitrogenadas de fácil asimilación en los mostos, como lo son el ión amonio y los aminoácidos fácilmente asimilables (Vilanova et al., 2007). Así, la menor disponibilidad de ión amonio para las fermentaciones en los mostos de Gualtallary generaría una menor biosíntesis de ésteres, como puede observarse en la Fig. 6.

Una mayor biosíntesis de ésteres respecto de los alcoholes superiores sería favorable para el perfil sensorial de los vinos, teniendo en cuenta que los ésteres aportan, en general, notas frutales y florales. Por su parte, un elevado contenido de alcoholes superiores, exceptuando las notas a rosas generadas por el 2-feniletanol, producirían aromas no deseados en los vinos.

4.4.3. Terpenoides

Los terpenoides en los vinos de La Libertad y Agrelo no mostraron diferencias significativas, mientras que en Gualtallary su contenido fue un 20% inferior. Los terpenoides pueden encontrarse en forma libre y glicosidada en los vinos y provenir de la fruta, principalmente, aunque ha sido demostrado que las levaduras son capaces de biosintetizar algunos terpenoides (Bayonove et al., 2003; Fischer, Meyer, Claudel, Bergdoll & Karst, 2011).

El menor contenido de terpenoides libres en Gualtallary podría ocurrir debido a que en las zonas de mayor altitud los metabolitos de la planta pueden ser glicosidados en mayor medida, como fue observado por Jofré et al. (2006). Los autores demostraron que en los vinos provenientes de viñedos implantados en zonas de mayor altitud, el contenido de glicósidos de compuestos volátiles fue superior que en zonas más bajas. Estos compuestos glicosidados pueden hidrolizarse dependiendo de las condiciones de pH y temperatura durante el desarrollo de las fermentaciones. Aquellos compuestos que no son hidrolizados durante esta etapa podrían hacerlo durante la conservación de los vinos (Loscos, Hernandez-Orte, Cacho & Ferreira, 2007; Parker, Capone, Francis & Herderich, 2018).

5- CONCLUSIONES

De acuerdo a la hipótesis propuesta: "El contenido de ión amonio y hexosas de mostos de uvas cv. Malbec de tres zonas vitícolas de Mendoza generan diferentes contenidos de aromas fermentativo", se observó que:

- Los mostos Malbec provenientes de viñedos implantados en Gualtallary (Tupungato, 1483 msnm), zona de mayor altitud evaluada, mostraron menor contenido de ión amonio y nitrógeno fácilmente asimilable. El menor contenido de esta fuente nitrogenada podría deberse a las características de sus suelos (más pedregosos y con escasa materia orgánica que en Agrelo y La Libertad).
- Las fermentaciones alcohólicas desarrolladas por las levaduras *S. cerevisiae* en mostos Malbec de Gualtallary evolucionaron más lentamente, por lo que los vinos se obtuvieron en 13 días, mientras que con mostos Malbec de La Libertad y Agrelo fue en 7 días.
- El contenido de alcoholes superiores, ésteres y terpenoides totales no mostró diferencias significativas en los vinos de uvas Malbec provenientes de La Libertad y Agrelo. Esto podría deberse a que las levaduras *S. cerevisiae* que desarrollaron las fermentaciones alcohólicas en los mostos de ambas zonas mostraron una dinámica fermentativa similar y el NFA fue similar en ambos mostos.
- El contenido de alcoholes superiores, ésteres y terpenoides fue inferior en los vinos de uvas Malbec provenientes de Gualtallary, zona de mayor altitud. Esto podría deberse a la menor disponibilidad en los mostos de ión amonio y nitrógeno fácilmente asimilable.

- El contenido de terpenoides totales fue inferior en vinos de uvas Malbec provenientes de Gualtallary. Este menor contenido podría deberse a que bajos contenidos de ión amonio que afectarían la asimilación de azúcares, precursores biosintéticos de los terpenoides. Además el menor contenido de terpenoides libres en Gualtallary podría ocurrir, debido a que en las zonas de mayor altitud los metabolitos de la planta pueden ser glicosidados en mayor medida.
- Se observó que la concentración de hexosas no mostró diferencias significativas en los mostos, por lo que no tuvo influencia directa en las diferencias observadas en los compuestos volátiles fermentativos.

6- PRESENTACION EN CONGRESO

XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 18 al 20 de Setiembre de 2017. Bucolo, M.A., Jofré, V., Assof, M. Influencia del origen geográfico sobre los aromas fermentativos de vinos cv. Malbec: el rol del amonio y ciertas hexosas en su biosíntesis. Póster.

7- AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

El desarrollo de este trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria mediante el Proyecto Específico PNAIyAV 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios” y Proyecto Regional con Enfoque Territorial-Oasis Norte (PRET-ON).

8- BIBLIOGRAFIA

- Babayan, T. L., & Bezrukov, M. G. (1985). Autolysis in yeasts. *Acta Biotechnologica*, 5(2), 129–136. <https://doi.org/10.1002/abio.370050205>
- Barroso, R., Carbajal, H., Ortiz, H., Malaniuk, M., Quenol, H., & Murgo, M. (2015). Vinos de altura del noroeste argentino.
- Bayonove, C., Baumes, R., Crouzet, J., & Gunata, Z. (2003). Aromas. In *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos* (Vol. 6, pp. 218–227). Madrid: S.A. Mundi-Prensa Libros. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=1670%0Ahttp://books.google.es/books/about/Enología.html?id=Zv36fLGFMBAC&pgis=1>
- Belancic, A., & Agosin, E. (2007). AROMAS VARIETALES : Influencia de ciertas prácticas vitícolas y enológicas, (May 2014), 1–21. Retrieved from www.centroaromas.cl
- Berli, F. J., Fanzone, M., Piccoli, P., & Bottini, R. (2011). Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of vitis vinifera L. Increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4874–4884. <https://doi.org/10.1021/jf200040z>
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., & Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.02.005>
- Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., ... Henschke, P. A. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.050>
- Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. A., & Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1196–1207.

<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>

Casassa, L. F., & Sari, S. E. (2015). Sensory and chemical effects of two alternatives of prefermentative cold soak in Malbec wines during winemaking and bottle ageing. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 1044–1055. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12572>

Catania, C., & Avagnina, S. (2010). *Interpretación sensorial del vino*. (C. Catania & S. Avagnina, Eds.). Mendoza, Argentina: Editorial Caviar Bleu.

Clarke, R. J., & Bakker, J. (2011). *Wine Flavour Chemistry. Wine Flavour Chemistry, Second Edition*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/9781444346022>

Cosme, F., Gonçalves, B., Ines, A., Jordão, A. M., & Vilela, A. (2016). Grape and Wine Metabolites: Biotechnological Approaches to Improve Wine Quality. In A. Morata & I. Loira (Eds.), *Grape and Wine Biotechnology* (Vol. 2, p. 64). InTech.
<https://doi.org/10.5772/64822>

COVIAR. (2001). Plan Estratégico Argentina Vitivinícola 2020 (PEVI 2020). Retrieved from <http://coviar.com.ar/2018/wp-content/uploads/2018/03/Plan-Estrategico-Vitivinicola-PEVI.pdf>

De Rosas, I., Ponce, M. T., Malovini, E., Deis, L., Cavagnaro, B., & Cavagnaro, P. (2017). Loss of anthocyanins and modification of the anthocyanin profiles in grape berries of Malbec and Bonarda grown under high temperature conditions. *Plant Science*, 258, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.01.015>

Díaz-Maroto, M. C., Schneider, R., & Baumes, R. (2005). Formation pathways of ethyl esters of branched short-chain fatty acids during wine aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3503–3509.
<https://doi.org/10.1021/jf048157o>

E.C.Brands. (2017). La altura del suelo o la calidad de la luz: claves para obtener el mejor vino. Retrieved from https://www.vanitatis.elconfidencial.com/gastronomia/vinos/2017-05-09/ramon-bilbao-vinos-de-altura_1378658/

- Fabiani, A., Versari, A., Parpinello, G. P., Castellari, M., & Galassi, S. (2002). High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Free Amino Acids in Fruit Juices Using Derivatization with 9-Fluorenylmethyl-Chloroformate. *Journal of Chromatographic Science*, (January 2002), 14–18.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/40.1.14>
- Fanzone, M. L. (2012). *Martin Leandro Fanzone Sánchez*. Universitat Rovira I Virgili.
- Fanzone, M., Peña-Neira, A., Jofré, V., Assof, M., & Zamora, F. (2010). Phenolic Characterization of Malbec Wines from Mendoza Province (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2388–2397.
<https://doi.org/10.1021/jf903690v>
- Fermentadas, B. (1998). Capítulo XIII. In *Código Alimentario Argentino* (pp. 1–28). Buenos Aires, Argentina: ANMAT. Retrieved from http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_XIII.pdf
- Fischer, M. J. C., Meyer, S., Claudel, P., Bergdoll, M., & Karst, F. (2011). Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), 1883–1892. <https://doi.org/10.1002/bit.23129>
- Flanzy, C. (2002). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid: Editorial Mundi Prensa.
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). *Wine Microbiology*. (K. C. Fugelsang & C. G. Edwards, Eds.), *Microbiology*. Boston, MA: Springer US.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-33349-6>
- Girini, L. (2014). *La Revolución Vitivinícola en Mendoza, 1885-1910. Las transformaciones en el territorio, el paisaje y la arquitectura*. Mendoza: Mendoza Idearium, Fondo de Cultura de Mendoza.
- Goldin, C. (2004). *Secretos del Malbec argentino*. Buenos Aires, Argentina: Carlos Goldin.
- González, G., Nazralla, J., Beltrán, M., Navarro, A., de Borbón, L., Senatra, L., ... Alberto, M. (2009). Caracterización de uvas para vinificar en diferentes regiones

- de Mendoza. *Rev. FCA UNCuyo*, *XLI*(1), 165–175. Retrieved from http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/3145/nazralaagrarias41-1.pdf
- Hernandez-Orte, P., Cacho, J. F., & Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 2891–2899. <https://doi.org/10.1021/jf011395o>
- Hernández-Orte, P., Guitart, A., Ferreira, V., Gracia, J., Cacho, J. F., Hernandez-Orte, P., ... Cacho, J. F. (1998). Effect of maceration time and the addition of enzymes on the amino acid composition of musts and wines and its influence on wine aroma. *Food Science and Technology International*, *4*(6), 407–418. <https://doi.org/10.1177/108201329800400605>
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. (1959). Ley General De Vinos. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Vitivinicultura. Retrieved from http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/legislacion/Ley14878.pdf
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2018a). Estadísticas varias de vinos y mostos 2017. Mendoza: Instituto Nacional de Vitivinicultura. Retrieved from http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2017/ESTADISTICAS_VARIAS_2017.pdf
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2018b). Mercado externo de productos vitivinícolas 2017. Mendoza: Instituto Nacional de Vitivinicultura. Retrieved from http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/Anuario_2017.pdf
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2018c). Mercado Interno 2017. Mendoza: Instituto Nacional de Vitivinicultura. Retrieved from http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2017/MERCADO_INTERNO_AÑO_2017.pdf
- Jofré, V.P. (2011). *Determinación de compuestos azufrados en uvas y vinos (Mendoza, Argentina) mediante Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas, y Electroforesis Capilar asociado a metodologías analíticas de extracción y preconcentración.* Universidad Nacional de San Luis.

- Jofré, Viviana Patricia, Fanzone, M. L., Assof, M. V., & Rivera, M. (2006). Evolución de precursores de aromas durante la maduración de uvas Cabernet sauvignon. *Enología*, 12, 55–57.
- Keller, M. (2015). *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology* (2nd ed.). San Diego, United States: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-06797-7>
- Lacoste, P. (2013). *Vinos de capa y espada*. (P. Lacoste, Ed.). Mendoza: Editorial Antucura.
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(Special Issue), 97–129.
- Lanzarini, J. L., & Mangione, J. (2015). La cultura de la Vid y el Vino: In S. Carbonari (Ed.), *Historia de la Vid y el Vino* (p. 40). Mendoza: Fondo Vitivinícola Mendoza. Retrieved from http://www.fondovitivinicola.com.ar/upload_file/266e319c3a57b00b940e76dfc961f2e2.pdf
- Liu, J., Zhu, X.-L., Ullah, N., & Tao, Y.-S. (2017). Aroma Glycosides in Grapes and Wine. *Journal of Food Science*, 82(2), 248–259. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13598>
- Loscos, N., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6674–6684. <https://doi.org/10.1021/jf0702343>
- Loulakakis, K. A., Morot-Gaudry, J. F., Velanis, C. N., Skopelitis, D. S., Moschou, P. N., Hirel, B., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2009). Advancements in nitrogen metabolism in grapevine. In *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology: Second Edition* (pp. 161–205). https://doi.org/10.1007/978-90-481-2305-6_7
- Magasanik, B., & Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00558-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00558-9)

- Mas, A., Guillamon, J. M. J. M., Torija, M. J. M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B. A. B., Troncoso, A. M. A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. C. (2014). Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *BioMed Research International*, 2014, 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2014/898045>
- Moreno-Arribas, M. Victoria, & Polo, M. C. (2009). Wine chemistry and biochemistry. *Wine Chemistry and Biochemistry*, 1–735. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
- Mouret, J. R., Perez, M., Angenieux, M., Nicolle, P., Farines, V., & Sablayrolles, J. M. (2014). Online-Based Kinetic Analysis of Higher Alcohol and Ester Synthesis During Winemaking Fermentations. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1235–1245. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1089-5>
- Oliveira, J. M., Faria, M., Sá, F., Barros, F., & Araújo, I. M. (2006). C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 563, pp. 300–309). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.029>
- Ough, C. S., Z, H., An, D., & Stevens, D. (1991). Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and reabsorption. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(1), 26–40.
- Palma, M., Madeira, S. C., Mendes-Ferreira, A., & Sá-Correia, I. (2012). Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Microbial Cell Factories*, 11(99), 2–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-99>
- Pandolfi, C., & Cuello, I. (2003). Reseña de la vitivinicultura argentina. Retrieved December 2, 2017, from http://www.acenologia.com/ciencia69_03.htm#zonas
- Parker, M., Capone, D. L., Francis, I. L., & Herderich, M. J. (2018). Aroma Precursors in Grapes and Wine: Flavor Release during Wine Production and Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(10), 2281–2286.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05255>

- Pellerin, P., & Cabanis, J. C. (2003). Los glúcidos. In *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos* (pp. 66–96). Madrid: AMV Ediciones.
- Reifenberger, E., Boles, E., & Ciriacy, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry*, *245*(2), 324–333. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00324.x>
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine. Handbook of Enology* (Second, Vol. 2). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470010398>
- Ribéreau-Gayon, Pascal, Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2005). *Handbook of Enology*. (P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Doneche & A. Lonvaud, Eds.) (2nd ed., Vol. 1). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470010363>
- Ribéreau-Gayon Pascal, Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinification*. (R.-G. Pasca, D. Dubourdieu, B. Donèche & A. Lonvaud, Eds.) (2nd ed., Vol. 1). West Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Sturm, M. E. E., Assof, M., Fanzone, M., Martinez, C., Ganga, M. A. A., Jofré, V., ... Combina, M. (2015). Relation between coumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activity with regard to the production of volatile phenols by native *Dekkera bruxellensis* strains under “wine-like” conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *206*, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.023>
- Styger, G. (2011). *Elucidating the metabolic pathways responsible for higher alcohol production in Saccharomyces cerevisiae*. Stellenbosch University.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- 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*(2), 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>

Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0828-1>

Terrier, N., Poncet-Legrand, C., & Cheyner, V. (2009). Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonol. In M.V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 463–496). Springer Science+Business Media, LLC. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>

Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., & Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *134*(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.004>

Urrutia, M. (2015). *Economía de bebidas alcohólicas en Argentina*. Universidad Torcuato di Tella.

Vallone, R. (2007). Nutrición y riego : Los suelos de Mendoza. *Area Del Vino*. Retrieved from <http://www.aredelvino.com/articulo.php?num=8160>

Van den Dool, H., & Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, (3), 463–471.

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(1), 145–157. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1145-z>

Waterhouse, A. L., & Ebeler, S. E. (1998). *Chemistry of Wine flavor*. ACS Symposium Series. Washington D.C.: ACS. <https://doi.org/10.1002/j.2326->

1951.1964.tb00791.x

Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

<https://doi.org/10.1002/9781118730720>

Wines of Argentina. (2011). Mendoza: la tierra del Sol y el Vino. Retrieved from <http://www.winesofargentina.org/es/argentina/regiones/cuyo/mendoza>

Wines of Argentina. (2013). Mendoza, Capital Mundial del Vino. Retrieved from <http://www.winesofargentina.org/es/noticias/ver/2013/08/01/mendoza-capital-mundial-del-vino/>

Zamora, F. (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. *Wine Chemistry and Biochemistry*, 3–22. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>

Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B., & Nury, F. (1999). *Wine analysis and production*. Fresno, United States: Springer Science+Business Media, LLC.