UNCUYO
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Tesis para optar al grado de Licenciatura en Bromatología

EFECTO COMBINADO DE CEPA DE LEVADURA Y *TERROIR* EN VINOS MALBEC DE MENDOZA

Tesista: Carolina del Valle Capaldi

Directora: Mg. Lic. María Dolores Pérez

Codirectora: Dra. Laura Analía Mercado

Estación Experimental Agropecuaria Mendoza – INTA. San Martín 3853 (5507) Luján de cuyo.

Mendoza, 2019

Tema:

"Efecto combinado de cepa de levadura y *Terroir* en vinos Malbec de Mendoza"

Autor:
Carolina del Valle Capaldi
DNI: 38.472.994 – Legajo: 2389
Teléfono: 261-3849274
Mail: capaldicarolina@gmail.com

Directora de Tesis:
Mg. Lic. María Dolores Pérez
perez.mariad@inta.gob.ar

Codirectora de Tesis:
Dra. Laura Analía Mercado
mercado.laura@inta.gob.ar

Tribunal Evaluador de Tesis:
Presidente:
Msc. Ing. Agrónomo Jorge NAZRALA
Vocales:
Lic. Liliana ALBORNOZ
Lic. Claudia MORELLI
Suplente:
Msc. Ing. Agrónomo Hugo GALIOTTI

Lugar:
Centro de Estudios Enológicos de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza – INTA
San Martín 3853 (5507)
Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina
TE: +54 4963320

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser mi guía y acompañante en mi vida y en esta gran etapa que ya finalizo.

A mis papás, Dante y Nancy, por ser mis pilares, acompañarme, incentivarme, apoyarme y confiar en mí en todo momento.

A mi querida Nonita, por ser parte de mi vida y de toda mi etapa facultativa.

A mis hermanos Yésica, Nelson, Damián y a mis primos-hermanos, por ser mis primeros ejemplos de lo que vale el esfuerzo y la dedicación en el estudio, por acompañarme e incentivarme siempre.

A mis amados sobrinos, que fueron mis “grandes” acompañantes en mis largos días de estudio, por sacarme una sonrisa siempre y por brindarme su amor tierno y sincero tan alentador.

A mis tíos, y toda mi gran familia que tanto quiero, que siempre estuvieron conmigo en toda esta etapa, incentivándome a lograr cada meta y que sin ellos todo hubiese sido más difícil.

A Franco, por su acompañamiento incansable y por motivarme día a día.

A mis amigas y compañeras de estudio desde el comienzo de la carrera, Gabi, Anita y Noe, con las que compartí días enteros de estudio, mates, resúmenes, estrés, exámenes y con las que tengo el agrado de finalizar la carrera, gracias inmensamente, las adoro.

A todos mis compañeros de la facu con los que pude compartir hermosos momentos.

A mis amigas y amigos de siempre, de toda la vida, por ser parte de esta etapa y brindarme su apoyo.

A Dolo, mi directora de tesis, por su incansable ayuda, por enseñarme en todo momento, responder todas mis dudas, guiarme con la redacción de esta tesis, aconsejarme y por confiar en mí para este trabajo.

A Laura, por su cálida compañía y su gran conocimiento, por su sencillez y por responder siempre a mis dudas, ayudarme y confiar en mí.

Al equipo de la bodega experimental del INTA, a Santiago por ayudarme con su gran conocimiento, y al equipo del laboratorio de microbiología, por brindarme el espacio, aconsejarme, ser parte de mi trabajo ahí y enseñarme en todo momento.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y a los profesores, que fueron parte de esta gran etapa y de mi crecimiento académico.

¡¡Muchas gracias!!

RESUMEN

Existe una relación entre un determinado vino y una zona específica de producción del mismo, la cual le provee características y atributos únicos, permitiendo la obtención de vinos diferentes, tanto en su composición química como en sus características organolépticas. Del mismo modo, la cepa de levadura utilizada en la fermentación del mosto produce atributos distintivos en los vinos como resultado de su actividad metabólica incluyendo diferencias en la producción de metabolitos secundarios. En el presente trabajo se evaluó el efecto de cepas de levaduras comerciales (EC1118, Tango Malbec, Flavia e Ionys) e indígenas sobre vinos de la variedad Malbec provenientes de tres zonas diferentes (Ugarteche, Gualtallary y El Cepillo) de la provincia de Mendoza-Argentina, con motivo de contribuir al conocimiento de este emblemático cultivar del país. Se caracterizaron inicialmente los mostos provenientes de las diferentes zonas y luego se determinaron los perfiles fermentativos, controles de implantación, parámetros físico-químicos y cromáticos generales y análisis sensorial de los vinos. Se aplicó ANAVA de dos vías con test LSD Fisher sobre los parámetros y se realizó un Análisis de Componentes Principales. Las levaduras comerciales se implantaron en un 100%, mientras que los perfiles moleculares de las levaduras presentes en las fermentaciones espontáneas fueron diferentes entre sí. El factor región, evidenció un importante efecto, destacándose los vinos de Gualtallary por sus mayores niveles en alcohol, intensidad colorante, IPT y antocianos totales. El factor levadura reveló efectos significativos respecto a la levadura Ionys, la cual finalizó la fermentación dos días después que el resto de las levaduras y en sus vinos produjo una reducción de 0,5% grados alcohólicos y 0,2 unidades de pH, en todas las zonas.

Palabras Clave: Malbec, levadura, *terroir,* polifenoles

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS……. III
RESUMEN ……... IV
ÍNDICE……... V

1. INTRODUCCIÓN ……..... 1
1.1 La variedad Malbec (*Vitis vinífera L.)* ……. 1
1.2 Los compuestos fenólicos …… 2
1.2.1 Factores que afectan la composición de los compuestos fenólicos en la uva …….. 3
1.3 Regiones vitivinícolas de Mendoza ……... 4
1.4 Fermentación Alcohólica y Fermentación Maloláctica …… 6
1.5 Evolución de antocianos y flavanoles durante la vinificación……. 9
1.6 Factores y procesos que influyen en la composición fenólica del vino durante la vinificación …… 10
1.6.1 Efecto del pH ..…… 10
1.6.2 Copigmentación……..……..... 11
1.6.3 Cepa de levadura……..…….. 12
1.7 El aroma del vino ……. 12
1.8 Hipótesis y Objetivos……..... 13
1.8.1 Hipótesis …….. 13
1.8.2 Objetivos ……..…… 13
1.8.2.1 Objetivo general ……..……. 13
1.8.2.2 Objetivos específicos ..……... 13
2. MATERIALES Y MÉTODOS ……..…... 14
2.1 Materia prima ……..…….. 14
2.2 Microorganismos ……..…… 15
2.3 Protocolo de vinificación……. 17
2.3.1 Obtención del mosto …….. 17
2.3.2 Diseño experimental …….. 18
2.3.3 Protocolo de la fermentación alcohólica: seguimiento y control microbiológico…… 18
2.3.4 Fermentación maloláctica, estabilización por frío y fraccionamiento….. 19
2.4 Determinaciones analíticas…… 20
2.4.1 Análisis físico-químicos…….. 20
2.4.1.1 Índice de polifenoles totales……... 20
2.4.1.2 Antocianos totales ……... 20
2.4.1.3 Intensidad colorante ……... 21
2.4.2 Análisis microbiológicos …… 22
2.4.3 Análisis sensorial …… 22
2.5 Tratamiento de datos y análisis estadístico …… 23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN …… 23
3.1 Datos iniciales de los mostos …… 23
3.1.1 Análisis físico-químicos …… 23
3.1.2 Análisis microbiológicos …… 24
3.2 Desarrollo de las Fermentaciones …… 25
3.2.1 Cinética de la fermentación alcohólica …… 25
3.2.2 Control de implantación ……..... 27
3.2.3 Fermentación Maloláctica …… 29
3.3 Análisis finales en vinos …… 29
3.3.1 Análisis físico-químicos …… 29

3.3.2 Análisis Sensorial ……... 36
3.3.3 Análisis de componentes principales …….. 38
4.CONCLUSIONES …… 39
5. BIBLIOGRAFÍA ……... 40
6. ANEXOS …….. 44

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La variedad Malbec (*Vitis vinifera L.)*

El cultivar Malbec *(Vitis vinífera L.)* es originario de la región de Burdeos (suroeste de Francia), específicamente de Cahors donde es conocida con el nombre de "Cot o Auxerois". Se caracteriza por su hoja poco plegada, mediana, orbicular y cuneiforme, enteras y trilobadas (dimorfismo), el racimo es mediano, lleno, con bayas negro-azuladas, medianas y redondas (INV, 2019a) (Figura 1).

Figura 1: Racimo y hoja característica de la variedad Malbec. Fuente: INVa, 2019

Dicho cultivar es considerado la variedad emblemática de la producción vitivinícola argentina ya que permite lograr excelentes vinos apreciados por los consumidores a nivel nacional e internacional. Se encuentra presente en muchas de las provincias vitivinícolas de este país, registrándose en el año 2018, un total de 42.999 ha cultivadas, lo que representa el 19,7% del total de la vid del país (INV, 2019b).

La provincia de Mendoza posee el mayor porcentaje de superficie cultivada con este varietal en el país, alcanzando 36.586 ha (85,1% del total del país) en 2018 (Figura 2).

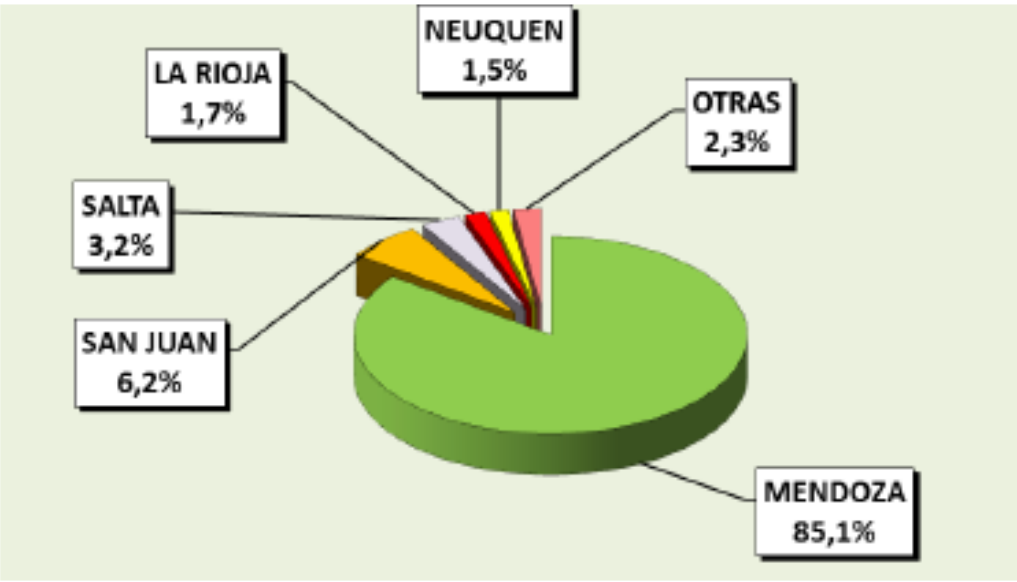

Figura 2: Distribución (%) de la superficie implantada con Malbec en las provincias productoras. Fuente: INVa, 2019

Dentro de Mendoza, los departamentos con mayor superficie implantada corresponden a Luján de Cuyo, San Carlos, Tunuyán, Tupungato y Maipú (Figura 3).

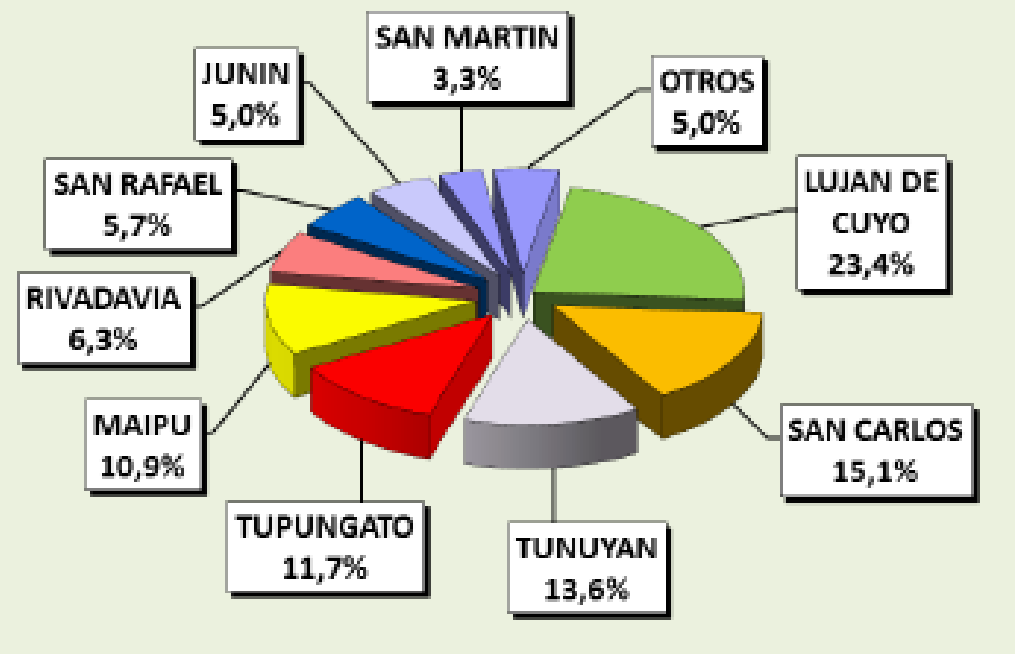

Figura 3: Porcentaje de la superficie implantada con Malbec en los departamentos productores de Mendoza. Fuente: INVa, 2019

Organolépticamente los vinos Malbec se caracterizan por una alta intensidad colorante, con matices violetas y negros mientras que, a nivel aromático, se pueden apreciar notas a ciruelas, pasas, moras, violetas y anís, como también algunas notas herbáceas (Catania y Avagnina 2007b).

1.2 Los compuestos fenólicos

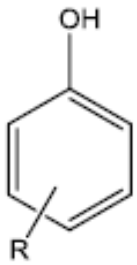

Figura 4: Estructura básica de los compuestos fenólicos

La composición fenólica en las variedades de uva tinta es un aspecto cada vez más importante en la calidad del vino debido a su influencia en las características organolépticas, principalmente en el color, astringencia y amargor. Dichos compuestos se caracterizan por poseer al menos un grupo bencénico sustituido con uno o varios grupos hidroxilos y una cadena lateral funcional (Figura 4) (Monagas et al., 2005). Según su estructura química se dividen en dos grandes grupos: no-flavonoides y flavonoides (Figura 5). De ellos, los antocianos y los flavanoles son los que tienen mayor influencia sobre el color, su evolución y otras características organolépticas relacionadas con la calidad del vino tinto (Zamora, 2003).

A grandes rasgos, podemos decir que en las uvas los compuestos flavonoides se encuentran principalmente distribuidos en los hollejos, semillas y escobajos, mientras que los compuestos no-flavonoides también pueden encontrarse en la pulpa (Zamora, 2003).

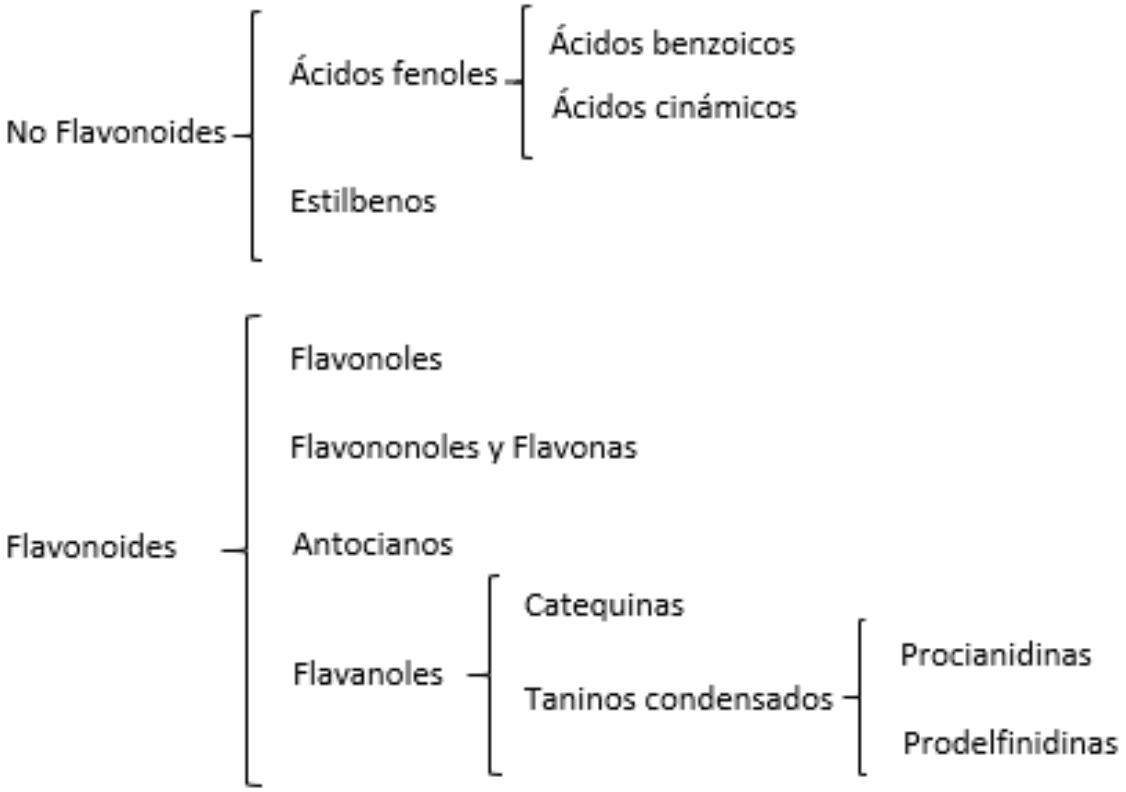

Figura 5: Clasificación de los compuestos fenólicos (Zamora, 2003).

1.2.1 Factores que afectan la composición de los compuestos fenólicos en la uva

Existen diversos factores que influyen sobre la acumulación de compuestos fenólicos en la uva y por lo tanto en el vino, entre ellos encontramos: factores genéticos, culturales y edafoclimáticos.

Dentro de los factores genéticos, el cultivar tiene una influencia evidente sobre la composición fenólica, ya sea por el tamaño del grano de la uva que condiciona la proporción de pieles y semillas respecto del volumen del mosto; por la capacidad potencial de cada variedad para sintetizar compuestos fenólicos diferentes; como asi también por el tipo de clon, el cual condiciona el vigor y la productividad de la planta (Matus y Rodriguez, 1997, Prieto *et al*., 2017, Scarsi, *et al.*, 2005, Zamora, 2003).

Otro de los factores son las labores culturales, que abarcan: el tipo de conducción y de poda, la densidad de plantación, el abonado y el riego, condicionando en gran medida el rendimiento de la planta (Zamora, 2003).

Factores ambientales como la luz y la temperatura, que caracterizan diferentes zonas de cultivo, inciden en forma directa en la actividad fotosintética de la planta y sobre las enzimas de la ruta fenilpropanoide modificando la biosíntesis de estos compuestos (Berli *et al*., 2008; Fanzone, 2012; Costa *et al.*, 2015), estos factores se agrupan bajo el nombre de edafoclimáticos. Mori *et al.,* (2005) demostraron que altas temperaturas nocturnas

continuas, inhiben la acumulación de antocianinas en la piel de la baya debido a la menor actividad de las enzimas que las biosintetizan.

Cortell y Kennedy (2006) concluyeron que la luz y las prácticas culturales que inciden sobre los racimos de uva, afectan significativamente sobre la acumulación de flavonoides. Generalmente temperaturas diurnas y nocturnas moderadas entre 15- 25°C favorecen la biosíntesis y acumulación de antocianinas en hollejos, mientras que a temperaturas mayores a 35°C se reduce la acumulación de estos compuestos por inhibición de la ruta biosintética (Mori *et al*., 2005 y 2007).

Las características físicas y químicas del suelo, también actúan sobre la acumulación de flavonoides en las bayas. Zamora (2003) explica que la fertilidad del terreno y la disponibilidad de agua condicionan el vigor y la producción de la planta y por lo tanto determinan la concentración de compuestos fenólicos en la uva y el vino. En suelos fértiles, con abundancia de nitrógeno y gran disponibilidad de agua, se contribuirá a un gran desarrollo de la parte vegetativa de la planta. En estas condiciones, la mayor cantidad de fenilalanina será destinada a la síntesis proteica quedando así bajos niveles de la misma para la síntesis de compuestos fenólicos. Por lo tanto, como resultado se obtendrán cosechas abundantes pero bayas pobres en dichos compuestos. Lo contrario ocurre en suelos poco fértiles y en condiciones de estrés hídrico.

La altura es la principal condicionante de la caracterización térmica de cada región y por ello la gran responsable de la intensidad de color de los vinos tintos (Catania y Avagnina 2007c, Miguel-Tabares *et al.,*2002). Berli *et al.,* (2008) encontraron una mayor riqueza fenólica en uvas Malbec cultivadas a 1500 msnm; también Fanzone (2012) observó, al analizar la influencia de la zona geográfica, una concentración creciente de los derivados antociánicos al aumentar la altitud.

La relación entre un determinado vino y una zona específica de producción del mismo, la cual le provee características y atributos únicos con respecto a otras zonas, es lo que se conoce con el término francés *"Terroir"* (Foroni *et al.,* 2017). Este término incluye características específicas del suelo, topografía, clima, paisaje y biodiversidad (OIV, 2010) la cual tiene en cuenta a la microbiota nativa, que se ha demostrado que puede ser característica en una determinada zona vitícola (Del Mónaco *et al.,* 2016). Varios autores han demostrado que la zona geográfica tiene influencia sobre la concentración de compuestos fenólicos en la uva y que el *terroir* es un factor de gran importancia sobre las características organolépticas del vino (Costa *et al.,*2015; Fanzone, 2012; Foroni *et al*.,2017; Del Mónaco *et al*.,2016).

1.3 Regiones vitivinícolas de Mendoza

Argentina posee una extensa región vitivinícola, tradicionalmente la misma se ha extiendido a lo largo de la cordillera de Los Andes, desde la localidad de Cafayate, provincia de Salta (22° de latitud sur) hasta los valles de la provincia de Rio Negro (40° de latitud sur) (Figura 6a).Esta gran amplitud en latitud norte-sur, combinada con la topografía de los numerosos valles andinos, condicionan grandes variaciones ecológicas que posibilitan la clasificación de regiones vitícolas bien demarcadas. Las condiciones climáticas en esta zona se caracterizan, generalmente, por la baja probabilidad de precipitaciones y bajos niveles de humedad atmosférica con inviernos marcados, veranos calurosos y buena insolación, lo que permite la completa maduración de las uvas y consecuentemente una buena tipicidad varietal (Pandolfi y Cuello, 2005). Esta zona tradicionalmente involucrada en la producción de vinos, se ha visto extendida en los últimos tiempos a partir de la

incorporación de nuevas regiones donde se producen vinos (INV, 2018), aunque el impacto sobre la producción total es bajo.

Cabe destacar que Mendoza es la provincia productora más importante de Argentina y en ella se distinguen 5 zonas bien diferenciadas que se corresponden con los diferentes oasis mendocinos con diferencias marcadas en altitud y suelo, junto con la presencia de ríos que impactan en la delimitación de estas zonas (Figura 6b).

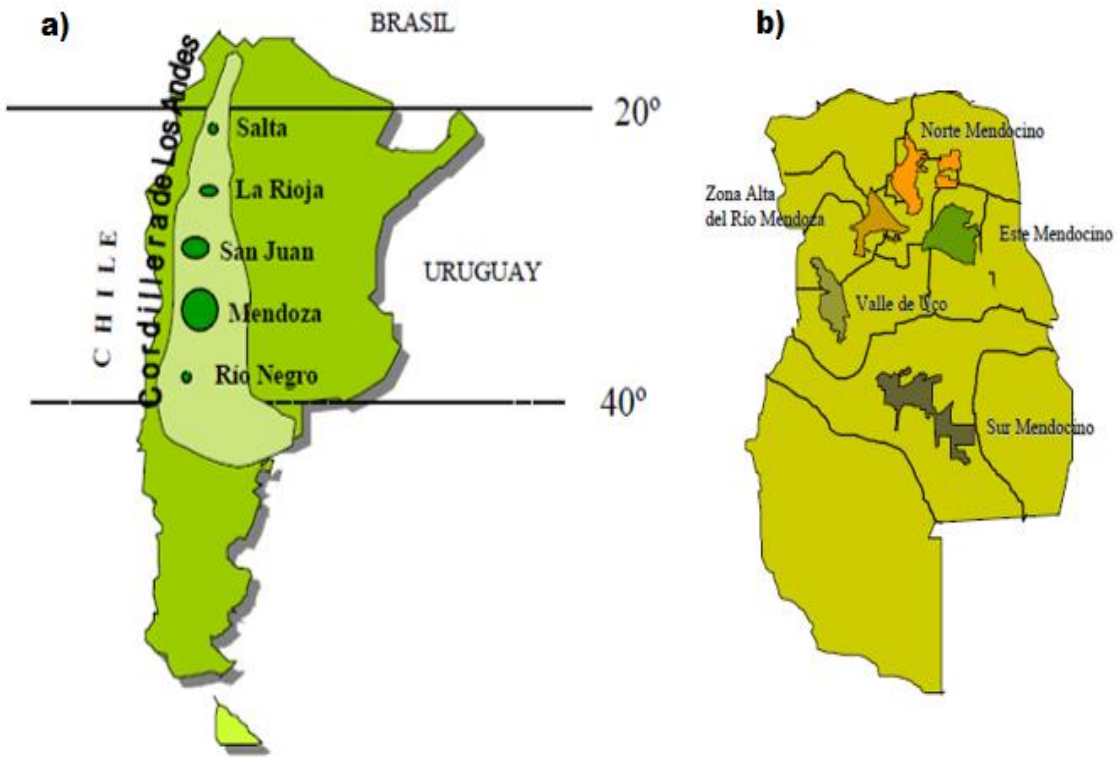

Figura 6: Área apta para el cultivo de vid en Argentina (a) y zonas vitivinícolas de Mendoza (b). Fuente: Ilustración adaptada de Catania y Avagnina, 2007c

La Zona Alta del Río Mendoza se encuentra ubicada en el pedemonte, desde los 1060 m a los 650 m de altitud, irrigada por el Río Mendoza y a 33° de latitud sur. La temperatura media anual es de 15°C y es la zona más importante en la producción de vinos de alta calidad enológica. El clima es caluroso, de noches frías y sequías moderadas. Sus condiciones climáticas favorecen la síntesis de color y taninos en los vinos, y de esta forma los hace aptos para un envejecimiento prolongado. A mayor altura el vino adquiere más cuerpo, acidez y color (Catania y Avagnina, 2007c). Predominan las variedades como el Malbec, que en estas condiciones agroclimáticas experimenta una exaltación de sus características enológicas dando vinos de gran singularidad y calidad (Pandolfi y Cuello, 2005).

La Región del Norte Mendocino es una planicie que abarca el departamento de Lavalle y parte de los departamentos de Maipú, Las Heras, Guaymallén y San Martín.Las Heras presenta un clima caluroso, de noches templadas y sequía intensa. La altitud de esta zona es de 700 a 600 m sobre el nivel del mar, abarcando de esta manera las áreas de menor altura. En el mes más cálido la temperatura media es de 25,4 °C y en el mes más frío de 7,2°C. Esta región presenta óptimas condiciones para el cultivo de vinos blancos, entre las variedades mas extendidas se encuentran Chenin Blanc, Pedro Ximénez, Ugni Blanc y

Torrontés, siendo Syrah y Bonarda los cepajes tintos más típicos de esta región (Fondo vitivinícola, 2009).

El Este mendocino es la región más productora de vinos de la provincia, ubicada a 33°2' de latitud Sur, regada por las aguas del Río Tunuyán. Comprende los departamentos de Junín, Rivadavia, San Martín y Santa Rosa. El departamento de San Martín se caracteriza por presentar un clima muy semejante al mencionado para el departamento de Las Heras (Norte Mendocino), mientras que Junín posee un clima caluroso, de noches frías y de sequía fuerte. Las altitudes oscilan entre los 750 m hasta 640m sobre el nivel del mar. En esta amplia región se implantan gran cantidad de variedades de uvas distinguidas por las intensas notas frutales de sus vinos (Catania y Avagnina, 2007c).

La Región del Valle de Uco está ubicada al Sudoeste de la Ciudad de Mendoza (entre 33°5' y 34°latitud Sur). Corresponde a la segunda zona de mayor importancia en el cultivo de la Variedad Malbec. La temperatura media anual es de 14,2°C y comprende las áreas cultivadas de los departamentos de Tupungato, Tunuyán y San Carlos. Las localidades El Peral en Tupungato y Vista Flores de Tunuyán se caracterizan por tener un clima templado caluroso, de noches muy frías y de sequía moderada; mientras que la localidad de La Consulta en San Carlos, se clasifica como caluroso de noches frías y de sequía moderada. La altitud oscila entre los 1400m en la localidad de Tupungato hasta los 900m sobre el nivel del mar en Tunuyán. Generalmente la acidez producida en los vinos de esta localidad es más elevada permitiendo que sean aptos para un envejecimiento prolongado y además esta región se caracteriza por su aptitud para la producción de materia prima de excelente calidad tanto para vinos tintos como blancos (Catania y Avagnina, 2007c).

La quinta región corresponde al Sur Mendocino ubicada entre los 34, 5° y 35° de latitud Sur, se extiende a los pies de la cordillera de Los Andes y comprende los departamentos de San Rafael y General Alvear. La ciudad de San Rafael se caracteriza por poseer un clima caluroso, de noches frías y sequías moderadas. Se encuentra irrigada por los ríos Atuel y Diamante. Esta región se encuentra entre los 800m y 450 m sobre el nivel del mar. Las temperaturas medias para el mes de enero se encuentran entre los 22,3°C hasta los 24,4°C. Es la principal zona de producción del cepaje Chenin (Pandolfi y Cuello, 2005; Catania y Avagnina, 2007c; Fondo vitivinícola, 2009).

1.4 Fermentación Alcohólica y Fermentación Maloláctica

La fermentación alcohólica es el principal proceso metabólico que ocurre durante la vinificación, en el cual se produce principalmente una transformación anaeróbica de los azúcares del mosto en etanol y dióxido de carbono. También se sintetizan otros metabolitos en menor concentración: glicerol, ácidos orgánicos, acetaldehído, alcoholes y ésteres.

Este proceso comienza con la glicólisis, que conlleva una serie de reacciones en las cuales se produce la transformación de la molécula de glucosa en piruvato más dos moléculas de ATP por molécula de hexosa, luego se produce la descarboxilación del piruvato a acetaldehído el cual es luego reducido a etanol (Figura 7). Por consiguiente, una molécula de hexosa produce dos moléculas de etanol y dos de dióxido de carbono (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

Este proceso metabólico es llevado a cabo por levaduras; originalmente el vino se elaboraba aprovechando la microflora natural de la uva y también participaban aquellas levaduras provenientes de las superficies de los materiales de bodegas (Pretorius, 2000). Tradicionalmente, era elaborado por fermentación espontánea a partir de esta microbiota natural, hasta que en 1890 el botánico y enólogo Müller-Thurgau fue el que introdujo el método de inocular el mosto con levaduras iniciadoras y a mediados de la década de 1960

aparecieron en el mercado las primeras Levaduras Secas Activas (LSA) como inóculos para iniciar la fermentación de forma no espontánea (Belda et al., 2014), metodología que actualmente es utilizada de modo generalizado en la industria del vino, más allá de algunas tendencias actuales en esta industria, como la producción de vinos "naturales", biodinámicos y orgánicos, en los que no se adicionan levaduras exógenas (Bandera 2018); o aquellos que mantienen la elaboración "tradicional" por fermentación espontánea de sus mostos.

La población inicial de levaduras en el mosto es similar al de la uva tanto en número como en especies presentes, y está constituida por diferentes especies de levaduras No-*Saccharomyces,* con predominancia de levaduras apiculadas, principalmente pertenecientes al género *Hanseniaspora* y otras como *Metschnikowia pulcherrima.* Las mismas, conducen inicialmente la fermentación espontánea, luego, las levaduras de la especie *S. cerevisiae* comienzan a multiplicarse rápidamente coexistiendo con las levaduras ya presentes y después de tres o cuatro días de fermentación desplazan a los otros microorganismos siendo las últimas responsables de la fermentación alcohólica (Combina *et al.,*2005). Es así como se observa el dominio de aquellas especies que presentan un metabolismo fermentativo más eficiente, como es el caso de *S. cerevisiae* por su mayor resistencia al grado alcohólico, entre otras características que la hacen más competitiva (Pretorius, 2000).

Es importante destacar que, en condiciones de altas concentraciones de glucosa, como es el caso del mosto de uva, *S. cerevisiae* utiliza la vía fermentativa para metabolizarla (Pérez, 2015), ya que esta levadura en presencia de un medio que contenga al menos 9 g de azúcar por litro prefiere utilizar dicha vía para su degradación en lugar de respirar, esto ocurrirá aún con presencia de oxígeno en el medio, fenómeno conocido como efecto Cabtree (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

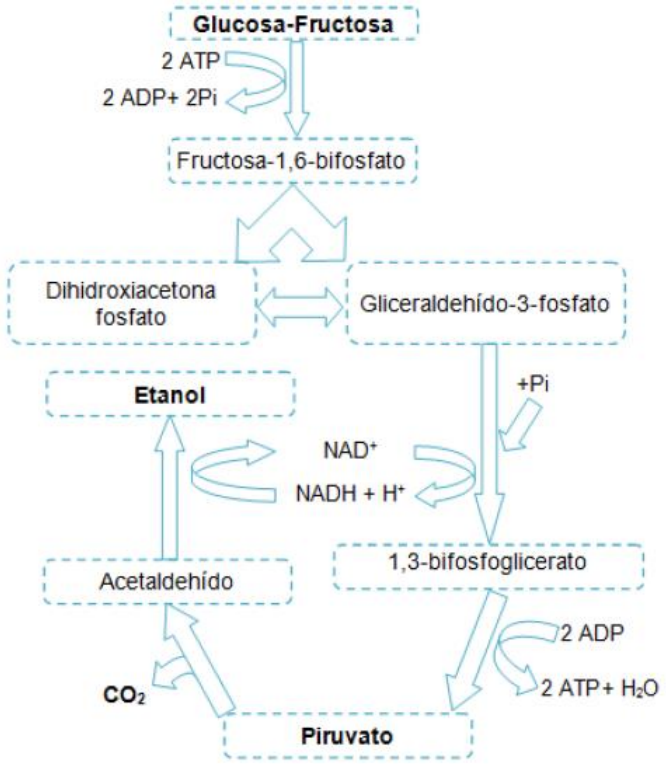

Figura 7: Representación simplificada de la glicólisis y de la fermentación alcohólica (Pérez, 2015).

Por otro lado, en la actualidad la estrategia más generalizada para llevar a cabo la producción del vino a nivel industrial implica la inoculación del mosto mediante la adición de levaduras seleccionadas en forma de LSA. De esta forma, se consigue un acortamiento de la fase de latencia, y se asegura una rápida y completa fermentación del mosto lo que conduce a una importante reproducibilidad en el producto final en años posteriores. En este tipo de fermentaciones dirigidas debe garantizarse la dominancia del inóculo seleccionado frente a las levaduras nativas presentes en el mosto natural, tanto sobre levaduras no-*Saccharomyces* como *Saccharomyces* nativas. Con este fin, el proceso fermentativo es inoculado para comenzar con concentraciones de 10^6 células/mL aproximadamente (Belda *et al*., 2014; Carrascosa *et al*., 2005).

Las diferentes especies y cepas de levaduras que se desarrollan durante este proceso producen, como resultado de su actividad metabólica, diversos productos volátiles y no volátiles que contribuyen a las características de aroma y sabor del vino, entre ellos, los de mayor influencia son los ácidos orgánicos, alcoholes y ésteres superiores. Es importante mencionar, que existen diferencias en la producción de metabolitos secundarios entre cepas de *S. cerevisiae,* demostrándose que la calidad final del vino es resultado de la interacción entre la levadura y la composición del mosto de uva (Romano *et al*.,2003). También es relevante, el efecto favorable de las levaduras No-*Saccharomyces,* las cuales, a pesar de desarrollarse sólo durante los primeros días de la fermentación tienen gran influencia tanto sobre el aroma primario o varietal, como sobre el aroma secundario o de fermentación (Carrascosa *et al.*, 2005, Belda *et al.*, 2014). Es decir, que estas cepas que forman parte del microbiota natural del mosto aportan efectos positivos en cuanto a algunas propiedades del vino y es por esto que en los últimos años se ha extendido la utilización de levaduras autóctonas de cada región con el objetivo de conseguir un vino que mantenga las características sensoriales de cada zona productora (Carrascosa *et al*., 2005). Por lo tanto, se puede decir que la contribución a la calidad organoléptica de los vinos por parte de las levaduras dependerá de la ecología de fermentación, es decir de las especies y de las cepas que estén presentes en este proceso, su interacción y actividad (Fleet, 2003).

La fermentación maloláctica es otro proceso microbiológico de importancia que ocurre principalmente en vinos tintos y es llevado a cabo por bacterias lácticas las cuales están presentes durante todas las etapas de la elaboración del vino. En las primeras fases de la vinificación hay entre 10^3-10^4 ufc/mL y pertenecen a varias especies generalmente homofermentativas. A medida que avanza el proceso de fermentación alcohólica desarrollado por las levaduras, se reduce el número y variedad de estas bacterias y una vez consumida la totalidad de los azúcares, la población de bacterias lácticas permanece estacionaria durante un tiempo para posteriormente iniciar la fase de multiplicación hasta alcanzar una población del orden de 10^6 ufc/mL, dando inicio de esta forma, a la fermentación maloláctica propiamente dicha (Carrascosa *et al*., 2005).

El principal proceso metabólico producido en esta fermentación es la transformación del ácido málico en ácido láctico, asociada a una disminución de la acidez total del vino y con ella la pérdida del carácter ácido y duro de los vinos. Asociados a esta reacción, también se producen otros compuestos, como el lactato de etilo que contribuye a la sensación de cuerpo en el vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). El carácter organoléptico del vino se mejora, se adquiere un nuevo perfil aromático al producirse una disminución de los aromas varietales y al aumentar el aroma frutado y a mantequilla (Carrascosa *et al.,* 2005). En cuanto al color, su intensidad disminuye al igual que el tinte rojo brillante, esta modificación se debe a la decoloración de las antocianinas cuando aumenta el pH y probablemente también se deba a reacciones de condensación entre antocianinas y taninos, como así

también a la adsorción de los antocianos por las paredes celulares bacterianas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a; Carrascosa *et al*., 2005).

En este caso, al igual que en la fermentación alcohólica, se ha recurrido a la inoculación de cepas de bacterias seleccionadas, lo cual acelera el proceso fermentativo e impide el desarrollo de bacterias lácticas alterantes. Es de interés, el uso de cultivos iniciadores constituidos por cepas de la especie *Oenococcus oeni* dadas las aptitudes de esta especie para desarrollar adecuadamente en las condiciones de vinificación y otorgar caracteres deseables en el vino (Carrascosa *et al.,* 2005).

1.5 Evolución de antocianos y flavanoles durante la vinificación.

Durante la vinificación en tinto se produce un proceso de extracción y difusión de los compuestos fenólicos ubicados en la baya denominado maceración. Este fenómeno genera un medio complejo en constante evolución, donde participan diferentes procesos químicos y biológicos que continúan durante la crianza y posterior almacenamiento del vino (Cheynier *et al*., 2000).

La cinética de extracción de estos compuestos estará condicionada por la maceración. En la Figura 8 se puede observar la cinética de extracción de los compuestos fenólicos durante la fermentación/maceración (Ribéreau-Gayon 2006b).

La maceración prefermentativa, es un proceso relativamente corto que dependerá del estado de latencia de las levaduras y estará condicionada especialmente por la dosis de SO_2 y la temperatura. Ocurre entre el llenado de la cuba y la fermentación alcohólica, por lo tanto se lleva a cabo en un medio acuoso y generalmente a temperaturas moderadas. Por otro lado, en la maceración ocurrida durante la fermentación alcohólica, el medio es hidroalcohólico, la temperatura aumenta y su duración varía de dos a siete días según varios factores. Por último, la maceración postfermentativa, propia de los vinos de añejamiento, sigue a la fermentación alcohólica, por lo que ocurre en un medio hidroalcohólico y su duración es muy variable, según la decisión del enólogo (Zamora, 2003; Ribéreau-Gayon *et al.*,2006b).

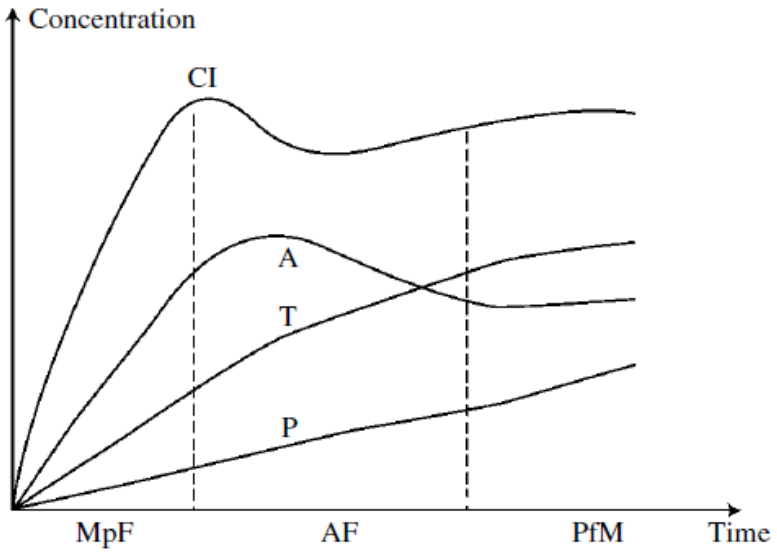

Figura 8: Influencia del encubado sobre la extracción de los compuestos de la uva (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). A: antocianinas; T: taninos; P: Polisacáridos; CI: Intensidad colorante; MpF: Maceración prefermentativa; AF: fermentación alcohólica; PfM: maceración postferrmentativa.

En la figura 8 se observa que la extracción de las antocianinas (A) ocurre al comienzo del encubado, sobre todo en fase acuosa y que la máxima extracción tiene lugar en pocos días, para luego observarse una tendencia a la disminución debido a fenómenos de oxidación, precipitación y adsorción.

Los taninos se solubilizan más lentamente, los de la piel comienzan a solubilizarse conjuntamente con los antocianos y luego, al aparecer alcohol en el medio durante la fermentación alcohólica y a mediados de esta, se produce la disolución de la cutícula de las semillas provocando la solubilización de los taninos presentes en las mismas y prosiguiendo su solubilización en la fase postfermentativa.

Por otro lado, los polisacáridos de la uva siguen una cinética de extracción compleja ya que su solubilización se inicia rápidamente, pero una parte de ellos puede precipitar en presencia de etanol. Las manoproteínas de las levaduras pueden ser solubilizadas durante la maceración postfermentativa. En su conjunto, la concentración de polisacáridos tiende a incrementarse a lo largo de la maceración, contribuyendo a incrementar las sensaciones de volumen en boca y de untuosidad (Zamora, 2003; Ribéreau-Gayon et al.,2006b).

De forma simultánea a todos estos procesos, tiene lugar una serie de transformaciones de la materia colorante (polimerización de los taninos y formación de combinaciones antociano-tanino) que tendrán una influencia organoléptica importante sobre el vino en función del nivel de concentración y de la madurez fenólica de la uva (Zamora, 2003).

1.6 Factores y procesos que influyen en la composición fenólica del vino durante la vinificación.

Durante la vinificación se produce una evolución de los compuestos fenólicos, dicho proceso involucra principalmente dos tipos de mecanismos: reacciones bioquímicas, catalizadas por diferentes enzimas (endógenas o exógenas a la uva) y fenómenos químicos (reacciones entre flavonoides y de estos con otros componentes del vino) que se desencadenan durante la vinificación y continúan durante la crianza (Cheynier *et al.*, 2000; Fanzone, 2012).

1.6.1 Efecto del pH

El pH ya sea en el mosto o en el vino, es un aspecto importante a tener en cuenta en relación al efecto que produce sobre los antocianos. Estos pigmentos, principales responsables del color de los vinos, se encuentran en equilibrio constante entre diferentes formas químicas en función del pH. Por lo que, en medio ácido, la forma predominante es catión flavilio o forma A^+ que presenta una coloración roja, este catión se transforma en la base quinona o forma AO de color violáceo o en la forma AOH o carbinol que es incolora cuando el pH del medio aumenta. Por otra parte, la forma AOH puede transformarse en calconas *cis o trans* de ligero color amarillo, pudiendo finalmente, la forma trans oxidarse irreversiblemente a ácidos fenoles (Zamora, 2003) (Figura 9).

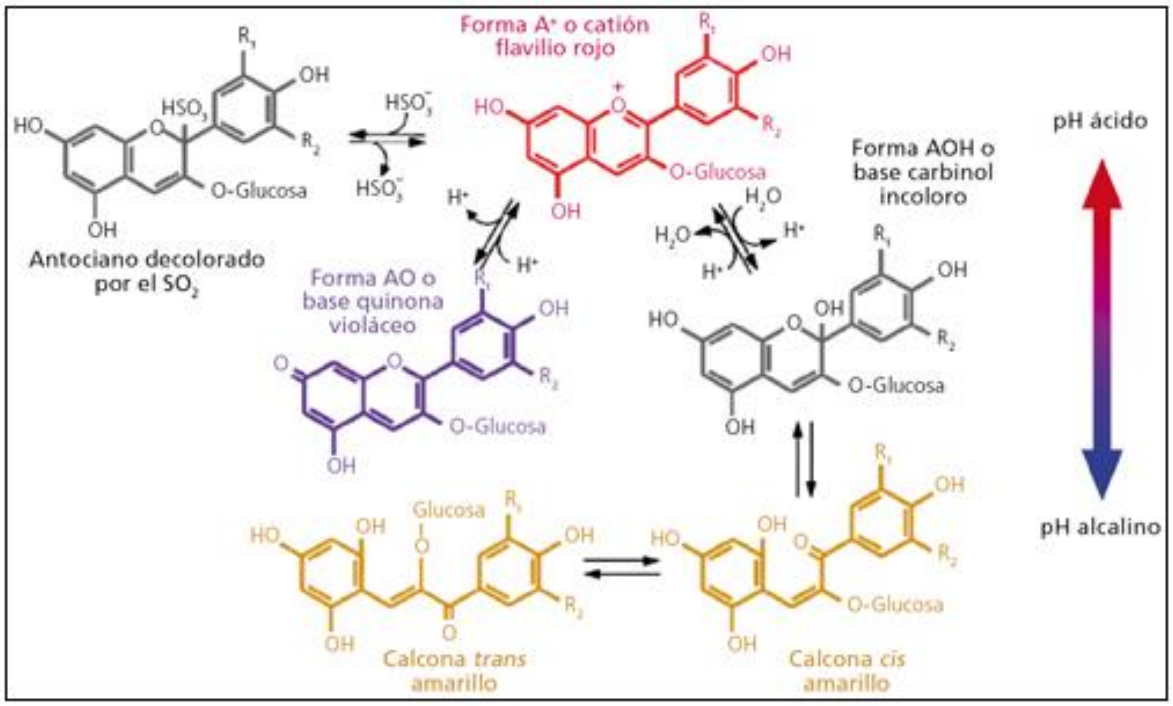

Figura 9: Equilibrio de los antocianos en función del pH. Fuente: Zamora (2013)

1.6.2 Copigmentación

El color del vino está fuertemente condicionado por la copigmentación (Boulton,2001), este fenómeno se fundamenta en que las moléculas de antocianos son planas y pueden formar asociaciones entre ellas o con otras moléculas llamadas copigmentos dando lugar a estructuras tipo “sándwich” (Mazza *et al.,*1990) unidas mediante enlaces de tipo débil (fuerzas de *Van der Walls* e interacciones hidrofóbicas). De esta forma se genera un entorno hidrofóbico, reduciendo la formación de bases hidratadas incoloras (carbinol) y desplazando el equilibrio hacia la formación de estructuras coloreadas (catión flavilio) (Figura 10); por lo tanto una proporción mayor de antocianos del que correspondería de acuerdo al pH, contribuirían al color, siempre y cuando en el medio existan los copigmentos adecuados (Zamora, 2003).

Este fenómeno puede representar entre el 30 y el 50% del color de los vinos jóvenes y no solo actúa incrementando el color, sino que también puede actuar modificando su tonalidad (Boulton, 2001).

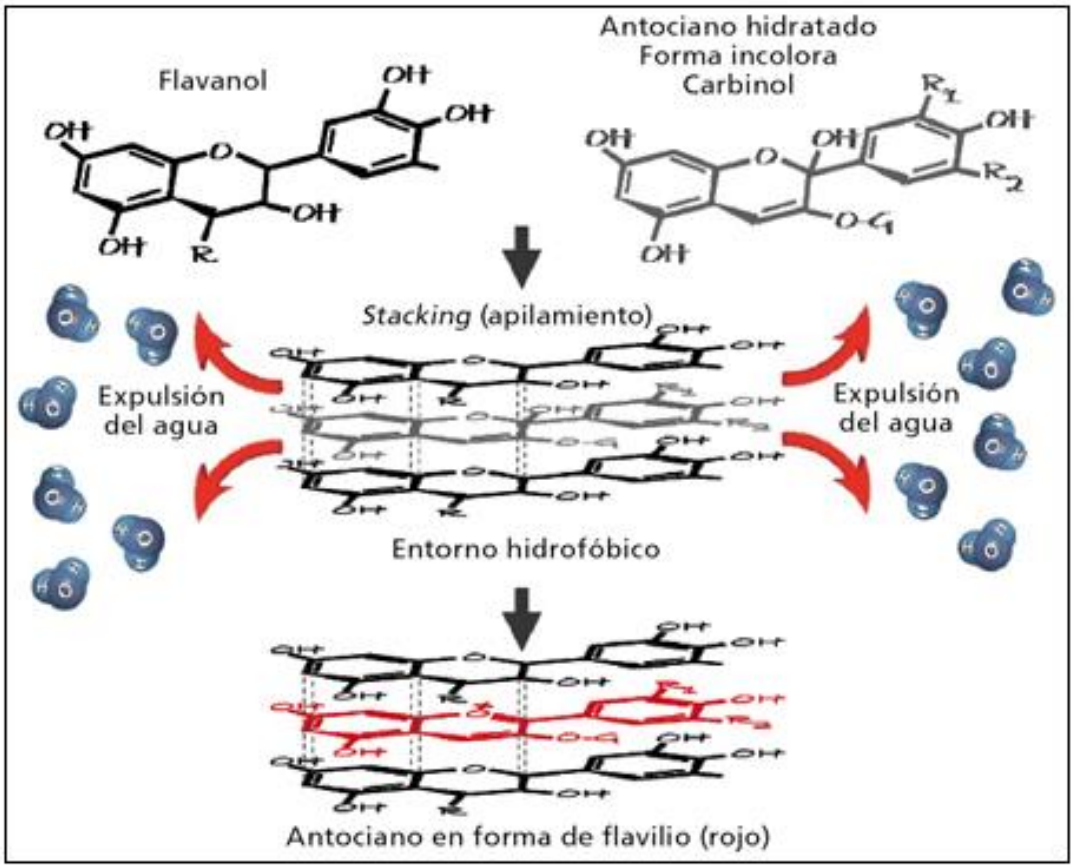

Figura 10: Mecanismo de copigmentación. Fuente: Zamora (2013)

1.6.3 Cepa de levadura

La influencia de la cepa de levadura sobre los antocianos es un factor que se está estudiando recientemente. Estas, pueden actuar eliminando antocianos al adsorberlos sobre su pared celular y también hidrolizando los heterósidos de antocianos gracias a la acción de β-glucosidasa dando lugar a agliconas más inestables (Zamora, 2003). También pueden influir en la extracción de antocianos de la uva durante la maceración y fermentación, dependiendo de su capacidad en la producción de etanol (Monagas *et al.,* 2007).

Según un estudio realizado por Monagas *et al.,* 2007, en el cual se utilizaron diferentes cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* para la elaboración de vinos tintos y se compararon las características de color del vino con una cepa comercial, las antocianinas fueron los compuestos más influenciados por las cepas de levaduras independientemente de la variedad uva. Por esto la influencia de la cepa de levadura en la composición fenólica y en el color del vino, se ha adoptado como un criterio adicional para la selección de las levaduras en la vinificación en tinto.

1.7 El aroma del vino

El aroma es otro importante parámetro de calidad en el vino. Debido a que es el resultado de diversos procesos biológicos, químicos y tecnológicos que ocurren desde la uva hasta el vino, se lo clasifica según su origen en: aroma primario o varietal, secundario o fermentativo y terciario o de crianza (Bayonove *et al.*, 2003). El aroma de origen varietal está constituido por sustancias volátiles (aromáticas) y no volátiles (no aromáticas)

generadas durante el desarrollo de la baya y que contribuyen a la diferenciación varietal. Por lo tanto, dependen de las rutas metabólicas de la vid y consecuentemente están mayormente influenciados por factores que afecten a la planta (Robinson *et al.,* 2014). Sin embargo, los procesos tecnológicos y biológicos aplicados durante la obtención del vino también pueden influenciar su contenido, por ejemplo, ciertas levaduras hidrolizan las formas ligadas de estos compuestos y los transforman en aromáticos (Hernández-Orte *et al*., 2008). Por otro lado, se ha determinado que las bajas temperaturas de fermentación favorecen la retención de estos aromas (Pérez, 2016).

Los compuestos aromáticos de origen fermentativo provienen de dos procesos biológicos, la fermentación alcohólica, llevada a cabo principalmente por levaduras de la especie *S. cerevisiae* y la fermentación maloláctica, llevada a cabo por bacterias lácticas. Es el grupo aromático más abundante y es el responsable, entre otras, de la nota vinosa. Su composición y concentración dependen de factores que impactan sobre el metabolismo de los microorganismos implicados en el proceso fermentativo, tales como temperatura de fermentación, nutrición, cepa de levadura, composición del mosto, etc. (Pérez, 2016). Se ha demostrado también, que existen diferencias en la producción de metabolitos secundarios entre cepas de levaduras, lo que influye en las características químicas y organolépticas del vino (Gamero, 2011; Tilloy *et al*., 2014).

Teniendo en cuenta la importancia de la producción de vinos Malbec para nuestra provincia y lo anteriormente expuesto en relación a los diferentes aspectos que impactan en la calidad de los mismos, se propuso la realización del presente estudio para contribuir al conocimiento del efecto individual y de interacción entre levaduras utilizadas como inóculos para la fermentación alcohólica y zonas vitícolas de Mendoza de procedencia de las uvas sobre los parámetros relacionados con la calidad de los vinos Malbec.

1.8 Hipótesis y Objetivos

1.8.1 Hipótesis

- Las características cromáticas, químicas y sensoriales de vinos de la cv. Malbec de Mendoza están influenciadas por las levaduras inoculadas encargadas de llevar a cabo la fermentación alcohólica
- Las regiones vitícolas de Mendoza constituyen diferentes *terroir* que influyen en la composición polifenólica de vinos cv. Malbec.
- Existe una interacción entre el *Terroir* y la levadura que potencia alguno de los atributos medidos y permite una diferenciación de tratamientos.

1.8.2 Objetivos

1.8.2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto individual y de interacción entre los factores levadura y *Terroir* sobre la composición polifenólica, química y características sensoriales de vinos de la variedad Malbec de Mendoza.

1.8.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar la composición polifenólica de vinos cv. Malbec provenientes de diferentes zonas geográficas de la provincia de Mendoza, Argentina.

- Evaluar el efecto de diferentes cepas de levaduras, inoculadas para llevar a cabo la fermentación alcohólica, en la composición polifenólica, química y sensorial de vinos cv. Malbec.
- Determinar si existe interacción entre el *Terroir* y las levaduras sobre las características finales de los vinos Malbec de diferentes regiones vitícolas de Mendoza, Argentina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima

Para la obtención del mosto se utilizaron uvas Malbec de la cosecha 2017 de viñedos pertenecientes a la empresa Doña Paula implantados en tres zonas diferentes de la provincia de Mendoza, las cuales se encuentran destacadas en la Figura 11.

La zona de Ugarteche pertenece a la Zona Alta del río Mendoza y está situada en el departamento de Luján de Cuyo; Gualtallary pertenece al departamento de Tupungato y El Cepillo pertenece al departamento de San Carlos, estas dos últimas zonas forman parte del Valle de Uco. En la Tabla 1 se detallan las características de dichas zonas.

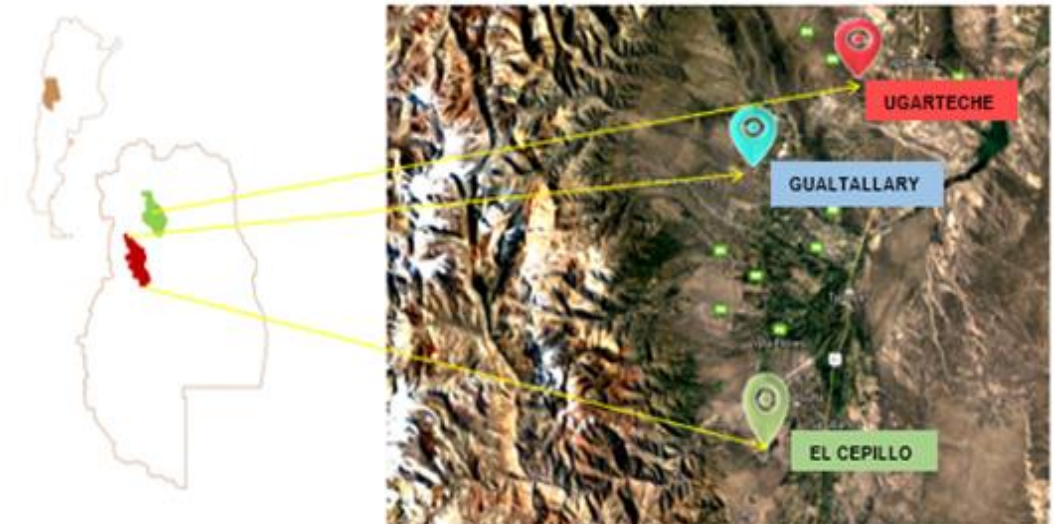

Figura 11: Mapa de la provincia de Mendoza con las zonas vitivinícolas estudiadas e imagen satelital correspondiente (creación propia adaptada de imagen satelital de

Tabla 1: Características agro-ecológicas de los viñedos

Localidad	Sistema de Conducción	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m)	Suelo	Riego	Rendimiento (Kg/ha)
Ugarteche, Luján de Cuyo	Espaldero	33º 15' 00"S	68º 57' 38"W	1012	Franco - Arenoso	Goteo	8000
El Cepillo, San Carlos	Espaldero	33º 49' 13,6"S	69º 11' 51,7"W	1117	Franco - Arenoso	Goteo	6500
Gualtallary, Tupungato	Espaldero	33º2 3' 3,07"S	69º 13' 52"W	1293	Franco - Arenoso	Goteo	6000

Fuente: Bodega Doña Paula (comunicación personal)

2.2 Microorganismos

Para llevar a cabo la fermentación alcohólica se utilizaron las siguientes levaduras secas activas comerciales provistas por la empresa Lalferm S.A.: Lalvin EC1118 (*Saccharomyces cerevisiae*), Ionys *(Saccharomyces cerevisiae*), Tango Malbec (*Saccharomyces cerevisiae*) y Flavia (*Metschnikowia pulcherrima*) (Tabla 2). Paralelamente, como testigo, se realizaron fermentaciones espontáneas a partir de la microbiota nativa presente en la uva de cada zona.

En todos los casos se realizó la inoculación según protocolo brindado por el fabricante. La dosis de levaduras utilizadas fue de 30g/hL, las cuales se hidrataron con 30g/hL de activador de la fermentación Go-Ferm Protect provisto por la misma empresa de las levaduras (Tabla 3).

Tabla 2: Características de las cepas de levaduras utilizadas en el ensayo y características de la bacteria Lalvin VP41™ utilizada para realizar la FML.

Nombre comercial	Especie	Propiedades Microbiológicas y enológicas	Efecto Sensorial
Lalvin EC-1118	*Saccharomyces cerevisiae bayanus*	-Tolerancia al alcohol: hasta 18% -Fase de latencia corta -Rápida cinética de fermentación en amplio rango de pH -Amplia gama de temperaturas de fermentación (óptima entre 10 a 30°C) -Baja necesidad en nitrógeno asimilable -Baja necesidad en O_2 -Producción baja de acidez volátil -Producción media de SO_2 -Producción baja de SH_2	Neutral
Tango Malbec	*Saccharomyces cerevisiae var cerevisiae*	-Tolerancia al etanol: 15,5 % -Fase de latencia corta -Velocidad de fermentación regular -Temperatura óptima de fermentación de 15 a 28°C -Necesidades media en nitrógeno -Baja producción de SO_2	Exaltación de los aromas varietales, con incremento de las notas de frutas madura
Ionys	*Saccharomyces cerevisiae var cerevisiae*	-Tolerancia al etanol: 15,5 % -Fase estacionaria larga pero constante -Rango de temperatura óptimo: 25-28°C -Alto poder acidificante -Alta producción de glicerol -Muy baja producción de acidez volátil -Baja producción de SO_2	Alto poder de acidificación. Vinos equilibrados y frescos.

		-Muy elevadas necesidades en nitrógeno	
Flavia .	*Metschnicowia pulcherrima*	-Para ser usada en inoculación secuencial con *Saccharomyces cerevisiae* compatible -Temperatura de fermentación: 15- 22°C siendo la óptima de 18-20°C -Necesidades de nutrientes complejos	Aumenta el carácter varietal (terpénicos y tiólicos)
Lalvin VP41™ 	*Oenococcus oeni*	-Tolerancia al pH: >3,1 -Tolerancia al alcohol: hasta 16% (v/v) -Tolerancia al SO_2: hasta 60mg/L SO_2 total -Tolerancia a la temperatura: >16°C -Demanda nutrición baja -Buena implantación -Cinética de FML: rápida -Baja producción de acidez volátil -No producción de aminas biógenas -Co-inoculación recomendada	Afrutado, sensación en boca, frescura.

Fuente: Sitio web Lallemand (https://www.lallemandwine.com/es/south-america/productos/catalogo/levaduras/) (https://www.lallemandwine.com/es/south-america/productos/catalogo/bacterias-es/)

Se evaluó también la fermentación con inoculación secuencial de levaduras no-*Sacccharomyces* y *Saccharomyces*: para ello se inoculó la levadura Flavia (dosis 25g/hL hidratada con 25g/hL del activador Go-Ferm Protect) y 48 h después se realizó la inoculación la levadura EC1118 a igual dosis.

Para la fermentación maloláctica se inoculó la bacteria *Oenococcus oeni* Lalvin VP41 (Lalferm S.A), en dosis de 1g/hL, previa hidratación en agua (1:20 v/v) a 20°C durante 15 minutos (Tabla 2).

Tabla 3: Descripción y aplicación de GO-FERM PORTECT™ utilizado en la rehidratación de las levaduras

Nombre comercial	Descripción	Aplicación
GO-FERM PROTECT™	Compuesto por un autolisado de levaduras rico en esteroles y una levadura inactivada específica rica en micronutrientes, que aumenta la supervivencia de la levadura en condiciones de fermentación difíciles gracias a su elevado contenido en microprotectores biodisponibles y micronutrientes.	Introducir durante la rehidratación para la levadura seleccionada.

Fuente: Sitio web Lallemand (https://www.lallemandwine.com/es/south-america/productos/catalogo/nutrientes-protectores/)

2.3 Protocolo de vinificación

2.3.1 Obtención del mosto

Las uvas provenientes de cada zona, se descobajaron y molieron (20kg de uva, por triplicado) y se colocaron en bidones plásticos de 25 L de capacidad (Figura 12).

Se realizaron los análisis de rutina en todos los mostos (% de sólidos solubles, pH y acidez total), luego se adicionó anhídrido sulfuroso libre en una concentración de 30mg/L utilizando una solución acuosa de 53,7 g/L de metabisulfito de potasio (correspondiente a 30 g/L de SO_2), para inhibir enzimas oxidativas. Por último, se procedió a corregir la acidez a 6 g/L con adición de ácido tartárico en aquellos mostos en los que los valores de acidez fueron inferiores a este valor para determinar mejor el posible efecto de las levaduras y no afectar demasiado la calidad final del vino debido a este parámetro.

Figura 12: Mostos en bidones de 25 litros. Fotografía propia

2.3.2 Diseño experimental

Se aplicó un diseño polifactorial con dos factores (Zonas y Levaduras), con 3 niveles para el primer factor y 5 niveles para el segundo factor, basados en la cantidad de zonas y las levaduras utilizadas. Para ello, a partir del mosto obtenido de cada zona se evaluaron 5 tratamientos por triplicado, resultando en total 45 unidades experimentales (Figura 13).

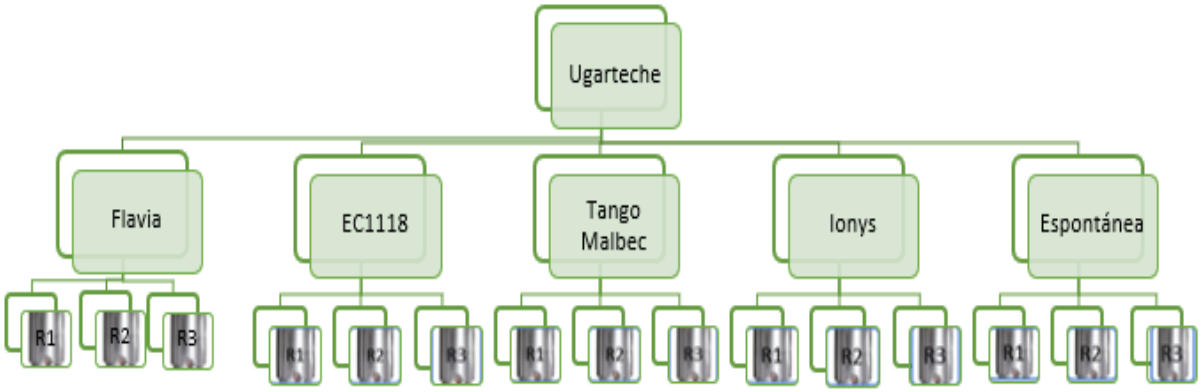

Figura 13: Esquema del diseño experimental para la zona de Ugarteche, el mismo diseño se utilizó para las otras dos zonas (Altamira y El Cepillo)

2.3.3 Protocolo de la fermentación alcohólica: seguimiento y control microbiológico

Antes de realizar la inoculación de los mostos, se realizó un análisis microbiológico de los mismos para estimar las poblaciones iniciales de levaduras y bacterias lácticas presentes en ellos utilizando la metodología mencionada en 2.4.

A excepción del tratamiento de fermentación espontánea, los mostos fueron inoculados y las fermentaciones se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 25ºC y se realizó un seguimiento diario de las mismas a través del control de la densidad del mosto (g/cm^3).

Para asegurar un desarrollo óptimo de las fermentaciones se realizó la adición de nutrientes en dos momentos, al principio de la fermentación alcohólica con Opti-mum Red® (30 g/hL; Lalferm S.A.), y al llegar a una densidad de 1,070 g/cm^3 con Fermaid AT® (30 g/hL; Lalferm S.A.) (Tabla 5).

Finalizando la fermentación alcohólica (FA), a una densidad cercana a 1 g/cm^3 se procedió a tomar muestras para control de las poblaciones de microorganismos que se encontraban finalizando el proceso.

Tabla 5: Descripción y aplicación de Fermaid AT y Opti-mum Red, utilizados en el ensayo.

Nutriente / Levadura inactivada específica	Descripción	Aplicación
Fermaid ® AT	Nutriente complejo que aporta un buen equilibrio de nitrógeno inorgánico (DAP) y orgánico (levadura inactiva específica) completado con tiamina. Reduce el riesgo de fermentaciones lentas o paradas.	En caso de deficiencias elevadas en nitrógeno
Opti-mum® Red	Es un autolisado de levadura rico en polisacáridos procedentes de la combinación de una levadura enológica única con un proceso específico de inactivación que lleva a una mayor disponibilidad de polisacáridos.	La aplicación en el mosto provee una temprana disponibilidad de polisacáridos para la formación de complejos con los polifenoles tan pronto estos se liberan y difunden. Mejor estabilización del color y de la textura del vino.

Fuente: Sitio web Lallemand (https://www.lallemandwine.com/es/chile/productos/catalogo/levaduras-inactivadas-especificas/) (https://www.lallemandwine.com/es/chile/productos/catalogo/nutrientes-protectores/)

2.3.4 Fermentación maloláctica, estabilización por frío y fraccionamiento

Una vez finalizada la FA, cuando el contenido de azúcares reductores fue inferior a 1,8 g/L, se realizó el descube trasvasando el vino a damajuanas. Luego, se inoculó 1 g/hL de la bacteria comercial *Oenococcus oeni* (Lalvin VP41) previa hidratación y aclimatación. El proceso de la fermentación maloláctica (FML) se realizó a una temperatura controlada de 20 °C y el seguimiento de la misma se controló mediante cromatografía de papel.

Una vez finalizada la FML, se tomaron muestras para realizar las determinaciones de los parámetros de color (índice de polifenoles totales, antocianos totales e intensidad colorante), y luego se corrigieron los vinos con una solución de metabisulfito de potasio para obtener una concentración de anhídrido sulfuroso libre de 35 mg/L.

Posteriormente se realizó la estabilización tartárica y de color en cámara de frío con una temperatura aproximada de 4-8 ºC, durante 2 meses. El envasado se realizó previo trasiego en botellas de vidrio de 750mL de capacidad con tapa a rosca.

2.4 Determinaciones analíticas

2.4.1 Análisis físico-químicos:

Las siguientes determinaciones se realizaron en mosto y vino según protocolos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2013): porcentaje de sólidos solubles por refractrometría, pH por potenciometría, acidez total por titulación volumétrica, acidez volátil por método Jaulmes, grado alcohólico por método aerométrico (Figura 14). En el Anexo I se presentan los protocolos de dichas determinaciones.

Figura 14: Equipos de laboratorio utilizados para determinaciones analíticas. Izquierda: determinación de acidez volátil; Derecha: determinación de alcohol.

Los parámetros relacionados con el color que se determinaron fueron: índice de polifenoles totales a 280nm, antocianos totales e intensidad colorante. A continuación, una breve explicación de los mismos.

2.4.1.1 Índice de polifenoles totales

Esta determinación permite dar una noción del conjunto global de compuestos fenólicos sin aportar información suplementaria sobre la concentración de las diversas familias de estos compuestos.

La determinación consiste en diluir previamente el vino tinto por un factor de 100 con agua destilada y luego determinar la absorbancia a 280 nm en una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico, multiplicando el resultado por el factor de dilución (Zamora, 2003).

2.4.1.2 Antocianos totales

Para la determinación de antocianos totales se utilizó el método de blanqueo con metabisulfito de sodio. En esta técnica los antocianos no polimerizados son decolorados por esta sal para luego ser dosados por diferencia con respecto a una muestra que no se somete a blanqueo. De esta forma se somete al vino a un medio fuertemente ácido para que los antocianos se manifiesten en su forma coloreada de catión flavilio (Figura 15).

Se tomaron 200 µL de vino filtrado y se colocaron en un tubo plástico, al mismo se añadió 200 µL de ácido clorhídrico 0,1% en etanol y 4 ml de ácido clorhídrico 2% en agua y se homogenizó el contenido.

Se utilizaron cubetas de 1 cm de paso óptico, en dos de ellas se colocaron 1 mL de la mezcla obtenida anteriormente más 400 µL de agua destilada. Luego, se homogenizó y procedió a realizar la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm, obteniendo así dos lecturas denominadas “A1” y “A2”. Posteriormente en otras dos cubetas, se colocaron 1 mL de la mezcla más 400 µL de una solución de metabisulfito al 15%, se homogenizó y se dejó reposar 20 minutos para luego realizar la lectura de la absorbancia a 520 nm, de esta forma se obtuvieron dos lecturas denominadas “B1” y “B2”. Finalmente se realizó el siguiente cálculo (Ough y Amerine, 1988):

Antocianos mg/L= (Abs “A” – Abs “B”) * 885

Donde: “Abs” es la absorbancia de la solución

Abs “A” es el promedio de A1 y A2,

Abs “B” es el promedio de B1 y B2, y

885 es la absortividad molar de la malvidina 3-glucósido

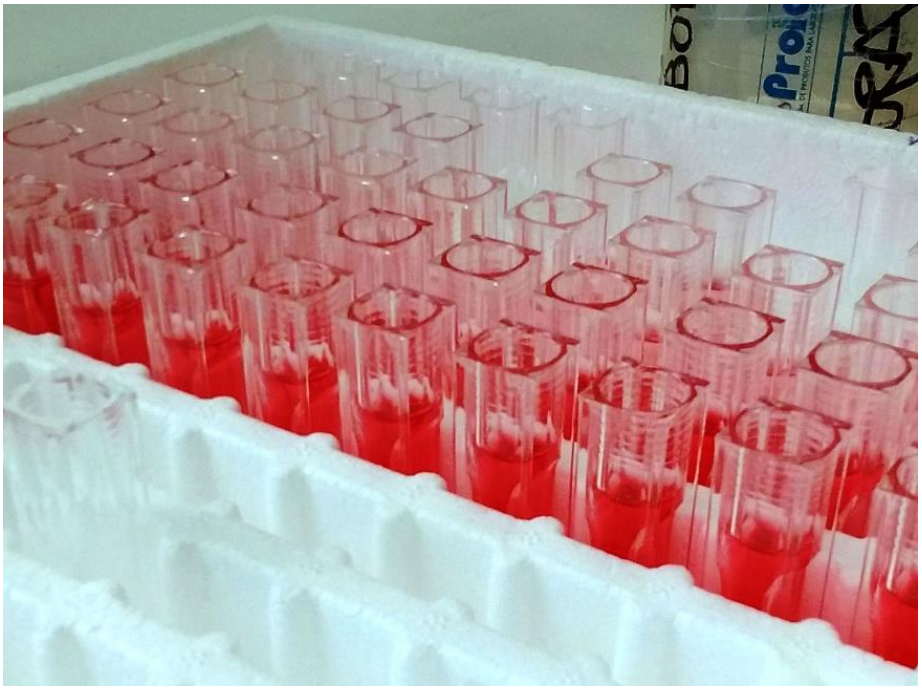

Figura 15: Fotografía del método de blanqueo para la determinación de antocianos. Fuente: Fotografía propia.

2.4.1.3 Intensidad colorante

Este parámetro expresa de manera objetiva, mediante un índice, la cantidad de color que posee un vino.

Se utilizó un espectrofotómetro que opera a luz visible, se colocó el vino previamente centrifugado en una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se midieron las absorbancias a 420, 520 y 620 nm de longitud de onda. El resultado se multiplicó por 10 para referirlo a la cubeta estándar de 10mm de camino óptico. La intensidad colorante será la suma de cada una de las componentes (Zamora, 2003):

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

2.4.2 Análisis microbiológicos:

Las poblaciones iniciales de microorganismos se evaluaron por siembra en superficie en placa. Se utilizaron los medios de cultivo acorde para cada grupo microbiano: medio de cultivo WL (Oxoid), para recuento de hongos y levaduras viables, agar Lisina para recuento de levaduras no-*Saccharomyces* y MRS para recuento de bacterias lácticas.

Para la evaluación de las poblaciones de las levaduras al final de la fermentación se realizaron diluciones sucesivas de los mostos utilizando agua peptonada (0,1 % m/v) y se sembraron sobre superficie en medio de cultivo YPD (extracto de levadura 0,5%, peptona 0,5%, glucosa 4%, agar 2%).

En ambas etapas de evaluación, las placas se incubaron a 28°C durante 48-72h, y en condiciones de microaerofilia para los medios MRS (bacterias lácticas) luego de lo cual se realizó recuento y clasificación de colonias.

Para realizar el control de implantación de las cepas de levaduras, un número representativo de colonias crecido en medio YPD fue analizado mediante la técnica de diferenciación intraespecífica, PCR Interdelta según el protocolo de Legras y Krast (2003) (realizado por Lallemand, Canadá).

2.4.3 Análisis sensorial

La caracterización sensorial se realizó a través de un análisis descriptivo no estructurado, el cual permite describir las diferentes percepciones sensoriales de los vinos con una serie de términos y darle una magnitud mediante una escala. Además, permite medir el impacto sensorial de diferentes prácticas vitícolas y enológicas (Catania y Avagnina, 2007a).

Todos los vinos fueron evaluados por un panel de 15 degustadores entrenados pertenecientes al Centro de Estudios en Enología, EEA Mendoza INTA. Se presentaron las copas correspondientes a los vinos de todos los tratamientos por zona a los degustadores, estas fueron codificadas por números de tres dígitos elegidos al azar y presentadas al panel.

El análisis sensorial se llevó a cabo en la sala de degustación del Centro de Estudios Enológicos del INTA, acondicionada para tal fin. La temperatura de servicio de las muestras fue de 16-18ºC y se colocó un volumen de muestra hasta el ecuador de la copa de dimensiones normalizadas (ISO 3591,1977) (Figura 16).

El panel de degustadores evaluó durante 3 sesiones, 3 atributos aromáticos (vegetal, fruta fresca y fruta madura) y 2 atributos en boca (astringencia y amargor).

Figura 16: Arriba: sala de degustación INTA Mendoza; Abajo: copas de degustación. Fuente: Fotografía propia.

2.5 Tratamiento de datos y análisis estadístico

Primeramente, se verificó la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza procesados por el software estadístico Infostat®. Se aplicó análisis de la varianza polifactorial y Test LSD Fisher para obtener una comparación de las medias buscando diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y evaluar el efecto de los factores con un nivel de significancia de α=0,05. Además, se les aplicó un análisis multivariado, utilizando como método de reducción de información, el Análisis de Componentes Principales (ACP).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Datos iniciales de los mostos

3.1.1 Análisis físico-químicos

Los mostos de uvas Malbec de las 3 zonas fueron caracterizados inicialmente a través de los siguientes parámetros analíticos: Sólidos solubles (°Brix), pH y Acidez total.

En la Tabla 6 se encuentran detallados los análisis iniciales de los mostos y se puede observar diferencias significativas entre las zonas respecto a estos datos iniciales, mostrando una marcada influencia de la zona de origen sobre la uva. Gualtallary alcanzó un mayor grado de madurez y un mayor nivel de pH con un consecuente nivel de acidez total inferior al resto. En cuanto a los valores obtenidos para la zona de El Cepillo, ésta se destacó por su menor nivel azucarino, pero con niveles intermedios de pH y acidez respecto

al resto, siendo Ugarteche el mosto con mayores niveles de acidez y menores de pH, pero de madurez intermedia. Llama la atención este último resultado si se considera que este viñedo se encuentra en una zona de menor altura y más cálida entre las estudiadas en este trabajo, por lo que se esperaban mostos con menor acidez (Fanzone, 2012).

Tabla 6: Datos iniciales de los mostos de las diferentes zonas vitícolas

Variable *	EL CEPILLO	GUALTALLARY	UGARTECHE
Brix (%)	23,4 ± 0,26a	24,65 ± 0,56c	24,3 ± 0,1b
pH	3,52 ± 0,02b	3,66 ± 0,02c	3,42 ± 0,02a
Acidez Total (g/L ác. Tartárico)	5,25 ± 0,36b	4,35 ± 0, 17a	5,86 ± 0,1c

* valores promedios ± desviación estándar, letras diferentes indican diferencias estadísticas (para la misma fila) de la aplicación del análisis de la varianza con test LSD Fisher, p-valor<0,05. (Anexo II)

3.1.2 Análisis microbiológicos

Luego de los análisis físico-químicos iniciales, se procedió a tomar muestra del mosto para realizar el análisis microbiológico inicial y de esta forma evaluar la microflora presente inicialmente en los mismos (Tabla 7).

Tabla 7: Microflora inicial del mosto de las diferentes zonas vitícolas

ZONA	Levaduras totales (ufc/mL)	Hongos (rango ufc/mL)	Levaduras No *Saccharomyces* (%)	Bacterias lácticas (ufc/mL)
UGARTECHE	$2{,}15 \times 10^3$	8×10^2-3×10^3	100	<1
GUALTALLARY	$9{,}32 \times 10^5$	1-2 x 10^3	100	$6{,}78\ 10^3$
EL CEPILLO	$8{,}35 \times 10^5$	<1	100	$4{,}74\ 10^4$

Se puede observar que el recuento de levaduras se encontró en niveles poblacionales de 1.10^3 – 1.10^5 ufc/mL, lo cual corresponde a valores normales en las uvas recién cosechadas, teniendo en cuenta que la microflora inicial en el mosto es similar a la de la uva (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a). Es destacable la menor población de levaduras totales para mosto encontrada en Ugarteche, ya que, en condiciones climáticas más cálidas, como las que presenta esta zona, se esperaría que las poblaciones de levaduras fueran más abundantes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

En general en los mostos predominaron las levaduras No- *Saccharomyces* (Figura 17), dado que en las uvas maduras se encuentran con predominancia, especies apiculadas poco tolerantes al alcohol y especies estrictamente oxidativas, encontrándose las especies fermentativas *Saccharomyces* en poblaciones extremadamente bajas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a; Pretorius, 2000; Fleet, 2003).

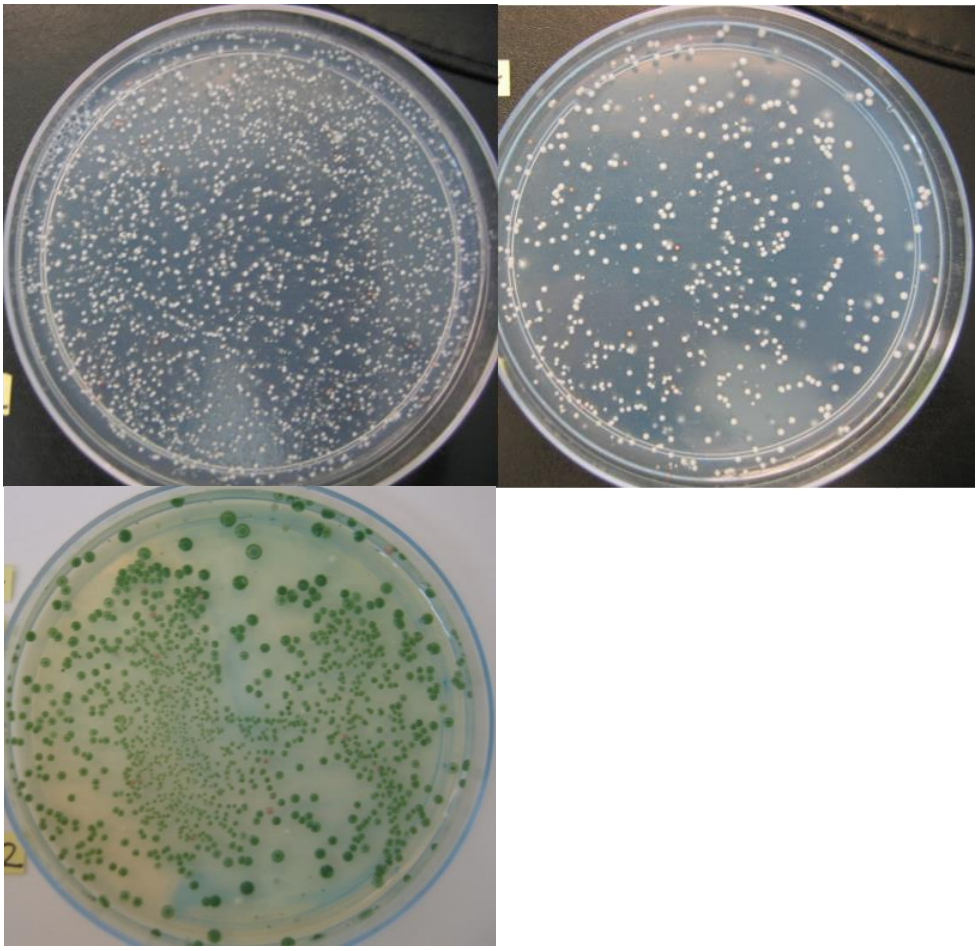

Figura 17: Siembra del mosto de El Cepillo. Arriba: agar lisina, Izquierda: dilución -2; Derecha: dilución -3; Abajo: medio WL, dilución -2

Respecto a la presencia de hongos y a las bacterias lácticas en estos mostos frescos, en los recuentos realizados se encontraron valores normales y esperables para el mosto.

En función de esta caracterización inicial puede observarse que los mostos provenientes de las diferentes zonas, lograron diferenciarse tanto físico-química como microbiológicamente.

3.2 Desarrollo de las Fermentaciones

3.2.1 Cinética de la fermentación alcohólica

En la Figura 18 se pueden observar las cinéticas de las fermentaciones alcohólicas para las diferentes cepas de levaduras en las tres zonas estudiadas, mostrando la evolución de la densidad (g/mL) a medida que transcurrió el tiempo (días) de dicho proceso.

Primeramente, se puede observar que, con respecto a la duración de las fermentaciones, las levaduras se comportaron de manera similar en las tres zonas. Por otra parte, la duración de las fermentaciones con la levadura Ionys, superó el promedio de fermentación respecto a las otras cepas, finalizando las fermentaciones dos o tres días después que el resto, demorando 10 a 11 días dando como resultado fermentaciones más lentas (Tabla 8). Respecto a la duración de las fermentaciones espontáneas, en el caso de Ugarteche, a pesar de contener una menor población inicial de levaduras *Saccharomyces*, finalizó sus fermentaciones en periodos intermedios a las otras zonas. Es importante destacar que la

cepa de levadura Tango Malbec, tuvo un comportamiento similar a la cepa de levadura EC1118, iniciando rápidamente la fermentación y finalizándola a los 8 días, destacándose en la zona de Ugarteche por finalizar un día antes.

Tabla 8: Duración de la fermentación alcohólica (promedio en días)

ZONAS	EC1118	ESPONTÁNEA	FLAVIA	TANGO MALBEC	IONYS
UGARTECHE	8	8,5	8	7	11
GUALTALLARY	8	9	9	8	11
EL CEPILLO	8	8	8	8	10

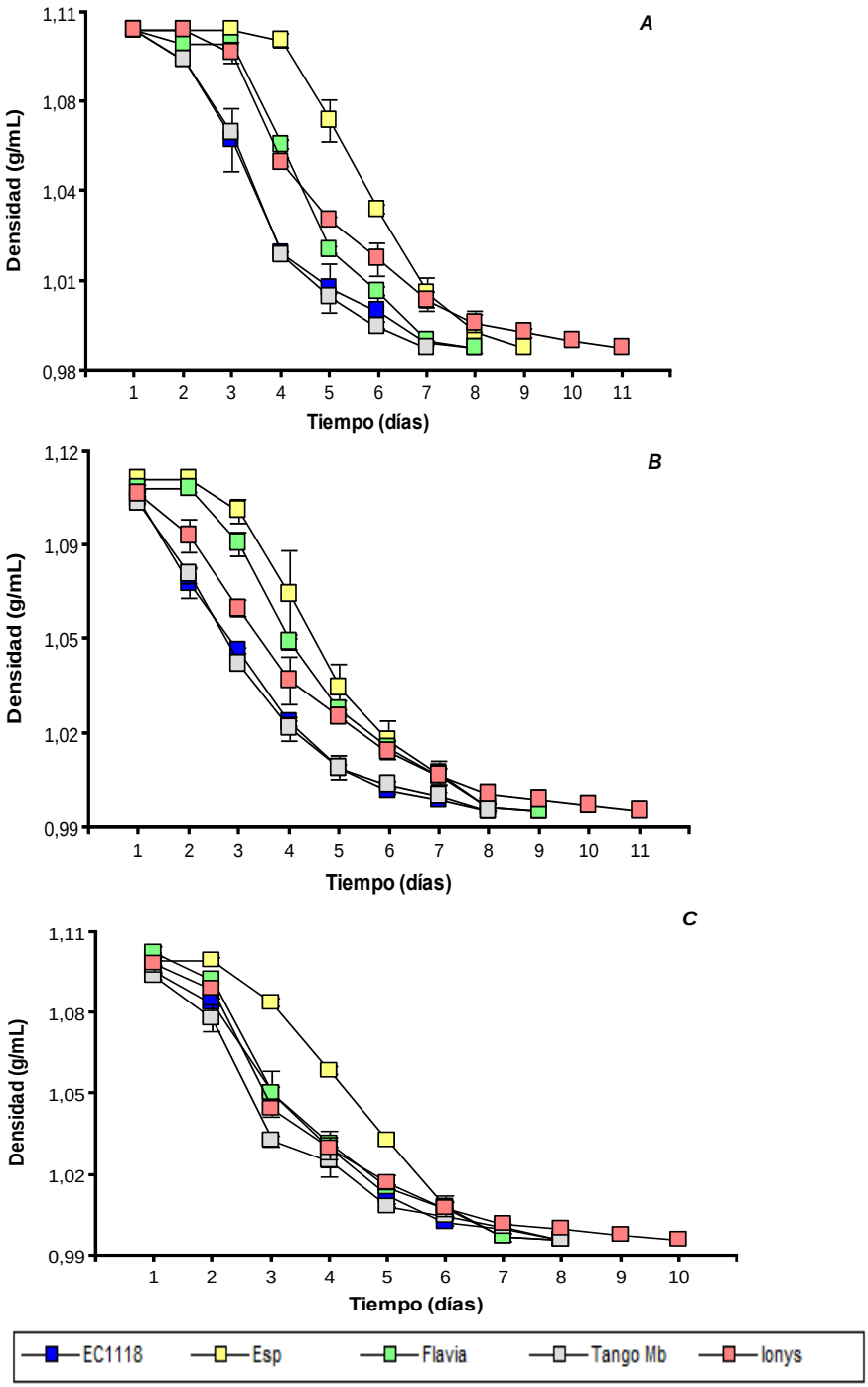

Figura 18: Cinética de la fermentación alcohólica de las cepas de levaduras estudiadas para las 3 zonas. A: Ugarteche; B: Gualtallary; C: El Cepillo.

3.2.2 Control de implantación

Finalizando la fermentación alcohólica, a una densidad de 1g/cm^3, se procedió a tomar muestras de todas las unidades experimentales para, a continuación, sembrarlas en medio YPD (Figura 19). Una vez crecidas las colonias, se realizó el control de implantación mediante la técnica de diferenciación intraespecífica, PCR interdelta llevado a cabo por Lallemand, Canadá. Esta metodología de Biología molecular genera un perfil o patrón molecular particular, que permite la diferenciación a nivel de "cepas" dentro de la especie *S. cerevisiae.* De este modo se espera que, si la fermentación alcohólica está siendo llevada a cabo por una cepa en particular, como es de esperar en fermentaciones inoculadas, los aislados obtenidos a partir de muestras de ese mosto en una etapa avanzada de fermentación, muestren el mismo perfil molecular que la cepa inoculada, lo cual indica un alto nivel de implantación del inóculo.

Los resultados arrojados por esta técnica (Figura 20) indicaron que para la levadura EC1118 la implantación fue del 100% para la mayoría de las muestras de las tres zonas, observándose solo en la banda "R1" de Gualtallary una ligera diferencia, por lo que para esta se estimó una implantación levemente menor al 100%.

Los perfiles de implantación de la levadura Tango Malbec fueron, en todos los casos, idénticos al del control, indicando de esta manera una implantación de la cepa del 100% en los procesos fermentativos de las tres zonas.

Respecto a la cepa Ionys, solo la banda "R2" de la zona de Ugarteche exhibió un perfil ligeramente diferente al de su cepa de control, por lo que la implantación se estimó en menos del 100% para dicha cepa.

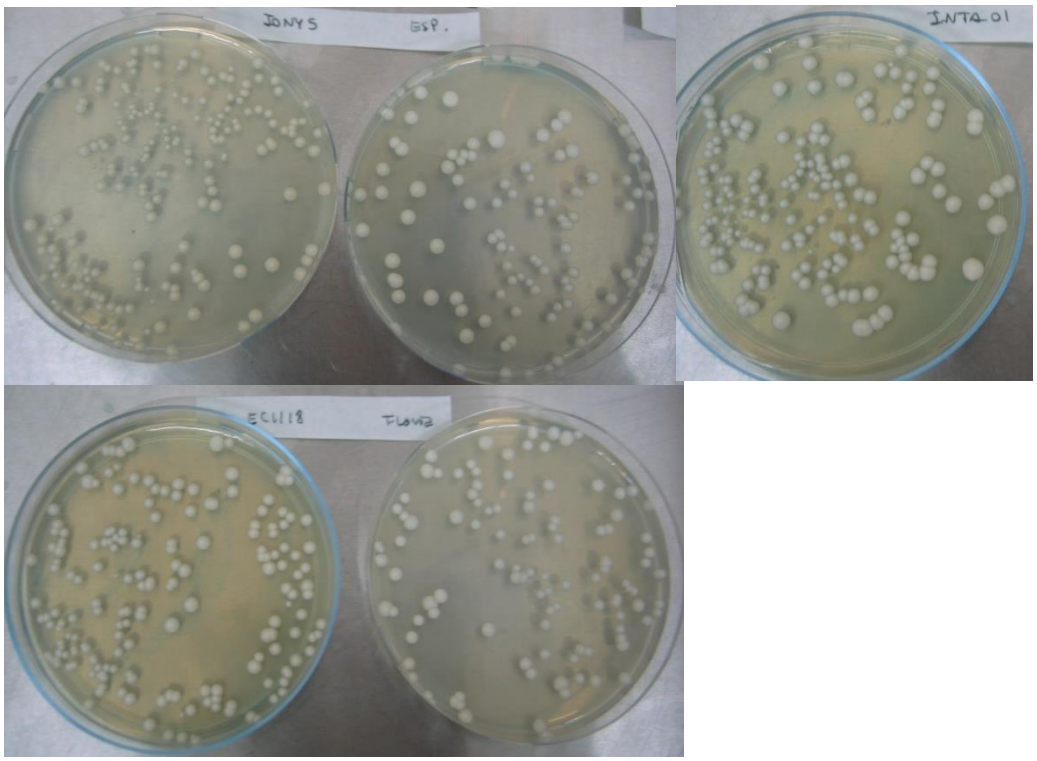

Figura 19: Colonias de levaduras provenientes de las vinificaciones de la zona El Cepillo, aisladas en medio YPD. De izquierda a derecha: Ionys, Espontánea, EC1118, Flavia, Tango Malbec.

En cuanto a las fermentaciones realizadas por inoculación secuencial (denominada FLAVIA en la figura 20), los perfiles fueron idénticos entre sí pero fueron completamente diferentes a la cepa de control, esto puede deberse a que pasadas 48h de la inoculación de la cepa FLAVIA, se procedió a inocular la levadura EC1118, momento en el cual ya estaba iniciada la fermentación por lo que pudo haber tomado protagonismo del proceso otra cepa de levadura, ya sea nativa u otra comercial que eventualmente haya tomado contacto con el mosto, por ejemplo a partir del equipamiento de la bodega. Esto ha sido previamente observado que ocurre en la bodega, con la aparición de cepas utilizadas para algunas fermentaciones en tanques no inoculados, evidenciando una "transferencia horizontal" de cepas entre tanques a partir de la manipulación habitual en estos lugares (Mercado *et al*., 2007).

Por lo tanto, salvando el caso de la fermentación con FLAVIA, se puede decir que el control de implantación reveló que en cada tratamiento las fermentaciones se realizaron exitosamente con las cepas inoculadas, resultando en la mayoría de los casos un nivel de implantación del 100%.

Respecto a la fermentación espontánea, los perfiles genéticos fueron diferentes entre repeticiones y entre zonas, demostrando que las cepas nativas difieren entre y dentro de una misma zona (Mercado *et al*., 2007) y que en ningún caso estos perfiles coincidieron con las cepas comerciales. A partir de este resultado se decidió no tomar en cuenta los tratamientos de fermentaciones espontáneas en el análisis factorial, debido a que el factor levadura no era el mismo entre repeticiones y zonas.

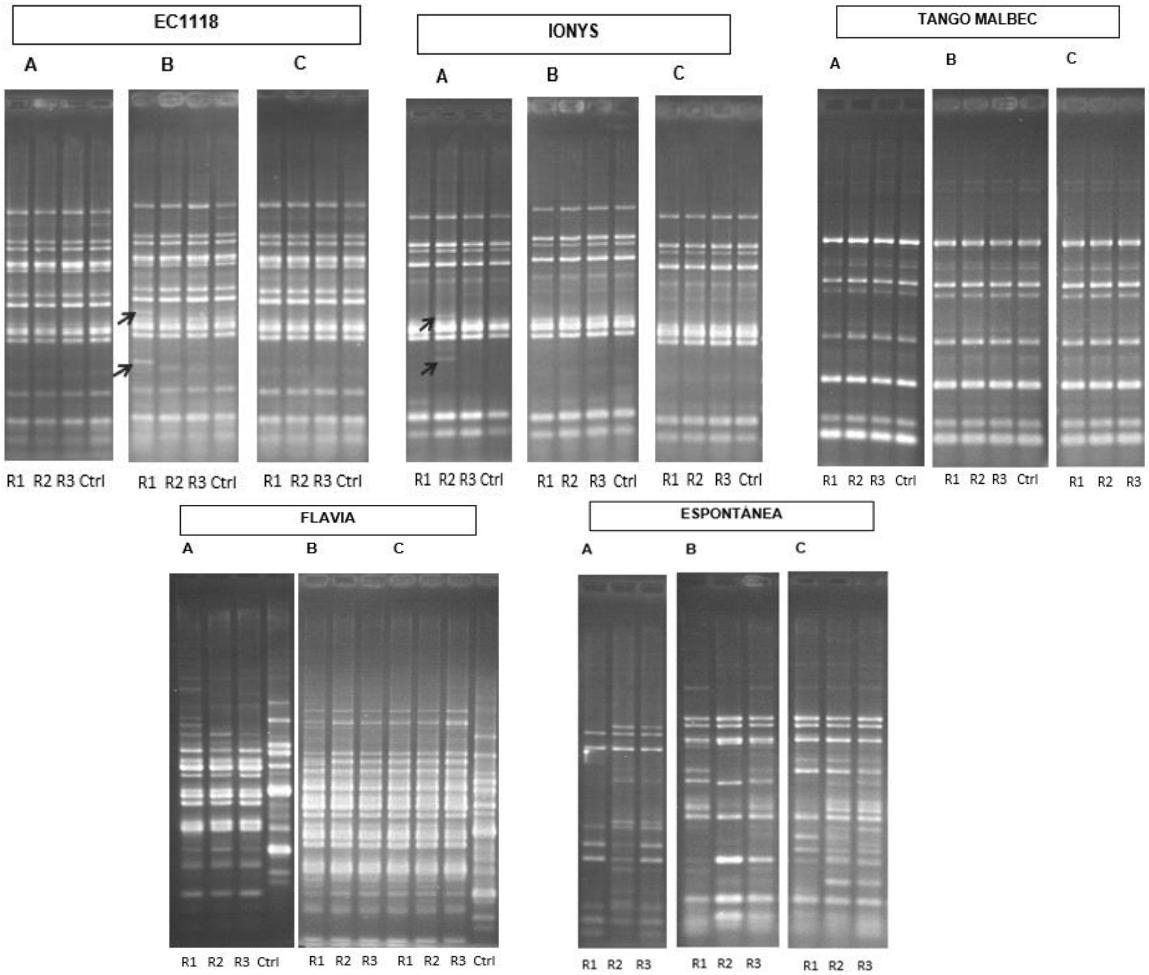

Figura 20: Perfiles de implantación de las levaduras inoculadas en las tres zonas estudiadas. A: Ugarteche; B: Gualtallary; C: El Cepillo.

3.2.3 Fermentación Maloláctica

La fermentación maloláctica fue realizada como parte del protocolo de vinificación, por medio de inoculación de la bacteria *Oenococcus oeni* al finalizar la fermentación alcohólica y luego del descube. El seguimiento de dicha fermentación se llevó a cabo por cromatografía de papel (Figura 21) que permite presuntivamente observar el consumo del ácido málico y la consecuente producción de ácido láctico. La duración de este proceso fue para todos los casos de aproximadamente 20 días.

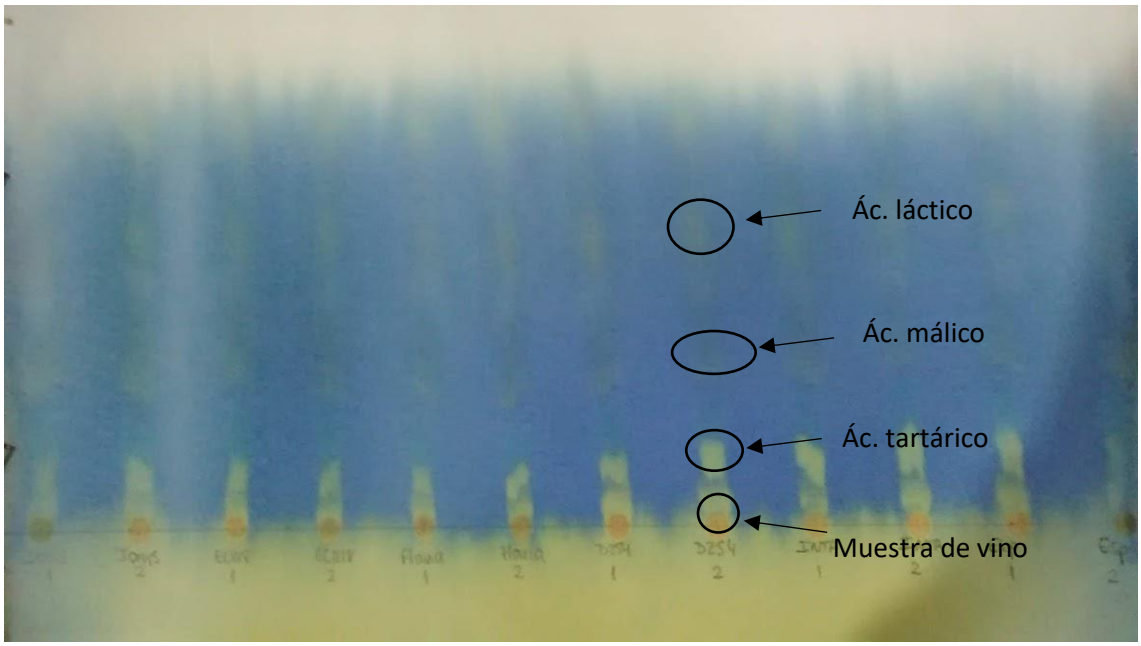

Figura 21: Cromatografía de papel de muestras de la zona de Gualtallary, dos días antes de la finalización de la FML.

3.3 Análisis finales en vinos

3.3.1 Análisis físico-químicos

Finalizado el proceso de vinificación, se procedieron a realizar las determinaciones analíticas correspondientes al pH, Acidez Total, Acidez Volátil y Alcohol a todas las unidades experimentales.

El análisis de la varianza (Tabla 9) reveló que no hubo efecto interactivo entre zona y levadura sobre ninguno de los parámetros medidos, ya que el p-valor fue mayor a 0,05. Es decir, que cada nivel dentro de cada factor se comportó de igual manera en la combinación de factores, pero si se observó un significativo efecto zona o levadura por separado (efectos principales).

Respecto al factor levadura, se observó que las variables pH, Acidez Total y Alcohol fueron fuertemente afectados por las diferentes cepas. En mayor medida este efecto se observó en la cepa Ionys, la cual produjo mayores valores de acidez total y menores de pH y alcohol en las tres zonas, reduciendo el grado de alcohol en un valor del 0,5%, lo que se debe a la capacidad de esta cepa de desviar su actividad metabólica hacia la mayor producción de glicerol y por lo tanto menor de etanol (Tilloy *et al.,* 2014; Englezos *et al*., 2017). También se observó que la cepa Flavia tuvo un comportamiento similar al de Ionys respecto al pH, esta última produce mayor cantidad de ácido succínico como resultado de su desviación metabólica (Tilloy *et al.,* 2014) (Figura 22).

Teniendo en cuenta los valores de Acidez Volátil, se observó que los menores niveles en este parámetro correspondieron a la cepa Ionys con una diferencia de valores, como mínimo de 0,15 g/L, respecto a las otras cepas de levaduras en una misma zona, seguido de los vinos en los que se utilizó la cepa de levadura Flavia.

Por otro lado, la zona de El Cepillo mostró menores niveles de alcohol y Gualtallary los mayores. Este resultado puede interpretarse en función de las diferencias observadas en los mostos (sección 3.1.1), donde el mosto de El Cepillo presentó menores valores de nivel azucarino correspondiente a una menor madurez. En cuanto a los vinos de la zona de Ugarteche, éstos presentaron mayores niveles de pH, concordante con menores niveles de acidez, sin embargo, sus mostos inicialmente se caracterizaron por sus menores valores de pH respecto a los mostos de las demás zonas. Una posible causa de este cambio en el vino respecto del mosto, puede deberse al elevado contenido de potasio (K^+) normalmente presente en mostos de esta región (aspecto no verificado en el presente estudio) y los cuales pueden ocasionar disminución en acidez e incremento de pH, por precipitación de los aniones tartratos como bitartrato de potasio (Kodur, 2011).

Por lo tanto, el factor “zona” afectó significativamente el contenido de alcohol debido a la diferencia de composición físico-química de los mostos que se pudo evidenciar para las uvas de las diferentes zonas.

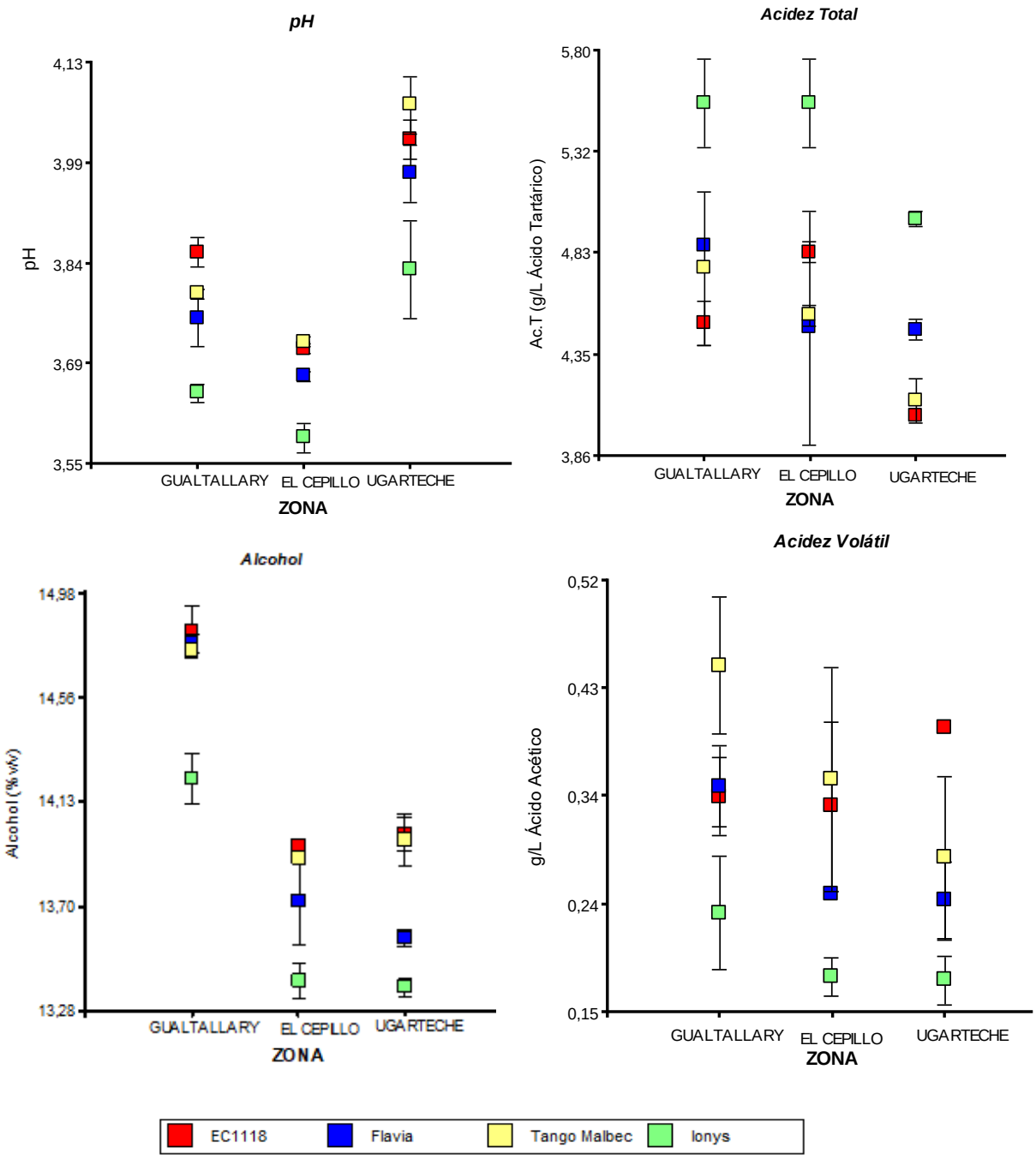

Figura 22: Gráfico de puntos de los análisis finales en vino

Tabla 9: Valores promedios ± desviación estándar de los análisis finales de los vinos de cada región vitícola analizada fermentados por las diferentes cepas de levaduras.

ZONA	LEVADURAS	pH	Ac.Total (g/L)	Ac.Volátil (g/L)	Alcohol (%v/v)
EL CEPILLO	EC1118	3,72 ± 0,01¨ bcd	4,84 ± 0,05 cd	0,33 ± 0,07 bcd	13,95 ± 0 e
	FLAVIA	3,68 ± 0,01 bc	4,48 ± 0,56 abc	0,25 ± 0 abc	13,73 ± 0,18 cd
	TANGO MALBEC	3,73 ± 0,01 cde	4,54 ± 0,05 bcd	0,35 ± 0,1 cde	13,9 ± 0 de
	IONYS	3,59 ± 0,02 a	5,55 ± 0,21 e	0,18 ± 0,02 a	13,4 ± 0,07 ab
GUALTALLARY	EC1118	3,86 ± 0,02 g	4,5 ± 0,11 abc	0,34 ± 0,03 bcd	14,83 ± 0,11 g
	FLAVIA	3,76 ± 0,04 def	4,87 ± 0 cd	0,35 ± 0,04 cde	14,78 ± 0,04 g
	TANGO MALBEC	3,8 ± 0,01 efg	4,76 ± 0,37 cd	0,45 ± 0,06 e	14,75 ± 0 g
	IONYS	3,65 ± 0,01 ab	5,55 ± 0,21 e	0,24 ± 0,05 ab	14,23 ± 0,11 f
UGARTECHE	EC1118	4,02 ± 0,03 hi	4,05 ± 0 a	0,4 ± 0 de	14 ± 0,07 e
	FLAVIA	3,97 ± 0,04 h	4,47 ± 0,05 abc	0,25 ± 0,03 abc	13,58 ± 0,04 bc
	TANGO MALBEC	4,07 ± 0,04 i	4,13 ± 0,11 ab	0,28 ± 0,07 abc	13,98 ± 0,11 e
	IONYS	3,83 ± 0,07 fg	5 ± 0,04 d	0,18 ± 0,02 a	13,38 ± 0,04 a
	ZONA(Z)	***	**	**	***
	LEVADURA(L)	***	***	**	***
	ZxL	*	*	*	*

¨letras diferentes indican diferencias estadísticas de la aplicación del análisis de la varianza con test LSD Fisher, p-valor<0,05. ***p<0,001; **p<0,05; *p>0,05

Respecto al análisis del color del vino se realizaron las determinaciones de intensidad colorante, índice de polifenoles totales y antocianos totales. En la Tabla 10 se encuentran detalladas las determinaciones cromáticas y de composición polifenólica analizadas.

Tabla 10: Valores de intensidad colorante (IC), índice de polifenoles totales a 280 nm (IPT) y antocianos totales (AT) de los vinos de tres zonas geográficas fermentados por diferentes levaduras.

ZONA	LEVADURAS	IC	IPT	AT(mg/L)
EL CEPILLO	EC1118	1,44 ± 0,04 ¨ab	86,85 ± 1,63 d	918,09 ± 32,48 bc
	FLAVIA	1,65 ± 0,15 cd	85,2 ± 13,86 d	985,69 ± 64,97 cde
	TANGO MALBEC	1,85 ± 0,12 e	94,3 ± 5,94 d	1051,09 ± 45,48 def
	IONYS	1,99 ± 0,03 ef	83,9 ± 7,78 cd	924,66 ± 31,86 bcd
GUALTALLARY	EC1118	1,58 ±0,11 bc	82,26 ±5,06 bcd	1029 ± 158,39 cde
	FLAVIA	1,83 ± 0,08 de	113,65 ± 10,11 e	1173,59 ± 20,73 f
	TANGO MALBEC	1,65 ± 0,03 cd	92,85 ± 9,4 d	1170,75 ± 37,12 f
	IONYS	2,1 ± 0,08 f	112,6 ± 0,57 e	1052,19 ± 9,28 ef
UGARTECHE	EC1118	1,43 ± 0,07 ab	69,35 ± 5,87 abc	833,74 ± 8,85 ab
	FLAVIA	1,37 ± 0,12 a	55,65 ± 0,49 a	903 ± 63,73 bc
	TANGO MALBEC	1,47 ± 0,09 abc	68,05 ± 6,15 ab	913,72 ± 33,72 bc
	IONYS	1,5 ± 0,08 abc	54,6 ± 5,09 a	764,97 ± 16,4 a
	ZONA(Z)	***	***	***
	LEVADURA(L)	***	*	**
	ZxL	**	**	*

¨valores promedios ± desviación estándar, letras diferentes indican diferencias estadísticas de la aplicación del análisis de la varianza con test LSD Fisher, p-valor<0,05.
***p<0,001; **p<0,05; *p>0,05

El efecto producido por las zonas sobre los parámetros analizados fue muy significativo (p<0,001) destacándose la zona de Ugarteche, la cual presentó los menores niveles de color, antocianos e intensidad colorante, mientras que la zona de Gualtallary presentó los mayores niveles de estos parámetros. Estos resultados podrían deberse a las diferencias ambientales generadas por la altura, coincidente a otras publicaciones que indicaron mayor riqueza fenólica en uvas Malbec para regiones de mayor altura (Berli *et al*., 2008 ; Fanzone 2012).

Respecto al efecto levadura, este fue muy significativo (p<0,001) sobre la intensidad colorante, donde los mayores niveles fueron alcanzados por la levadura Ionys seguida de Tango Malbec. Este resultado es interesante, ya que los mayores niveles alcanzados en los vinos fermentados por Ionys se explicarían por la disminución del pH que esta cepa provocó en el vino, lo que conllevó a un aumento en la intensidad colorante (Zamora, 2003); mientras que el efecto de la levadura Tango Malbec se debió al mayor

contenido de antocianos libres y por lo tanto un consecuente mayor nivel de índice de polifenoles totales, aunque esto no fue siempre significativo en cada zona.

Por otro lado, la levadura EC1118 alcanzó los menores niveles de estos parámetros y Flavia con un nivel un poco superior a ésta, no logró diferenciarse de la misma.

La levadura Ionys en general mostró un menor nivel de antocianos e IPT, debido a que por el bajo pH y menor grado alcohólico de los vinos se ve favorecido el fenómeno de copigmentación eliminando del medio compuestos antocianos en forma libre y brindando una mayor estabilidad en el tiempo al vino (Boulton, 2001).

Respecto a la interacción Zona*Levadura, hubo un efecto sobre los parámetros IC e IPT con un p-valor< 0,05, demostrando, por ejemplo, que las levaduras no se diferenciaron de igual manera en todas las zonas con respecto a estas variables (Figura 23).

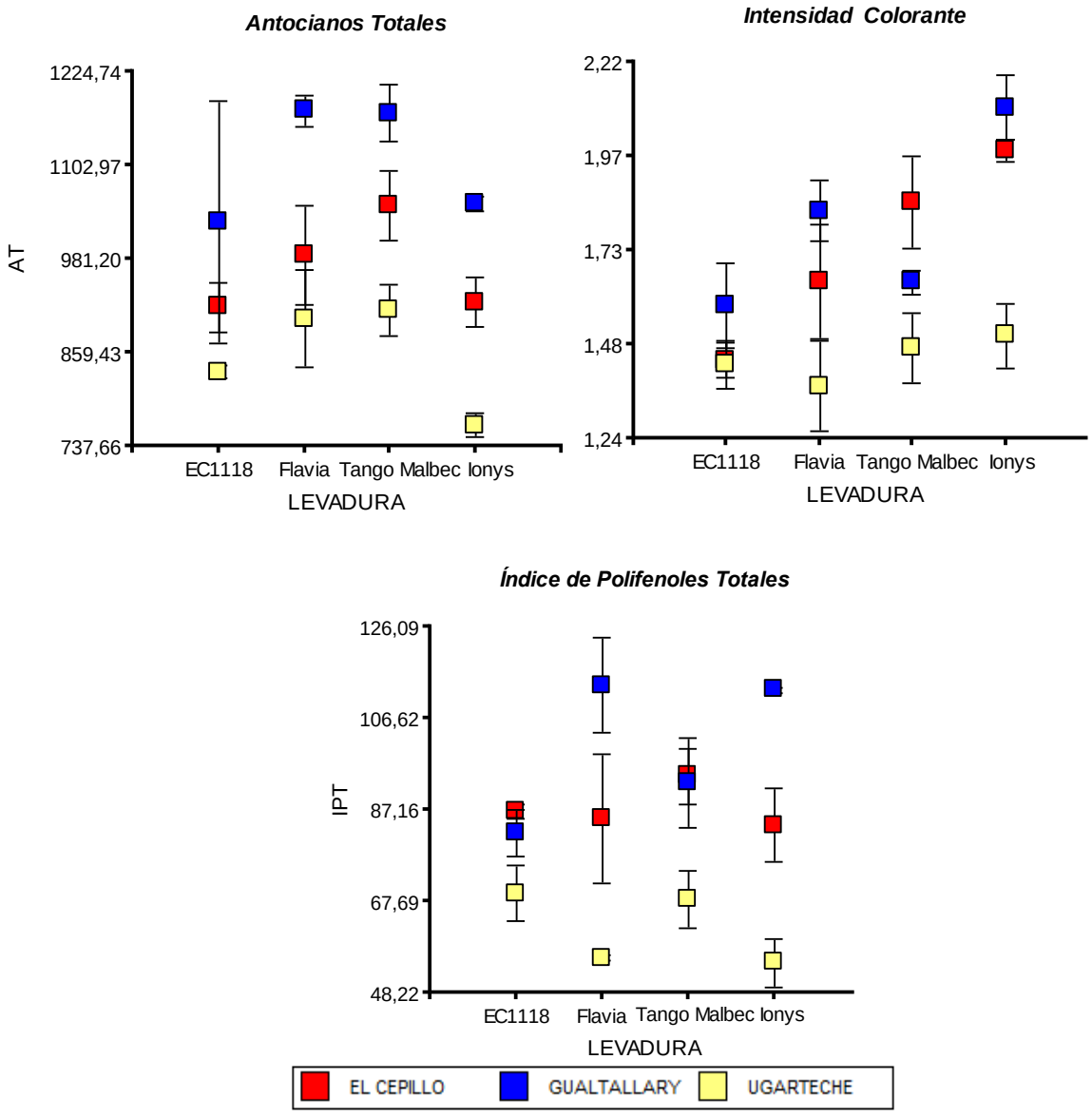

Figura 23: Gráfico de puntos de las determinaciones de color en los vinos de las diferentes zonas geográficas fermentados por distintas cepas de levaduras.

3.3.2 Análisis Sensorial

Sensorialmente se evaluaron 3 atributos aromáticos (vegetal, fruta fresca y fruta madura) y 2 atributos en boca (astringencia y amargo).

Se analizó estadísticamente el efecto por separado de los factores zonas y levaduras sobre los atributos sensoriales, como así también el efecto interacción.

Dicho análisis no arrojó diferencias estadísticamente significativas respecto al efecto de las levaduras sobre los atributos sensoriales, pero, si se observaron perfiles sensoriales diferentes (Figura 24).

La levadura Tango Malbec se caracterizó por presentar el mayor valor en el atributo “amargo” para todas las zonas, mientras que la levadura EC1118 otorgó una mayor nota a fruta fresca en la zona de Ugarteche diferenciándose de las otras dos zonas donde su mayor valor fue para el atributo “fruta madura”.

Respecto al efecto zona, los vinos de Gualtallary resultaron con perfiles sensoriales similares entre sí respecto a las levaduras.

Al aplicar el ANAVA ($p<0,05$) (ANEXO III) con respecto al factor zona sobre los atributos sensoriales, la zona Gualtallary mostró un efecto significativo sobre los atributos sensoriales “fruta madura” y “astringencia”, diferenciándose respecto a las otras zonas; mientras que en la zona de Ugarteche se destacó un efecto significativo sobre el atributo sensorial “amargo”.

Respecto al efecto interacción Zona*Levadura, se observó que la levadura EC1118 en los vinos de la zona de Ugarteche alcanzaron su mayor valor en el atributo fruta fresca, mientras que la misma levadura en la zona Gualtallary el atributo sensorial fruta madura fue percibido con gran intensidad.

Como conclusión, existió un gran efecto de la zona sobre los perfiles sensoriales de los vinos caracterizándolos por encima del efecto de la levadura.

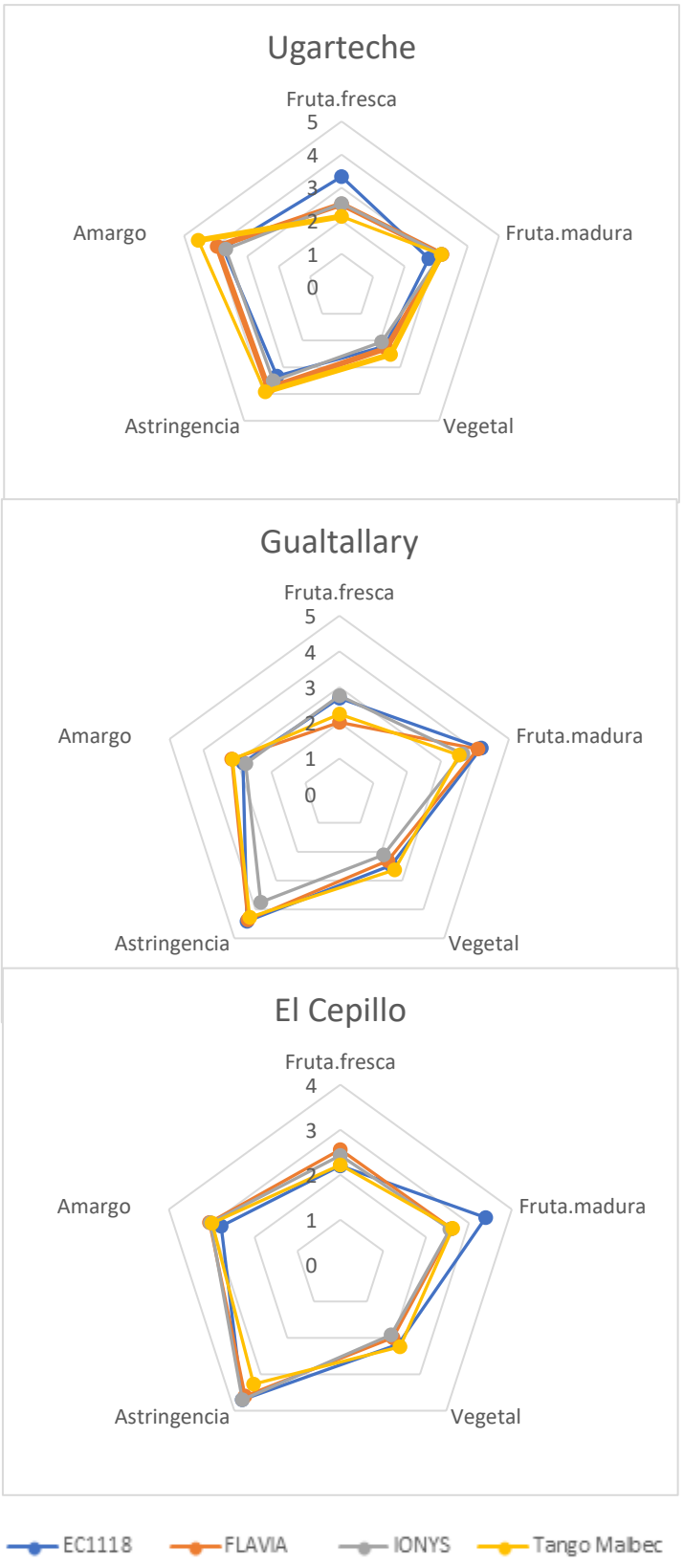

Figura 24: Media de las intensidades percibidas por los degustadores en el análisis sensorial descriptivo de los vinos Malbec de tres zonas fermentados por diferentes levaduras.

3.3.3 Análisis de componentes principales

Como forma de visualización general de la incidencia de los factores levadura y zona sobre todos los parámetros medidos, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (Figura 25). El mismo permitió explicar el 73% de la variabilidad existente entre los datos.

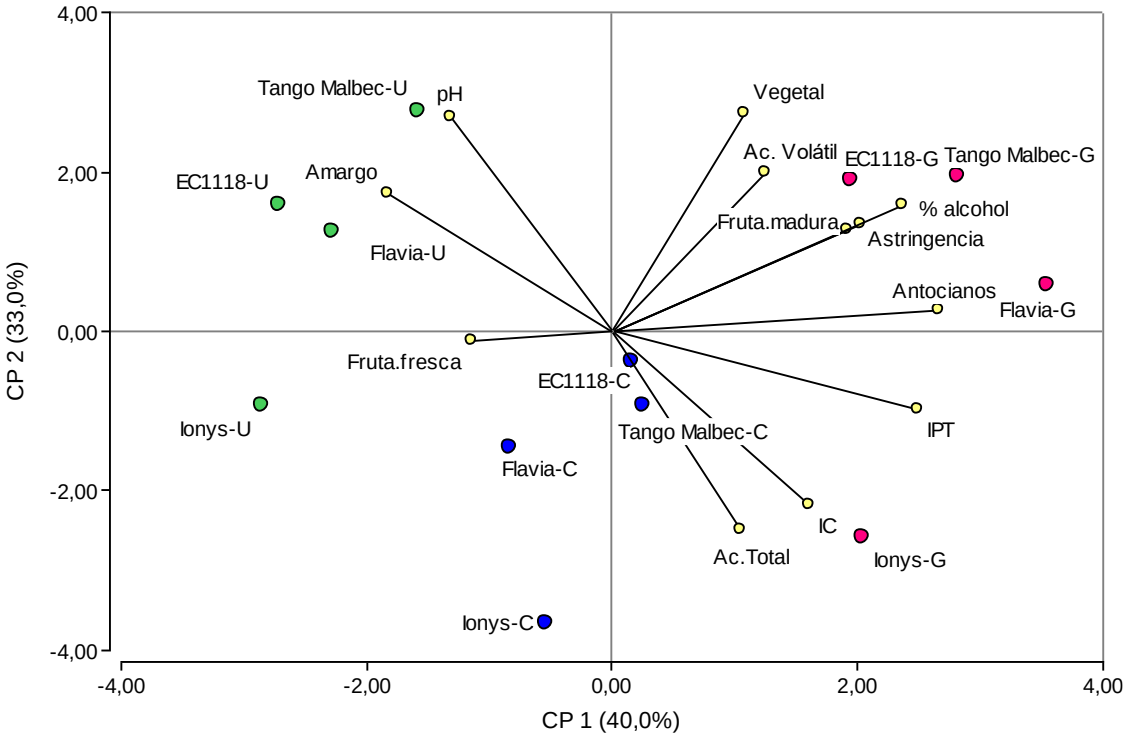

Figura 25: Gráfico biplot del análisis de componentes principales de los parámetros medidos en los vinos Malbec de 3 zonas diferentes fermentados por diferentes levaduras.

En primer lugar, se puede observar un fuerte efecto de la zona sobre los diferentes parámetros medidos permitiendo una clara agrupación de los tratamientos según el origen de la uva.

Respecto a la CP1, en el lado positivo de la misma se ubicaron los tratamientos correspondientes a la zona de Gualtallary caracterizándose por los mayores valores en grado alcohólico, acidez volátil, antocianos, nota vegetal, fruta madura y astringencia. Se destaca el tratamiento Ionys-G, el cual se separa del resto de las levaduras acercándose a una mayor intensidad colorante y acidez total.

Este comportamiento de la levadura Ionys se observa por igual en las otras dos zonas, en las cuales se separa del resto de las levaduras marcando un efecto sobre el vino relacionado con la nota de fruta fresca, acidez total, índice de polifenoles totales e intensidad colorante.

Así también se puede observar que la zona de Ugarteche se caracterizó por los mayores niveles de pH, nota amarga y fruta fresca.

4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se pudo observar que existió una diferenciación inicial de los mostos provenientes de las diferentes regiones vitivinícolas de Mendoza, tanto físico-química como microbiológicamente.

Así también, se observaron grandes influencias individuales de los factores Zona y Levadura sobre los parámetros medidos en los vinos, resultando el factor levadura con influencia muy significativa sobre las características físico-químicas de los vinos, destacándose la cepa de levadura Ionys, la cual produjo los mayores niveles de acidez total y los menores valores de pH, alcohol y acidez volátil. En cuanto al efecto de la Zona, éste fue muy significativo frente a los parámetros de color, destacándose la zona de Gualtallary por presentar los mayores niveles de estos.

Respecto al análisis sensorial, se observó un efecto significativo de la zona, mientras que la influencia de la cepa de levadura permitió obtener en algunos casos diferentes perfiles sensoriales según la zona.

Por lo que se puede concluir, que algunos de los parámetros del vino se encuentran fuertemente influenciados por la región vitivinícola de origen, mientras que otros por la cepa de levadura, como así también existe un efecto interacción de dichos factores sobre algunos de los parámetros como IC e IPT.

5. BIBLIOGRAFÍA

Bandera, M.P. (2018). Vinos naturales : la moda que explota en Europa ya pone un pie en Argentina. [en linea] [Consulta : 19 marzo 2020] Disponible en : https://www.clarin.com/buena-vida/vinos-naturales-moda-explota-europa-pone-pie-argentina_0_H1h7LpT6f.html

Bayonove, C., Baumes, R., Crouzet, J., & Günata, Z. (2003). Aromas. En Enología: fundamentos científicos y tecnológicos (coord. C., Flanzy) 2° Ed. Madrid: Mundiprensa (pp. 137–176).

Belda, I., Navascués, E., Alonso, A., Marquina, D., & Santos, A. (2014). Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras Saccharomyces cerevisiae autóctonas con óptimas propiedades enológicas. *Reduca (Biología), 7(1).*

Berli, F., D'Angelo, J., Cavagnaro, B., Bottini, R., Wuilloud, R., & Silva, M. F. (2008). Phenolic Composition in Grape (Vitis vinifera L . cv . Malbec) Ripened with Different Solar UV-B Radiation Levels by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56,* pp. 2892–2898.

Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American journal of enology and viticulture*, *52*(2), 67-87.

Carrascosa, A. V., Muñoz, R., & González García, R. (2005). *Microbiología del vino*. AMV ediciones.

Catania, C., Avagnina, S. (2007a). El análisis sensorial. Curso de degustación superior [en línea] [Consulta: 10 mayo 2019]. Disponible en: https://inta.gob.ar/documentos/curso-de-degustacion-de-vinos

Catania, C., Avagnina, S. (2007b). Malbec. Curso de degustación superior [en línea] [Consulta: 10 mayo 2019]. Disponible en: https://inta.gob.ar/documentos/curso-de-degustacion-de-vinos

Catania, C., Avagnina, S. (2007c). El terruño. Curso de degustación superior [en línea] [Consulta: 10 mayo 2019]. Disponible en: https://inta.gob.ar/documentos/curso-de-degustacion-de-vinos

Cheynier, V., Moutounet, M., & Sarni-Manchado, P. (2000). Los compuestos fenólicos. En *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*; Flanzy, C. (Ed.), AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 1st ed., pp. 114-136

Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina*. International journal of food microbiology, 99(3),* 237-243.

Cortell, J., Kennedy, H. (2006). Effect of Shading on Accumulation of Flavonoid Compounds in (Vitis vinifera L.) Pinot Noir Fruit and Extraction in a Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, pp.* 8510-8520

Costa, E., da Silva, J. F., Cosme, F., & Jordão, A. M. (2015). Adaptability of some French red grape varieties cultivated at two different Portuguese terroirs : Comparative analysis with two Portuguese red grape varieties using physicochemical and phenolic parameters. *Food Research International*, *78*, pp. 302–312.

Del Mónaco, S. M., Rodríguez, M. E., & Lopes, C. A. (2016). Pichia kudriavzevii as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International Journal of Food Microbiology*, *230*, 31–39.

Englezos, V., Cravero, F., Torchio, F., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Lambri, M., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L., Oxygen availability and strain combination modulate yeast growth dynamics in mixed culture fermentations of grape must with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Microbiology* (2017), doi: 10.1016/j.fm.2017.08.007.

Fanzone, M. (2012). Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (Vitis vinifera L) y su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España. 368 p.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology*, *86*(1-2), 11-22.

Fondo Vitivinícola Mendoza (2009). La cultura de la vid y el vino: La vitivinicultura hace escuela. [En línea]: http://www.fondovitivinicola.com.ar/page_educacion.php 190p.

Foroni, F., Vignando, M., Aiello, M., Parma, V., Guido, M., Squartini, A., & Rumiati, R. I. (2017). The smell of terroir ! Olfactory discrimination between wines of different grape variety and different terroir. *Food Quality and Preference*, *58*, 18–23

Gamero, A. (2011). *Study of the production and release of aromas during winemaking carried out by different Saccharomyces species and hybrids*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Hernández-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., & Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry, 107(3),* 1064–1077.

INV (2018) Instituto Nacional de Vitivinicultura. Análisis de la evolución de la superficie de vid por provincias [en linea] [Consulta : 19 marzo 2020] Disponible en : https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/analisis_evolucion_de_superficie_2000-2016.pdf

INV (2019a) Instituto Nacional de Vitivinicultura. Estadísticas Vitivinícolas. Variedades de uva. Malbec [en línea]. [Consulta: 10 mayo 2019]. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/inv/vinos/estadisticas/variedades-de-uva

INV (2019b) Instituto Nacional de Vitivinicultura. Estadísticas Vitivinícolas. Variedades de uva. Malbec: Historia y presente en Argentina [en línea]. [Consulta: 10 mayo 2019]. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/inv/vinos/estadisticas/variedades-de-uva

Kodur, S. (2011). Effects of juice pH and potassium on juice and wine quality, and regulation of potassium in grapevines through rootstocks (Vitis): a short review. *VITIS Journal of Grapevine Research*, *50*(1), 1-6.

Lallemand, Inc. (2019). Catálogo. Disponible en: https://www.lallemandwine.com/es/south-america/productos/catalogo/

Matus, M. S., & Rodríguez, J. (1997). Variedades de vid cultivadas en Mendoza (Argentina). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, *29*(2).

Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., & Combina, M. (2007). Diversity of Saccharomyces strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food microbiology*, *24*(4), 403-412.

Miguel-Tabares, J.A., Martin-Luis, B., Carrillo-Lopez, M., Diaz-Diaz, E., & Darias-Martin, J. (2002). Effect of altitude on the wine-making potential of listan negro and ruby cabernet cultivars in the south of Tenerife island. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 36,* n°4, 185-194.

Monagas M., Suarez R., Gómez-Cordovés C., & Bartolomé B. (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC - DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture, 56*, pp. 139-147.

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2007). Evaluation of different Saccharomyces cerevisiae strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food chemistry*, *104*(2), 814-823.

Mori, K., Sugaya, S., & Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae 105,* 319-330.

Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., & Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany, Vol. 58, No. 8*, pp. 1935–1945.

Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV) (2010), Definición de terroir vitivinícola. Resolución OIV/VITI 333/2010 [en línea] [Consulta: 23 Julio 2019]. Disponible en: http://www.oiv.int/public/medias/380/viti-2010-1-es.pdf

Organización Internacional de la Vid y Vino (OIV) (2013). *Compendium of international methods of wine and must analysis. Vol. 1 y 2*. Paris: OIV.

Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines*. J. Wiley.

Pandolfi, C., & Cuello, I. (2005). Reseña de la vitivinicultura argentina. [en línea] [Consulta: 13 junio 2019]- Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia69_03.htm

Pérez M.D. (2016). *Efecto de la temperatura de fermentación y de la nutrición con amonio sobre la cinética de fermentación y el perfil aromático de vinos cv. Torrontés Riojano.* Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast, 16(8)*, 675-729.

Prieto, J., Aliquo, G., Torres, M., Fanzone, M., Sari, S., Palazzo, M. & Perez-Peña, J. (2017). Variedades criollas de vid: diversidad genética y potencial enológico aún sin explotar. [en línea] [Consulta: 12 junio 2019]. Disponible en: https://inta.gob.ar/noticias/variedades-criollas-de-vid-diversidad-genetica-y-potencial-enologico-aun-sin-explotar

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Ed. 2). John Wiley & Sons.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (Eds.). (2006). *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine-Stabilization and Treatments* (Ed. 2). John Wiley & Sons.

Robinson, A. L., Boss, P. K., Solomon, P. S., Trengove, R. D., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2014). Origins of grape and wine aroma. Part 1. Chemical components and viticultural impacts. *American Journal of Enology and Viticulture*, *65*(1), 1-24.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International journal of food microbiology*, *86*(1-2), 169-180.

Scarsi, H., Gomez-Talquenca, S., & Catania, C. (2005). Informe: Selección clonal de Malbec en Argentina. Artículos Ärea del vino. [en línea]. [Consulta: 19 junio 2019]. Disponible en: http://areadelvino.com/articulo.php?num=4809

Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., & Dequin, S. (2014). Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae under hyperosmotic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(8), 2623-2632.

Zamora, F. (2003). “Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos”. AMV Ediciones. Mundi-Prensa, Madrid. 225p.

6. ANEXOS

I) Análisis físico-químicos del mosto y vino

1. Sólidos solubles por refractrometría (OIV, 2013)

Se utilizó un refractrómetro tipo Abbe graduado en índice de refracción (precisión ± 0,10 Brix), el cual permite realizar mediciones a una temperatura entre 20 ± 5°C.

- Calibrar el refractrómetro con agua destilada, cuya medición debe dar cero en la escala sacarina.
- Llevar la muestra a una temperatura cercana a 20°C
- Colocar una pequeña muestra sobre prisma inferior teniendo cuidado de que la muestra cubra la superficie del vidrio de manera uniforme, si es necesario pasar muestra a través de una gasa seca.
- Realizar la medición enfrentando el aparato a una fuente de luz y manteniendo la temperatura a 20°C, de lo contrario realizar correcciones de temperatura según tablas presentes en la resolución de la OIV, 2019.
- Realizar al menos dos mediciones sobre la misma muestra.

El resultado de la lectura se expresó en °Brix.

2. pH por potenciometría (OIV, 2013)

Se utilizó un medidor de pH el cual debe calibrarse para su uso según las instrucciones del fabricante.

- Colocar en un vaso de precipitados un volumen de muestra de mosto, aproximadamente 50 ml
- Introducir el electrodo de forma que quede totalmente sumergido
- Realizar la lectura cuando el valor se estabilice

Técnica realizada según protocolos de la OIV, 2013.

3. Acidez total (OIV, 2013)

Se realizó por titulación ácido-base

- Colocar en un Erlenmeyer, 10 ml de vino medidos con pipeta de doble aforo
- Añadir 30 ml de agua destilada y 2-3 gotas de indicador azul de bromotimol
- Titular con solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta que el color cambie a azul verdoso
- Expresar el resultado en g/L de ácido tartárico, según el siguiente cálculo:

$A' = 0.075 \times n$ donde A= 10. n, siendo n= ml gastados

4. Acidez volátil (OIV, 2013)

La acidez volátil del vino se encuentra representada por las formas ácidas de la serie del acético en estado libre y combinado como sales. El método de determinación consistió en:

- Primeramente, eliminar el CO_2 de la muestra mediante aplicación de vacío.
- Destilar por arrastre de vapor 10 ml de vino con 1 ml de ácido tartárico al 25%
- Recibir 100 ml del destilado, separando de esta forma los ácidos volátiles

- Realizar una triple titulación, 1°) titular con una solución de hidróxido de sodio 0,1M usando dos gotas de fenoftaleína como indicador, 2°) agregar cuatro gotas de ácido clorhídrico diluido, 2ml de solución de almidón y algunos cristales de yoduro de potasio, valorar el dióxido de azufre libre con solución de yodo 0,005M, 3°) agregar solución saturada de tetraborato de sodio hasta que vuelva a aparecer la coloración rosa y valorar el dióxido de azufre combinado con la solución de yodo 0,0005M.
- Expresar el resultado en g/L de ácido acético

g/L= 0.300 (n - 0.1 n '- 0.05 n '')

Donde:

n: ml de hidróxido de sodio gastado en la primera titulación

n': ml de yodo gastado en la segunda titulación

n'': ml de yodo gastado en la tercera titulación

5. Grado alcohólico volumétrico. Método aerométrico (OIV, 2013).

El grado alcohólico volumétrico se considera equivalente al número de litros de etanol contenidos en 100 L de vino, medidos a 20ºC.

- Medir en un matraz volumétrico 200 ml de vino y registrar su temperatura
- Transferir el vino al matraz de destilación, enjuagar el matraz volumétrico 2 o 3 veces con pequeñas porciones de agua.
- Neutralizar el vino con 10 ml de hidróxido de calcio 2mol/L
- Destilar recogiendo aproximadamente 2/3 partes del volumen inicial
- Llevar a temperatura de 20°C y enrasar a 200ml con agua destilada
- Colocar en una probeta adecuada y medir la densidad empleando un aerómetro (alcohómetro de Gay-Lussac)
- Expresar el resultado en porcentaje de alcohol (v/v)

II) Tabla de datos mostos:

ZONA	Brix	pH	Acidez Total
EL CEPILLO	23,4	3,5	5,85
EL CEPILLO	23,2	3,49	5,4
EL CEPILLO	23,6	3,51	5,1
EL CEPILLO	23,4	3,49	5,1
EL CEPILLO	23,6	3,53	4,65
EL CEPILLO	23,6	3,53	5,25
EL CEPILLO	23,6	3,53	5,4
EL CEPILLO	23,8	3,56	5,4
EL CEPILLO	23,4	3,49	5,25
EL CEPILLO	23,2	3,53	4,65
EL CEPILLO	23	3,49	5,7
EL CEPILLO	23	3,55	5,25
GUALTALLARY	24,8	3,63	4,2
GUALTALLARY	24,8	3,63	4,35
GUALTALLARY	24,8	3,7	4,5
GUALTALLARY	24,6	3,68	4,05
GUALTALLARY	23,4	3,64	4,2
GUALTALLARY	23,6	3,66	4,35
GUALTALLARY	25	3,66	4,2
GUALTALLARY	25	3,66	4,35
GUALTALLARY	24,8	3,65	4,35
GUALTALLARY	25,2	3,67	4,5
GUALTALLARY	24,8	3,69	4,65
GUALTALLARY	25	3,68	4,5
UGARTECHE	24,4	3,39	6
UGARTECHE	24,2	3,44	5,85
UGARTECHE	24,4	3,41	5,7
UGARTECHE	24,2	3,42	5,85
UGARTECHE	24,2	3,41	5,85
UGARTECHE	24,4	3,46	6
UGARTECHE	24,4	3,38	5,85
UGARTECHE	24,4	3,42	5,85
UGARTECHE	24,2	3,43	5,7
UGARTECHE	24,4	3,42	5,85
UGARTECHE	24,2	3,42	6
UGARTECHE	24,2	3,46	5,85

ZONA	Variable	n	Media	D.E
EL CEPILLO	Brix	12	23,40	0,26
EL CEPILLO	pH	12	3,52	0,02
EL CEPILLO	Acidez Total	12	5,25	0,36
GUALTALLARY	Brix	12	24,65	0,56
GUALTALLARY	pH	12	3,66	0,02
GUALTALLARY	Acidez Total	12	4,35	0,17
UGARTECHE	Brix	12	24,30	0,10
UGARTECHE	pH	12	3,42	0,02
UGARTECHE	Acidez Total	12	5,86	0,10

III) ANAVA análisis sensorial

Análisis de la varianza

Fruta.fresca

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Fruta.fresca	203	0,04	0,00	68,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21,50	11	1,95	0,70	0,7418
tratamiento	8,08	3	2,69	0,96	0,4136
Zona	2,02	2	1,01	0,36	0,6982
tratamiento*Zona	11,53	6	1,92	0,68	0,6628
Error	536,52	191	2,81		
Total	558,02	202			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,65636

Error: 2,8090 gl: 191

tratamiento	Medias	n	E.E.	
Tango Malbec	2,20	50	0,24	A
FLAVIA	2,36	51	0,24	A
IONYS	2,57	52	0,24	A
EC1118	2,74	50	0,24	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,58722

Error: 2,8090 gl: 191

Zona	Medias	n	E.E.	
Cepillo	2,35	65	0,21	A
Gualtallary	2,43	90	0,18	A
Ugarteche	2,62	48	0,24	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,17477

Error: 2,8090 gl: 191

tratamiento	Zona	Medias	n	E.E.		
FLAVIA	Gualtallary	2,01	22	0,36	A	
Tango Malbec	Ugarteche	2,13	12	0,48	A	B
EC1118	Cepillo	2,20	16	0,42	A	B
Tango Malbec	Cepillo	2,22	16	0,42	A	B
Tango Malbec	Gualtallary	2,24	22	0,36	A	B
IONYS	Cepillo	2,43	16	0,42	A	B
FLAVIA	Ugarteche	2,50	12	0,48	A	B
IONYS	Ugarteche	2,52	12	0,48	A	B
FLAVIA	Cepillo	2,56	17	0,41	A	B
EC1118	Gualtallary	2,69	22	0,36	A	B
IONYS	Gualtallary	2,76	24	0,34	A	B
EC1118	Ugarteche	3,33	12	0,48		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Fruta.madura

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Fruta.madura	203	0,13	0,08	45,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	62,58	11	5,69	2,53	0,0053
tratamiento	3,55	3	1,18	0,53	0,6641
Zona	46,81	2	23,40	10,42	0,0001
tratamiento*Zona	9,78	6	1,63	0,73	0,6294
Error	429,06	191	2,25		
Total	491,64	202			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,58696

Error: 2,2464 gl: 191

tratamiento	Medias	n	E.E.	
Tango Malbec	3,11	50	0,22	A
IONYS	3,12	52	0,22	A
FLAVIA	3,29	51	0,22	A
EC1118	3,44	50	0,22	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,52513

Error: 2,2464 gl: 191

Zona	Medias	n	E.E.		
Cepillo	2,79	65	0,19	A	
Ugarteche	3,08	48	0,22	A	
Gualtallary	3,86	90	0,16		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,05056

Error: 2,2464 gl: 191

tratamiento	Zona	Medias	n	E.E.			
IONYS	Cepillo	2,56	16	0,37	A		
FLAVIA	Cepillo	2,60	17	0,36	A		
Tango Malbec	Cepillo	2,62	16	0,37	A		
EC1118	Ugarteche	2,77	12	0,43	A	B	
Tango Malbec	Ugarteche	3,17	12	0,43	A	B	C
IONYS	Ugarteche	3,17	12	0,43	A	B	C
FLAVIA	Ugarteche	3,19	12	0,43	A	B	C
EC1118	Cepillo	3,39	16	0,37	A	B	C
Tango Malbec	Gualtallary	3,53	22	0,32	A	B	C
IONYS	Gualtallary	3,64	24	0,31		B	C
FLAVIA	Gualtallary	4,08	22	0,32			C
EC1118	Gualtallary	4,18	22	0,32			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Vegetal

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Vegetal	203	0,03	0,00	57,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,19	11	0,84	0,50	0,9007
tratamiento	4,80	3	1,60	0,96	0,4124
Zona	3,31	2	1,66	0,99	0,3720
tratamiento*Zona	0,49	6	0,08	0,05	0,9995
Error	318,24	191	1,67		
Total	327,43	202			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,50550

Error: 1,6662 gl: 191

tratamiento	Medias	n	E.E.	
IONYS	2,03	52	0,19	A
FLAVIA	2,20	51	0,19	A
EC1118	2,29	50	0,19	A
Tango Malbec	2,47	50	0,19	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,45226

Error: 1,6662 gl: 191

Zona	Medias	n	E.E.	
Cepillo	2,08	65	0,16	A

Ugarteche	2,27	48	0,19	A
Gualtallary	2,38	90	0,14	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,90477

Error: 1,6662 gl: 191

tratamiento	Zona	Medias	n	E.E.		
IONYS	Cepillo	1,92	16	0,32	A	
FLAVIA	Cepillo	1,99	17	0,31	A	
IONYS	Ugarteche	2,06	12	0,37	A	
IONYS	Gualtallary	2,11	24	0,26	A	
EC1118	Cepillo	2,18	16	0,32	A	
EC1118	Ugarteche	2,21	12	0,37	A	
Tango Malbec	Cepillo	2,25	16	0,32	A	
FLAVIA	Ugarteche	2,29	12	0,37	A	
FLAVIA	Gualtallary	2,31	22	0,28	A	
EC1118	Gualtallary	2,47	22	0,28	A	
Tango Malbec	Ugarteche	2,52	12	0,37	A	
Tango Malbec	Gualtallary	2,63	22	0,28	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Astringencia

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Astringencia	203	0,09	0,04	31,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28,67	11	2,61	1,72	0,0719
tratamiento	1,67	3	0,56	0,37	0,7768
Zona	18,32	2	9,16	6,04	0,0029
tratamiento*Zona	8,14	6	1,36	0,89	0,5003
Error	289,73	191	1,52		
Total	318,40	202			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,48233

Error: 1,5169 gl: 191

tratamiento	Medias	n	E.E.	
IONYS	3,65	52	0,18	A
EC1118	3,81	50	0,18	A
Tango Malbec	3,82	50	0,18	A
FLAVIA	3,91	51	0,18	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,43153

Error: 1,5169 gl: 191

Zona	Medias	n	E.E.		
Cepillo	3,57	65	0,15	A	
Ugarteche	3,63	48	0,18	A	
Gualtallary	4,20	90	0,13		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,86329

Error: 1,5169 gl: 191

tratamiento	Zona	Medias	n	E.E.		
Tango Malbec	Cepillo	3,27	16	0,31	A	
EC1118	Ugarteche	3,33	12	0,36	A	
IONYS	Ugarteche	3,51	12	0,36	A	B

FLAVIA	Cepillo	3,60	17	0,30	A	B	
EC1118	Cepillo	3,70	16	0,31	A	B	C
IONYS	Cepillo	3,70	16	0,31	A	B	C
IONYS	Gualtallary	3,75	24	0,25	A	B	C
FLAVIA	Ugarteche	3,78	12	0,36	A	B	C
Tango Malbec	Ugarteche	3,92	12	0,36	A	B	C
Tango Malbec	Gualtallary	4,27	22	0,26		B	C
FLAVIA	Gualtallary	4,36	22	0,26		B	C
EC1118	Gualtallary	4,41	22	0,26			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Amargo

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Amargo	203	0,15	0,11	36,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	47,02	11	4,27	3,16	0,0006
tratamiento	6,01	3	2,00	1,48	0,2209
Zona	37,54	2	18,77	13,89	<0,0001
tratamiento*Zona	3,70	6	0,62	0,46	0,8396
Error	258,10	191	1,35		
Total	305,11	202			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,45524

Error: 1,3513 gl: 191

tratamiento	Medias	n	E.E.		
EC1118	3,13	50	0,17	A	
IONYS	3,16	52	0,17	A	
FLAVIA	3,39	51	0,17	A	
Tango Malbec	3,56	50	0,17	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,40729

Error: 1,3513 gl: 191

Zona	Medias	n	E.E.		
Cepillo	2,96	65	0,14	A	
Gualtallary	2,98	90	0,12	A	
Ugarteche	3,98	48	0,17		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,81480

Error: 1,3513 gl: 191

tratamiento	Zona	Medias	n	E.E.				
IONYS	Gualtallary	2,76	24	0,24	A			
EC1118	Cepillo	2,78	16	0,29	A			
EC1118	Gualtallary	2,84	22	0,25	A			
Tango Malbec	Cepillo	2,99	16	0,29	A	B		
IONYS	Cepillo	3,03	16	0,29	A	B		
FLAVIA	Cepillo	3,05	17	0,28	A	B		
Tango Malbec	Gualtallary	3,15	22	0,25	A	B	C	
FLAVIA	Gualtallary	3,17	22	0,25	A	B	C	
IONYS	Ugarteche	3,68	12	0,34		B	C	D
EC1118	Ugarteche	3,76	12	0,34		B	C	D
FLAVIA	Ugarteche	3,95	12	0,34			C	D
Tango Malbec	Ugarteche	4,55	12	0,34				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)