

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS



**“AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS IMPLICADAS EN EL
PERFIL SENSORIAL DE PISCO PURO ITALIA Y NEGRA CRIOLLA”**

Presentada por:

CÉSAR AUGUSTO NAPA ALMEYDA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

Lima - Perú

2024

AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS IMPLICADAS EN EL PERFIL SENSORIAL DE PISCO PURO ITALIA Y NEGRA CRIOLLA

INFORME DE ORIGINALIDAD

0%

INDICE DE SIMILITUD

0%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 20%

Excluir bibliografía

Activo

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

**“AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS IMPLICADAS EN EL PERFIL
SENSORIAL DE PISCO PURO ITALIA Y NEGRA CRIOLLA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

CÉSAR AUGUSTO NAPA ALMEYDA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Eduardo Morales Soriano
PRESIDENTE

Dr. Luis Condezo Hoyos
ASESOR

Dr. Marcial Silva Jaimes
CO-ASESOR

Dr. Edwin Baldeón Chamorro
MIEMBRO

Dra. Rosana Chirinos Gallardo
MIEMBRO

Dr. Erick Manuel Saldaña Villa
MIEMBRO EXTERNO

Dedicatoria:

A mis padres Luis y Margarita.

A mis hermanos Luis, José, Martín, Gian

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación recibió financiamiento de la Universidad Nacional de Moquegua a través del proyecto "Nuevas estrategias para mejorar la calidad aromática de los Piscos producidos en la región Moquegua". César Augusto Napa-Almeyda agradece una beca del proyecto Concytec-Banco Mundial (Convenio de Adjudicación de Fondos N.º 02-2018-FONDECYT-BM), a través de su unidad ejecutora, Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (Fondecyt).

Al Dr. Luis Condezo Hoyos y al Dr. Marcial Silva Jaimes, mi más sincero agradecimiento por el asesoramiento de la presente tesis.

A la Dra. M^a Ángeles del Pozo Bayón, la Dra. Carolina Muñoz González y Dra. Celia Criado en el Departamento de Biotecnología Enológica Aplicada del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) por su asesoramiento y haberme brindado las facilidades para la realización de la pasantía.

Al Ing. César Biondi Cosio, gerente general de la empresa Antonio Biondi e Hijos S.A.C, mi más sincero agradecimiento por el invaluable apoyo brindado durante la ejecución de mi tesis

Se agradece la asistencia técnica de E. Berciano de la "Unidad de Técnicas Analíticas y Bioanalíticas" (BAT) del CIAL.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 MICROBIOTA DE LA UVA (<i>Vitis vinifera</i>)	3
2.1.1 DIVERSIDAD DE LEVADURA	4
2.1.2 FACTORES QUE AFECTAN LA COMUNIDAD DE LEVADURAS	5
2.1.3 AROMA PRIMARIO ASOCIADO CON LA UVA	7
2.1.4 TÉCNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVOS PARA LEVADURAS	8
2.1.5 POBLACIONES DE CÉLULAS MEDIANTE MÉTODOS INDEPENDIENTES DEL CULTIVO.....	9
2.1.6 TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN ECOLÓGICA MICROBIANA....	10
2.2 LEVADURA EN LA FERMENTACIÓN DEL MOSTO DE UVA	11
2.2.1 FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA	11
2.2.2 FERMENTACIÓN INOCULADA.....	14
2.2.3 FERMENTACIÓN MIXTA CONTROLADA	17
2.3 ECOLOGÍA MICROBIANA EN EL VINO	18
2.3.1 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE LA COMUNIDAD MICROBIOTA DEL VINO	19
2.3.2 AROMA SECUNDARIO: FERMENTACIÓN DEL MOSTO DE UVA	19
2.4 EL PISCO	20
2.4.1 ORIGEN, VARIEDADES Y ZONAS PISQUERAS	20
2.4.2 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PISCO.....	23
2.4.3 COMPOSICIÓN DEL PISCO: LEGISLACIÓN PERUANA DEL PISCO.....	24
2.4.4 COMPUESTOS AROMATICOS DEL PISCO.....	25
2.4.5 COMPUESTOS VOLÁTILES DEL PISCO	25
2.5 Evaluación Sensorial.....	31
2.5.1 Factores que afectan la percepción sensorial	32
2.5.2 Buenas prácticas de evaluación sensorial.....	32
2.5.3 Métodos de análisis Sensoriales Descriptivos.....	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1 LUGAR DE ESTUDIO	34
3.2 MATERIA PRIMA, EQUIPOS, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS	34

3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA ETAPA I.....	36
3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA ETAPA II	42
3.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE LA ETAPA I	45
3.6 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE LA ETAPA II	49
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	51
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS APARTIR DEL HOLLEJO DE UVAS ITALIA Y NEGRA CRIOLLA.....	54
4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE NSYS AISLADOS DE ITALIA Y DE LAS VARIEDADES DE UVA NEGRA CRIOLLA	58
4.2.1 FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS	58
4.2.2 ACTIVIDAD POLIGALACTURONASA	60
4.2.3 TOLERANCIA AL ETANOL	61
4.2.4 PRODUCCIÓN DE SULFITO	61
4.2.5 CONSUMO DE NITRÓGENO	62
4.3 CARACTERIZACIÓN DEL PISCO OBTENIDO DE LAS VARIEDADES ITALIA Y NEGRA CRIOLLA	64
4.3.1 COMPUESTOS AROMÁTICOS	64
4.3.2 ANÁLISIS SENSORIAL.....	67
4.3.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y PROPIEDADES SENSORIALES	68
4.4 EVALUAR LA CONTRIBUCIÓN DE LAS NSYS ANALIZANDO LOS COMPUESTOS VOLÁTILES Y ATRIBUTOS SENSORIALES DEL PISCO VARIEDAD ITALIA Y VARIEDAD NEGRA CRIOLLA RELACIONADOS CON LAS DIFERENTES ESTRATEGIAS DE MEZCLAS DE CEPAS INOCULADAS	70
4.4.1 CUANTIFICACIÓN DE LEVADURAS DE LA SUPERFICIE DE LA UVA	70
4.4.2 DINÁMICA DEL CRECIMIENTO DE LAS DIVERSAS MEZCLAS DE LEVADURAS NATIVAS	72
4.4.3 INFLUENCIA DE LAS INTERACCIONES SOBRE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES PRODUCIDOS Y LIBERADOS POR LAS LEVADURAS	75
4.4.4 DIFERENCIAS VARIETALES ENTRE LAS MEZCLAS DE LEVADURAS NO <i>SACCHAROMYCES</i> DE PISCO VARIEDAD ITALIA Y NEGRA CRIOLLA	83
4.4.5 ANÁLISIS SENSORIAL.....	85
V. CONCLUSIONES	92
VI. RECOMENDACIONES	93

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	94
VIII. ANEXOS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La ecología y su evolución de los microorganismos del vino: levaduras, bacterias lácticas y acéticas durante el proceso de vinificación y crianza. Representa la cantidad de células/ mL en cada fase de la producción del vino.	18
Figura 2. Zona Geográfica de la Denominación de Origen Pisco	23
Figura 3. Esquema experimental de la etapa I – Identificación de levaduras.....	46
Figura 4. Esquema experimental de la etapa I – Elaboración del Pisco	47
Figura 5. Esquema experimental de la ETAPA I – Determinación de Compuestos Volátiles.....	48
Figura 6. Elaboración del Pisco variedad Italia con estrategias de inoculación de levaduras en la etapa de fermentación, etapa II.	52
Figura 7. Elaboración del Pisco variedad Negra Criolla con estrategias de inoculación de levaduras en la etapa de fermentación, etapa II.	53
Figura 8. Fermentación de carbohidratos (A, B) y actividad poligalacturonasa (B) de cepas aisladas de levaduras no-Saccharomyces procedentes	56
Figura 9. Análisis sensorial del Pisco de Italia y de las variedades Negra Criolla.....	68
Figura 10. Análisis de componentes principales de compuestos volátiles y atributos sensoriales del Pisco obtenido por fermentación espontánea de las variedades Italia y Negra criolla de la región Moquegua. A) Score plot y B) Biplot de compuestos volátiles:	69
Figura 11. Recuento de células viables por periodo en días para las distintas levaduras.....	72
Figura 12. Recuento de la población total de levaduras (ufc/g de mosto) en mosto de la variedad Italia y mosto variedad Negra Criolla durante 12 días de fermentación.	74
Figura 13. PCA biplot: Pisco Italia. Compuestos Volátiles:	84
Figura 14. PCA biplot: Pisco Negra Criolla. Compuestos Volátiles:	85
Figura 15. Gráfico radial de valores sensoriales: Pisco Italia.....	90
Figura 16. Gráfico radial de valores sensoriales: Pisco.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características de las levaduras vínicas	15
Tabla 2.	Variedades de uvas pisqueras.....	22
Tabla 3.	Composición de los Piscos.....	25
Tabla 4.	Datos de la calibración de 20 compuestos, los cuales son analizados mediante una extracción en fase sólida seguida de una inyección en un cromatógrafo de gases acoplado MS.	41
Tabla 5.	Datos de la calibración de 19 compuestos, los cuales son analizados mediante una extracción en fase sólida seguida de una inyección en un cromatógrafo de gases acoplado MS.	44
Tabla 6.	Diseño de mezclas centroide simplex para formulaciones con cepas de levaduras de la variedad Italia.	50
Tabla 7.	Diseño de mezclas centroide simplex para formulaciones con cepas de levaduras de la variedad Negra Criolla.....	50
Tabla 8.	Identificación molecular de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> aisladas de las variedades de uva Italia y Negra criolla.	55
Tabla 9.	Tolerancia al etanol, producción de sulfito y consumo de nitrógeno de levaduras no- <i>saccharomyces</i> aisladas de las variedades de uva Italia y Negra criolla.	63
Tabla 10.	Valores mínimos, máximos, media y desviación estándar de compuestos volátiles en Pisco de las variedades de uva Italia y Negra Criolla producidos en condiciones industriales.	66
Tabla 11.	Media y desviación estándar de las concentraciones de compuestos volátiles ($\mu\text{g/l}$) en las muestras de Pisco Italia.....	79
Tabla 12.	Media y desviación estándar de las concentraciones de compuestos volátiles ($\mu\text{g/l}$) en las muestras de Pisco Negra Criolla	81

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Zonas situadas en el valle de Moquegua con denominación de origen	114
ANEXO 2. Patrones para la calibración de compuestos volátiles	115

RESUMEN

La identificación de levaduras cultivables presentes en la piel de las uvas, junto con el aislamiento de especies fermentativas no *Saccharomyces* mediante un proceso de enriquecimiento, ha permitido que las técnicas moleculares basadas en cultivos descubran una microbiota diversa y compleja de levaduras en la uva. Se aislaron e identificaron cepas de levadura no *Saccharomyces* (NSYS) (24 de la variedad Italia y 10 de la variedad Negra Criolla) del hollejo de las uvas aromáticas variedad Italia *Pichia terricola* (56 %), *Metschnikowia pulcherrima* (31 %) y *Naganishia vauhanmartinae* (13 %) y del hollejo de las uvas no aromáticas Negra Criolla *Vishniacozyma carnescens* (50 %), *Vishniacozyma heimaeyensis* (30%) y *Aureobasidium pullulans* (20%), algunos de los cuales han sido implicados en la calidad sensorial del vino. NSYS aislado mostraron diferencia en capacidad de fermentación de carbohidratos, actividad de poligalacturonasa, tolerancia al etanol, producción de sulfitos y consumo de nitrógeno. Se mostraron diferencias significativas en los compuestos aromáticos del Pisco elaborado mediante fermentación espontánea. El Pisco elaborado a partir de uva recolectada mostró diferencia en el contenido de compuestos aromáticos. En el Pisco Italia se identificaron altas concentraciones de terpenos tales como citronelol, geraniol, linalol y nerol, y algunos ésteres etílicos, los cuales aportan atributos sensoriales que incluyen notas cítricas, notas florales y miel. Asimismo, en el Pisco Negra Criolla se detectaron altas concentraciones de alcohol de feniletilo, y 1-hexanol, con ausencias de compuestos terpenicos, con atributos sensoriales a frutos secos. Tanto en el Pisco Italia como en Pisco Negra Criolla se encontró un alto contenido de 1-hexanol y por primera vez de alcohol bencílico. El efecto de co-fermentación por NSYS en la dinámica de crecimiento de las especies, fueron inoculadas al inicio del proceso de fermentación del mosto de uva usando un diseño de mezcla simplex-centroide con tres componentes. Los géneros *Naganishia* y *Pichia* fueron predominantes en la variedad Italia y *Aureobasidium* en la variedad Negra Criolla. La monoinoculación mostró un predominio de terpenos como α -terpineol, citronerol y geraniol en el Pisco Italia y un alto contenido de alcohol feniletil y ésteres etílicos en el Pisco Negra Criolla. La concentración de alcohol isoamílico fue mayor en el destilado obtenido del mosto de uva no inoculado, que fue significativamente mayor en comparación con otras mezclas de levadura natural. Un Análisis de Componentes Principales (ACP) realizado sobre los datos cuantitativos de los 19 compuestos volátiles Italia y 13 compuesto volátiles Negra Criolla revelaron que las diferencias químicas pueden ser suficientes

para clasificar las mezclas de NSYS según su variedad. La evaluación sensorial mostró que los descriptores cítricos, florales, alcohólicos y almíbar de eran marcados en los Piscos Italia de inoculación simple, mientras que los descriptores herbáceos, especiados, herbáceos y de vegetales cocidos, junto con un notable descriptor de mantequilla. Este último añadió una complejidad al perfil sensorial del Pisco Negra Criolla. El potencial del aislado NSYS para mejorar las propiedades sensoriales del Pisco como estater en el proceso de fermentación merece mayor estudio.

Palabras clave: Pisco Uva Italia; Uva Pisco Negra Criolla; microbiota; no *Saccharomyces*.

ABSTRACT

The identification of cultivable yeasts present on grape skins, along with the isolation of non-*Saccharomyces* fermentative species through an enrichment process, has allowed culture-based molecular techniques to uncover a diverse and complex yeast microbiota in the grape. Non-*Saccharomyces* yeast strains (NSYS) were isolated and identified from the skins of aromatic grape varieties Italia *Pichia terricola* (56 %), *Metschnikowia pulcherrima* (31 %) and *Naganishia vaughanmartinae* (13 %), *Metschnikowia pulcherrima* (31 %) and *Naganishia vaughanmartinae* (13 %) and from the skins of the non-aromatic grapes Negra Criolla *Vishniacozyma carnescens* (50 %), *Vishniacozyma heimaeyensis* (30 %) and *Aureobasidium pullulans* (20 %), some of which have been implicated in wine sensory quality. NSYS isolates showed differences in carbohydrate fermentation capacity, polygalacturonase activity, ethanol tolerance, sulphite production and nitrogen consumption. Significant differences were shown in the aroma compounds of Pisco made by spontaneous fermentation. Pisco made from harvested grapes showed differences in the content of aroma compounds. In Pisco Italia, high concentrations of terpenes such as citronellol, geraniol, linalool and nerol, and some ethyl esters were identified, which contribute sensory attributes including citrus notes, floral notes and honey. Likewise, high concentrations of phenylethyl alcohol and 1-hexanol were detected in Pisco Negra Criolla, with absences of terpenic compounds, with sensory attributes of dried fruits. In both Pisco Italia and Pisco Negra Criolla a high content of 1-hexanol and for the first-time benzyl alcohol was found. The effect of co-fermentation by NSYS on the growth dynamics of the species were inoculated at the beginning of the grape must fermentation process using a simplex-centroid mixture design with three components. The genera *Naganishia* and *Pichia* were predominant in the Italia variety and *Aureobasidium* in the Negra Criolla variety. Monoinoculation showed a predominance of terpenes such as α -terpineol, citronerol and geraniol in Pisco Italia and a high content of phenylethyl alcohol and ethyl esters in Pisco Negra Criolla. The concentration of isoamyl alcohol was higher in the distillate obtained from non-inoculated grape must, which was significantly higher compared to other natural yeast blends. A Principal Component Analysis (PCA) performed on the quantitative data of the 19 volatile compounds Italia and 13 volatile compounds Negra Criolla revealed that chemical differences may be sufficient to classify the NSYS blends according to their variety. Sensory evaluation showed that citrus, floral, alcoholic and syrupy descriptors were marked in the single-inoculated

Italia Pisco, while herbaceous, spicy, herbal and cooked vegetable, descriptors along with a notable buttery descriptor, added complexity to the sensory profile of Negra Criolla Pisco. The potential of the NSYS isolate to improve the sensory properties of Pisco as a starter in the fermentation process deserves further study.

Keywords: Pisco Uva Italia; Pisco Negra Criolla grape; microbiota; non-*Saccharomyces*.

I. INTRODUCCIÓN

El Pisco es una bebida espirituosa joven, única y de gran demanda nacional e internacional, obtenida por la destilación de uva elaborado a partir de diferentes variedades de uvas aromáticas (Albilla, Italia, Moscatel y Torontel) y no aromáticas (Mollar, Negra Criolla, Quebranta y Uvina) producidas en ciertas zonas de la costa peruana (Cacho et al. 2012, 2013), las cuales influyeron en el aroma y otras propiedades sensoriales, así como chocolate y pasas negras (Cacho et al. 2013, 2012).

Los atributos sensoriales del Pisco dependen de la calidad y características de la variedad de uva, que dependen de muchos factores como las condiciones climáticas, el suelo y la ubicación geográfica (Cacho et al. 2013, Wang et al. 2020, González-Barreiro et al. 2015) y que a su vez influyen en el microbiota silvestre implicada en la fermentación espontánea (Lappa et al. 2020, Englezos et al. 2022) y de las técnicas vitivinícolas del proceso de destilación (Cacho et al. 2013). La química del vino en parte es el resultado de la contribución de toda la microbiota, incluyendo cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* (Lappa et al. 2020, Chen et al. 2022) y cepas de levadura no *Saccharomyces* (NSYS), que generalmente están presentes al inicio de la fermentación, pero contribuyen con su perfil aromático (Capozzi et al. 2015, Binati et al. 2020, Chen et al. 2021, Delač Salopek et al. 2022). Así, se ha producido vino con diferentes características aromáticas mediante la inoculación simultánea o secuencial de cepas de NSYS específicas aisladas de uva de diferentes regiones (Binati et al. 2020, Ciani et al. 2010, Comitini et al. 2021). Varias NSYS implicadas en el aroma del vino han sido aisladas de la piel de uvas incluyendo entre otras *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, *Lachancea thermotolerans*, y *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida railenensis*, *Hanseniasporas genus*, *Debaryomyces hansenii* (Delač Salopek et al. 2022, Hong et al. 2019, Ge et al. 2022). Sin embargo, la microbiota de la uva depende de muchos factores, como las

condiciones climáticas, el suelo y la ubicación geográfica y las variedades de uva (Aplin et al. 2019, Barata et al. 2012, Chen et al. 2022, Gao et al. 2019). De hecho, el crecimiento de una misma uva en diferentes regiones y ubicación del viñedo produce vinos con características sensoriales diferentes (Chen et al. 2022, Keller 2010).

El objetivo general del presente estudio es Aislar levaduras nativas implicadas en el perfil sensorial de Pisco puro Italia y Negra Criolla, los objetivos específicos fueron: a) aislar y caracterizar fenotípicamente NSYS de la piel de las uvas Italia y Negra Criolla colectadas sistemáticamente del viñedo de la región de Moquegua, una de las cinco regiones con denominación de origen de Pisco, b) caracterizar los compuestos volátiles y atributos sensoriales, evaluados por un panel experto del Pisco, elaborado de las variedades de uvas mencionadas y c) Evaluar la contribución de las NSYS analizando los compuestos volátiles y atributos sensoriales del Pisco variedad Italia y variedad Negra Criolla relacionados con las diferentes estrategias de mezclas de cepas inoculadas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 MICROBIOTA DE LA UVA (*Vitis vinifera*)

Las uvas tienen una microbiota compleja que incluye hongos filamentosos, levaduras y bacterias con diferentes características fisiológicas y efectos sobre la producción de vino; este consorcio cubre especies de levaduras, bacterias del ácido láctico y bacterias del ácido acético donde la proporción de estos microorganismos depende del estado de maduración de la uva y de la disponibilidad de nutrientes (Barata et al. 2012). Así, la vid asociada a sus comunidades microbianas constituye un supra organismo, también llamado holobionte, cuyo funcionamiento está ligado a interacciones establecidas planta-microorganismo (Bettenfeld et al. 2022). Los microorganismos epífitos despliegan mecanismos muy variados y novedosos para sobrellevar no sólo la sequía, sino también, la adquisición de nutrientes del ambiente (Granados-Sánchez et al. 2004) y juegan un rol importante en una fermentación espontánea, lo cual afecta de manera directa la calidad o seguridad del vino, ya que produce metabolitos secundarios, como aromas (frutales, florales, especiados y herbáceos) y uretano (Cordero-Bueso et al. 2011). En la comunidad de levaduras presente en el mosto de uva fresco y durante la fermentación alcohólica a menudo están presentes especies no *Saccharomyces* (NS) de los géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Issatchenkia* y *Metschnikowia*. *Hanseniaspora uvarum* es una de las especies mencionadas últimamente y *Candida zemplinina* es la especie más abundante del género *Candida* en muestras de vino y mosto (Zott et al. 2010).

Diversos estudios se han enfocado en el estudio de los factores geográficos y sus repercusiones en la obtención del vino. (Gayevskiy y Goddard 2012) observaron que las levaduras son los microorganismos más afectados por los factores geográficos en Nueva Zelanda. Se ha establecido también que la población de la microbiota es el resultado del uso de un enfoque de agricultura tradicional y biodinámica (Guzzon et al. 2016). El uso de pesticidas en el proceso de cultivo de la uva puede modificar la composición de la microbiota, provocando un quiebre selectivo de ella (Milanović et al. 2013).

2.1.1 DIVERSIDAD DE LEVADURA

Las levaduras presentes en la baya de la uva contribuyen significativamente en el proceso de elaboración del vino, afectando positiva o negativamente las características sensoriales del mismo. No obstante, esta microbiota está influenciada por factores climáticos, geográficos y las prácticas vitivinícolas implicadas, como, el uso de pesticidas y fertilizantes (Gao et al. 2019). Generalmente, muy pocas levaduras ($10-10^3$ ufc/g) se detectan en bayas de uva inmaduras, pero aumentan a una población de 10^4-10^6 ufc/g a medida que las uvas maduran para la cosecha (Fleet 2003). El foco principal ha sido el estudio de *Saccharomyces cerevisiae* dada su relevancia en la elaboración del vino, esta especie es frecuente en las uvas, pero como se ha mostrado anteriormente es una levadura ausente o raro dentro de las uvas pero es considerado como la primera levadura domesticada (Barata et al. 2012).

La microbiota del vino es un ecosistema complejo que desempeña un papel directo en la producción y síntesis de muchos metabolitos relevantes desde el punto de vista enológico, teniendo profundos efectos en la composición final del vino (Englezos et al. 2022, Lai et al. 2022). A menudo, se menciona que las levaduras no *Saccharomyces* (*NS*) son dominantes en superficie de la uva y a inicios de la etapa de vinificación (Zott et al. 2011). Estas levaduras desempeñan un papel crucial en el proceso fermentativo, que es un procedimiento bioquímicamente complejo que incluye la conversión de azúcar en alcohol y muchos otros metabolitos secundarios. Sin embargo, investigaciones científicas brindan indicios que el uso de levaduras nativas está conectado con la manifestación de perfiles sensoriales distintivos en una localidad precisa. Estas evidencias sugieren que las levaduras nativas, presentes de forma natural en un entorno geográfico determinado, pueden jugar un papel fundamental en la influencia de los sabores y aromas únicos que caracterizan a esa región en particular (Lappa et al. 2020, Lai et al. 2022).

Las levaduras, entre las más importantes se encuentran las especies pertenecientes al género *Saccharomyces*, en particular, *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius 2000). Una fermentación de inicio hasta el final y con una gran producción de etanol se da con especies tolerantes de *Saccharomyces* (Fleet 2003). Hoy en día, las fermentaciones son inoculadas con cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* disponibles comercialmente debido a la facilidad de control y

homogeneidad de fermentaciones del vino (Schuller et al. 2005). Clavijo et al. (2010) señalan que se han estudiado la población de levaduras en diferentes viñedos y bodegas y el uso de levaduras seleccionadas comerciales, de las 1586 levaduras aisladas, solo 252 de ellas correspondían a *S. cerevisiae*. Según (Mortimer y Polsinelli 1999), sólo una de cada mil bayas es *S. cerevisiae* positivo. Es bien sabido que la presencia de *S. cerevisiae* en la uva es rara. Según lo descrito por (Martini 1993), la levadura enológica por excelencia se aísla con extrema dificultad de los hábitats convencionales, como el suelo del viñedo o la superficie de la uva madura, mientras que es casi la única especie que coloniza las superficies del equipamiento de la bodega. Capece et al. (2012) estudiaron 132 cepas de *S. cerevisiae*, aisladas de fermentación espontánea donde muestran resistencia a compuestos químicos potencialmente presentes en el vino (dióxido de azufre, etanol, cobre).

2.1.2 FACTORES QUE AFECTAN LA COMUNIDAD DE LEVADURAS

El impacto que las levaduras que tienen sobre la calidad de un producto acabado dependen en gran medida de la población inicial (cantidad microbiana y diversidad de especies) en el jugo de fermentación, ya sea de una población natural o de una cepa inoculada (Englezos et al. 2022). Otras levaduras distintas de *S. cerevisiae* afectan el fenotipo de la bebida fermentada o destilada en términos de composición volátil (Comitini et al. 2017). Otros factores como la lluvia, la temperatura, el daño físico y la aplicación de agroquímicos como fungicidas e insecticidas que descenden el crecimiento o la carencia de levaduras en la uva (Hernandez et al. 2011).

a. VARIEDAD DE LA UVA

Las uvas albergan una gran variedad de levaduras cuya diversidad y densidad fluctúan a lo largo de la maduración y el estado físico o daño de las uvas estando influenciadas en parte por las prácticas agronómicas (Bagheri et al. 2016).

b. TRATAMIENTOS DE VIÑEDOS

El principal tratamiento del viñedo estudiado está relacionado con el uso de tratamientos fitosanitarios, principalmente aquellos contra hongos (mildió velloso, oídio y podredumbre gris). Los estudios se basan en el análisis de uvas después del tratamiento del viñedo, que no excluye la influencia de otros factores, o en fermentaciones de auto enriquecimiento que no

pueden extrapolarse correctamente para evaluar las variaciones en la microbiota de la baya (Trigo-Córdoba et al. 2015). Los pesticidas reducen la población de levaduras y la diversidad en los mostos en fermentación. La ausencia de efecto sobre la fermentación de *S. cerevisiae* por seis fungicidas diferentes mientras se estimulaba la fermentación por *K. apiculata*. Los pesticidas afectan la diversidad y frecuencia de *S. cerevisiae* y otras especies comparando dos grupos diferentes de aplicación de plaguicidas y un viñedo abandonado (Cordero-Bueso et al. 2011). El número de levaduras oxidativas aumentó en años con alta precipitación, con alta proliferación fúngica, mayores tratamientos con fungicidas y mayor daño a la baya. Las levaduras oxidativas fueron más altas en años con mayor precipitación (*M. pulcherrima* y *C. stellata* más altas que *K. apiculata*) lo cual no se atribuyó a los tratamientos químicos porque fueron idénticos en ambos años (Paola et al. 2020).

c. CONDICIONES CLIMÁTICAS

Las condiciones climáticas y microclimáticas incluyen el efecto de la temperatura, la exposición a los rayos UV, las lluvias, la luz solar y los vientos. La diversidad y cantidad de poblaciones microbianas dependen de estas condiciones, las cosechas lluviosas conducen a un mayor uso de fitoquímicos, una mayor proliferación de hongos y un mayor daño a las bayas, junto con una menor radiación UV (Magyar et al. 2014). Los recuentos totales de levadura encontraron que los años con mayor precipitación arrojaron recuentos más altos, probablemente debido al aumento en el volumen de la baya que permite la liberación de jugo en áreas conjuntas como el área entre el pedicelo y la baya, y una mayor exosmosis que conduce a la liberación de nutrientes en la superficie de la uva. Las levaduras oxidativas, como *M. pulcherrima* aumentan en años con mayor precipitación (Romero et al. 2022). Cordero-Bueso et al. (2011) encontraron mayores proporciones de levaduras basidiomicetos en cultivos tardíos de condiciones climáticas frías mientras que *K. apiculata* fue más frecuente en climas templados y se encontraron diferentes poblaciones de *S. cerevisiae* en las regiones costeras y más cálidas.

d. FACTORES BIÓTICOS

Investigaciones de Francesca et al. (2014) centradas en el papel de las aves migratorias en la diseminación ambiental de levaduras vinícolas, las aves transportan y diseminan levaduras capaces de soportar las condiciones del tracto gastrointestinal del animal a través de largas

distancias, durante sus migraciones anuales y muchas de ellas, son las levaduras enológicas como *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Debaromyces hansenii*, *Pichia kudriavzevi*, *Pichia terricola* y *Aureobasidium pullulans* (Francesca et al. 2012), mostrando la persistencia de la cepa *S. cerevisiae* con aptitud enológica. Se ha demostrado que las avispas también diseminan la levadura *S. cerevisiae* (Stefanini et al. 2012).

2.1.3 AROMA PRIMARIO ASOCIADO CON LA UVA

a. PRECURSORES

El aroma proviene de varios componentes volátiles, incluidos alcoholes superiores, ésteres, terpenos, pirazinas, fenoles, aldehídos y algunos tioles varietales (Jones-Moore et al. 2022). Son fundamentales para la obtención de un vino de calidad, al estar los primeros relacionados con el cuerpo, color, astringencia y amargor, y los segundos con el aroma de los vinos (Neira 2011). Los compuestos aromáticos provenientes de la uva aportan al vino su aroma varietal, mientras que la fermentación microbiana aporta al vino los aromas fermentativos (Peña-Gallego et al. 2012).

b. FACTORES QUE AFECTAN EL AROMA PRIMARIO

Los factores que afectan el aroma primario de la baya son variados, pudiendo mencionarse entre otros, el lugar de implantación del viñedo con todo lo que ello conlleva, como tipo de suelo y el efecto del mismo sobre la disponibilidad hídrica y nutricional; clima de la zona y su efecto térmico y lumínico, afectando el proceso fotosintético y las rutas de síntesis directa e indirectamente relacionadas con el mismo, como es la síntesis de azúcares y a partir de ellos de ácidos y metabolitos secundarios responsables del color, cuerpo, aroma, etc.. Adicionalmente se verán afectados procesos de respiración metabolitos tales como ácidos y algunos compuestos aromáticos (Neira 2011). Los efectos de las altas temperaturas y el calentamiento global permiten retrasar la maduración y el aroma primario de la uva. Es necesario disponer de múltiples técnicas vitivinícolas para adaptar a la situación climática actual y mejorar a la vitivinicultura (Gutiérrez-Gamboa et al. 2021).

2.1.4 TÉCNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVOS PARA LEVADURAS

Las técnicas dependientes del cultivo son eficientes para monitorear las cepas de levadura a lo largo del proceso de fermentación. Estos métodos son muy laboriosos y requieren mucho tiempo e incluyen el aislamiento, cultivo y caracterización de cada especie. Además, las poblaciones menores presentes son difíciles de detectar mediante métodos de cultivo porque pueden estar enmascaradas en las placas (Maturano et al. 2015).

a. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

Los métodos fenotípicos convencionales basados en criterios bioquímicos son la asimilación de nutrientes (carbohidratos y fuentes de nitrógeno) y la fermentación de carbohidratos y son técnicas costosas, laboriosas, que consumen mucho tiempo y sólo se realizan en laboratorios de referencia, consumen un tiempo variable de 2 a 21 días; además requieren la utilización de claves de identificación que complican el proceso. Para lograr una identificación presuntiva adecuada deben ser acompañados de métodos morfológicos y fisiológicos (Ferrara et al. 2014).

b. IDENTIFICACIÓN BASADA EN MÉTODOS BIOQUÍMICOS

La técnica de caracterización bioquímica sigue siendo predominante hasta el día de hoy, por su relativa sencillez y porque en términos generales no requieren equipos sofisticados para llevarla a cabo (Vásquez et al. 2016). Para la identificación bioquímica, las levaduras se someten a pruebas de asimilación de carbohidratos, utilizando el sistema API 20C AUX (Bio-Merieux) (Hernandez et al. 2011).

c. IDENTIFICACIÓN BASADA EN MÉTODOS MOLECULARES

Las principales técnicas de identificación de levaduras están basadas en métodos de biología molecular, aplicando la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) la cual las hace más específicas, pueden ser extremadamente sensibles y los resultados se obtienen en corto tiempo (Vásquez et al. 2016). La caracterización molecular se puede llevar a cabo utilizando una combinación de diferentes técnicas para identificar y obtener información sobre la relación genómica entre los aislamientos (Tofalo et al. 2011). Dentro de las técnicas para identificación molecular se encuentran los análisis de las regiones ribosomales (5,8S; 18S y 26S), los

espaciadores internos transcritos ITS y las regiones externas (ETS), la PCR en tiempo real, microchips, análisis de cromosomas por electroforesis en campo pulsado, análisis de restricción del ADN mitocondrial, los RAPD's (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), PCR de regiones repetitivas del genoma (microsatélites y minisatélites), la amplificación de secuencias δ y los AFLP(amplificación de fragmentos de longitud polimórfica) (Vásquez et al. 2016).

d. DETECCIÓN BASADA EN ELECTROFORESIS EN GEL

Los métodos analíticos moleculares basados en PCR-electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) ahora se están aplicando al campo de microbiología. El ADN total se extrae del ecosistema y el ADN microbiano se amplifica específicamente mediante PCR utilizando grupos particulares de cebadores universales (Prakitchaiwattana et al. 2004).

2.1.5 POBLACIONES DE CÉLULAS MEDIANTE MÉTODOS INDEPENDIENTES DEL CULTIVO

Cocolin et al. (2001) detallan que en los últimos 10 años se han desarrollado nuevos métodos basados en el análisis de los ácidos nucleicos (DNA y RNA) que se extraen directamente de la muestra sin necesidad de cultivo microbiano. El método que se utiliza a menudo en este tipo de estudios es:

a. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se han utilizado la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que se ha aplicado en la detección de levaduras de deterioro *Brettanomyces bruxellensis* / *Dekkera bruxellensis* y para detectar la población global de levaduras o el principal género de levaduras de fermentación, *Saccharomyces* y para detectar *Zygosaccharomyces bailii* (Zott et al. 2010). Los ensayos de qPCR podrían permitir a los administradores de viñedos correlacionar las densidades de población de levadura con el cultivo, los factores ambientales y el manejo del viñedo, y extender los estudios al control biológico de los patógenos de la uva y la salud del viñedo (Wang et al. 2020).

Se han descrito métodos exitosos independientes del cultivo, como PCR-DGGE, hibridación *in situ* o citometría de flujo con anticuerpos fluorescentes. Estas técnicas se basan en la detección

directa del ADN en muestras de origen biológico. El método PCR-DGGE, que ha reportado límites de detección entre 10^2 UFC/mL en cultivos puros y 10^4 UFC/mL en muestras de vino o mosto el análisis PCR-DGGE es menos sensible que el cultivo en agar para determinar las levaduras de las uvas (Xu et al. 2021, Zott et al. 2010).

b. SECUENCIACIÓN DEL ALTO RENDIMIENTO

Schmidt y Hildebrandt (2017) mencionan que el progreso de la secuenciación de próxima generación tiene un gran impacto en la investigación genómica. Esta tecnología de alto rendimiento ahora puede producir miles de millones de fragmentos cortos de ADN o ARN en exceso de unos pocos terabytes de datos en una sola ejecución.

El gen de ARNr de subunidad pequeña bacteriana (ARNr 16S) así como el gen fúngico ITS1-5.8S rARN-ITS2 han sido reconocidos como el estándar de oro para estimar la diversidad filogenética en comunidades microbianas (Sun y Liu 2014). Las técnicas moleculares que se basan en genes de ARNr como moléculas diana, se han empleado junto con metodologías dependientes del cultivo para identificar microorganismos después del aislamiento y crecimiento en cultivos puros (Alessandria et al. 2013). Esta técnica se emplea a menudo en combinación con métodos dependientes del cultivo y ha permitido a los investigadores descifrar la complejidad y evolución de la población microbiana durante la maduración de las bayas y durante todo el proceso de fermentación (Andorrà et al. 2010).

2.1.6 TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN ECOLÓGICA MICROBIANA

Las poblaciones de levadura de uva se componen aproximadamente entre 10^2 y 10^4 células/g (Fleet et al. 2002). La identificación precisa es obviamente crucial para el establecimiento de comunidades microbianas. Además, la reproducibilidad de estas técnicas es algo cuestionable, ya que en muchos casos dependen del estado fisiológico de las células. Las técnicas de biología molecular evitan estas dificultades al permitir el análisis directo del genoma, independientemente del estado fisiológico de la célula, proporcionando una mayor precisión identificaciones (Barata et al. 2012). La metagenómica es una alternativa cada vez más utilizada, que no requieren clonación o amplificación por PCR, y pueden producir grandes cantidades de lecturas de ADN para estudiar organismos no cultivados (Huson et al. 2007). Su aplicación a

mostos de uva evidencia la esperada diversidad de microbiota y la presencia inesperada de algunas especies inusuales en vinos, como *Enterobacter spp.* o *Dunaliella tertiolecta* (Nisiotou et al. 2011). La espectroscopia infrarroja transformada de Fourier se ha informado como una poderosa técnica para identificar levaduras, mohos y bacterias (Santos et al. 2010).

2.2 LEVADURA EN LA FERMENTACIÓN DEL MOSTO DE UVA

Levaduras con baja actividad fermentativa, como *Candida spp.*, *Hanseniaspora spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Pichia spp.* y *Rhodotorula spp.*, son predominantes en uva, mosto y durante las primeras etapas de fermentación. Después, *Saccharomyces cerevisiae* prolifera, domina y completa la fermentación del vino (Fleet et al. 2002). Generalmente, estas especies *no Saccharomyces* se consideraron de importancia secundaria o indeseable para el proceso (Andorrà et al. 2010), sin embargo, esta tendencia está cambiando. (Fleet 2008) menciona las posibilidades de utilizar levaduras distintas de los del género *Saccharomyces* para futuros vinos y la viabilidad comercial de mezclas de levaduras. Estas especies tienen un gran potencial para introducir características atractivas para el vino que pueden mejorar su calidad organoléptica.

Las principales levaduras *no Saccharomyces* presentes durante fermentación alcohólica son *Candida stellata*, actualmente clasificada como *Candida zemplinina* y *Hanseniaspora uvarum* (Šipiczki et al. 2005). Las especies de *Hanseniaspora* se han considerado grandes productores de ésteres, la mayoría de ellos contribuyendo a la aroma floral y afrutado de los vinos (Ciani et al. 2006). Las cepas de *Hanseniaspora uvarum* también poseen características enzimáticas de interés para la vinificación por sus efectos tecnológicos y su contribución a la formación de aromas, pectinasas, proteasas y glicosidasas son algunas de las enzimas secretadas por *Hanseniaspora uvarum*, que mejora la clarificación, estabilización y aroma de los vinos (Moreira et al. 2005).

2.2.1 FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA

En fermentación espontánea las primeras levaduras en aparecer son las levaduras apiculadas (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*) y *Candida*, seguidas de varias especies de *Metschnikowia*, *Pichia* y ocasionalmente *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*, son útiles para preservar las características de las regiones productoras de

vino (Pretorius et al. 1999). La baja tolerancia al etanol de estas levaduras y su incapacidad para fermentar todos los azúcares presentes en los mostos son las razones de su reemplazo natural por *Saccharomyces cerevisiae*, este es el agente principal en la fermentación alcohólica, pero la distribución natural de esta levadura no es clara (Clemente-Jimenez et al. 2004). Las especies fermentativas de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) ocurren en poblaciones extremadamente bajas y rara vez son aislado de los granos intactos, lo que sugiere que la fermentación en forma espontánea esta levadura proviene de la superficie en la bodega (Martini 1993). También ha sido señalado que la presencia / ausencia de *S. cerevisiae* difiere según cada planta y racimo (Pretorius et al. 1999). Por esta razón, no siempre es posible obtener el mismo vino por una fermentación espontánea. Este problema se está resolviendo en la actualidad. por el uso de cepas comerciales en la fermentación proceso (Clemente-Jimenez et al. 2004).

a. DINÁMICA DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS

La dinámica de la población de levaduras cambia la composición y cantidad de levaduras en un determinado entorno a lo largo del tiempo. La dinámica de la población de levaduras está influenciada por una serie de factores y procesos, como el crecimiento, la reproducción, la competencia y el entorno en el que se encuentran. Cuando encuentran condiciones favorables, como la presencia de nutrientes y espacio, pueden crecer y reproducirse rápidamente, lo que lleva a un aumento en la población. La diversidad genética puede influir en la adaptabilidad de la población a cambios en el entorno y en su capacidad para enfrentar desafíos como factores estresantes o cambios en las condiciones nutricionales. Las primeras etapas de la fermentación alcohólica generalmente están dominadas por levaduras apiculadas pertenecientes al género *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), así como por otras levaduras no *Saccharomyces* como *Candida stellata* y *Metschnikowia pulcherrima* (Fleet 2003). La producción de vino se realiza por una fermentación natural del mosto de uva y se lleva a cabo mediante una sucesión de diferentes poblaciones de levaduras. Con menor frecuencia también se encuentran especies asignadas a los géneros *Pichia* y *Kluyveromyces* y a medida que avanza la fermentación, las especies distintas de *Saccharomyces* mueren sucesivamente, dejando a *S. cerevisiae* para dominar y completar la fermentación (Jolly et al. 2014). Aunque algunas especies de vino que no son *Saccharomyces* a menudo se citan como importantes para el sabor y la calidad del vino (Egli et al. 1998).

b. FACTORES QUE AFECTAN LA POBLACIÓN DE LEVADURAS

La población de levaduras puede ser influenciada por una variedad de factores bióticos (relacionados con otros seres vivos) y abióticos (factores no vivos del entorno). Estos factores pueden afectar el crecimiento, la distribución y la diversidad de las poblaciones de levaduras (Bisson 1999). Los factores abióticos, como la disponibilidad de nutrientes esenciales, como carbohidratos, nitrógeno, vitaminas y minerales, afecta directamente el crecimiento y la reproducción de las levaduras. Las levaduras tienen rangos de temperatura óptimos para su crecimiento. Las fluctuaciones en la temperatura pueden afectar la tasa de crecimiento y la composición de la población. El pH del entorno puede influir en la actividad enzimática y en la viabilidad de las levaduras. Diferentes especies y cepas de levaduras pueden tener preferencias de pH distintas. La humedad relativa del ambiente es importante para el crecimiento y la supervivencia de las levaduras. Ambientes muy secos o húmedos pueden afectar negativamente su proliferación. Algunas levaduras son anaerobias (crecen en ausencia de oxígeno), mientras que otras son aeróbicas (requieren oxígeno). La disponibilidad de oxígeno puede influir en la composición de la población de levaduras. La exposición a la radiación ultravioleta y la intensidad de la luz solar pueden influir en la viabilidad y el crecimiento de las levaduras en el entorno (Fleet et al. 2002). Los factores bióticos pueden competir por los mismos recursos, lo que puede afectar el crecimiento y la prevalencia de una especie de levadura en particular. Algunos microorganismos pueden ser depredadores o parásitos de las levaduras, lo que puede reducir su población, las levaduras y las bacterias lácticas pueden interactuar en una simbiosis que influye en la calidad del producto final. La dispersión de levaduras a través del aire, agua, animales o humanos puede influir en la colonización de nuevos entornos y en la mezcla genética de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden generar variabilidad en las poblaciones de levaduras, lo que puede permitir la adaptación a nuevos entornos o condiciones cambiantes. Las características reproductivas, como la velocidad de reproducción y la formación de esporas, pueden influir en la tasa de crecimiento y en la persistencia de las poblaciones de levaduras (Rosslenbroich y Stuebler 2000)

2.2.2 FERMENTACIÓN INOCULADA

Ciani et al. (2016) mencionan que el uso de cultivos iniciadores seleccionados está ampliamente difundido en la vinificación. En la fermentación pura, la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* inoculado para suprimir la microflora silvestre es una de las características más importantes que determina la capacidad del iniciador para dominar el proceso. Dado que el vino es el resultado de la interacción de varias especies y cepas de levadura, se dispone de muchos estudios sobre el efecto de los cultivos mixtos en la calidad final del vino. El uso de *S. cerevisiae* como cultivo iniciador es la práctica más extendida en la vinificación. Sin embargo, la inoculación de mostos con cepas seleccionadas de *Saccharomyces* no asegura su dominancia al final de la fermentación (Capece et al. 2010). De hecho, aunque poseen una alta competencia, las cepas comerciales no inhiben por completo las cepas silvestres hasta varios días después de iniciado el proceso. El cultivo iniciador debe competir no solo con levaduras no *Saccharomyces*, sino también con cepas autóctonas de *S. cerevisiae*, que teóricamente se adaptan mejor a las condiciones del mosto (Capece et al. 2012).

a. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LEVADURAS DEL MOSTO DE UVA

La industria en sus inicios usaba solo cepas de *Saccharomyces*, pero la nueva tendencia es tratar de analizar cultivos puros de fermentaciones espontáneas para seleccionar las levaduras con mejores características enológicas, incluyendo a las levaduras *no-Saccharomyces* (Epifanio 2005). La mayoría de bodegas utilizan *starter* seleccionados para sus fermentaciones sobre todo en países emergentes con poca tradición vitivinícola (Goold et al. 2017).

Si queremos seleccionar una levadura que aporte las características deseadas para nuestro producto existen dos posibilidades: su búsqueda directa en los viñedos o el uso de las técnicas de ingeniería genética (Epifanio 2005). Si aislamos una levadura endémica debemos realizar un análisis posterior de sus características enológicas y determinar su potencial como levadura útil. Dentro de las levaduras endémicas de la zona podremos seleccionar las cepas con mejores características y usarlas para el inóculo de los mostos de la región, los cuales responderán mejor al inóculo de levaduras de regiones diferentes (Epifanio 2005).

Los criterios de selección aplicados fueron descritos por (Rainieri y Pretorius 2000) quienes los dividen en: tecnológicos; los que establecen la eficiencia del proceso de fermentación y cualitativos que ayudan a determinar la composición química y la participación en las cualidades sensoriales de una bebida acabada (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las levaduras vínicas

Criterios de selección de levaduras enológicas	
Características de diferenciación	
Favorables	Desfavorables
Características macro y microscópicas Crecimiento sobre lisina Esporulación	
Características tecnológicas	
Favorables	Desfavorables
Tolerancia al etanol Poder de fermentación Cinética de fermentación Resistencia al anhídrido sulfuroso Formación de sedimento Factor killer Fermentación de azúcares glucosa y fructosa	Formación de espuma Formación de película, anillo
Características cualitativas	
Favorables	Desfavorables
Actividad β -glucosidasa	Formación de ácido a partir de glucosa Producción de ácido sulfhídrico

FUENTE: Tomado de Rainieri y Pretorius (2000)

Este criterio comienza con las “características de diferenciación”, entre ellas se incluyen las características macroscópicas que describen a las colonias *Saccharomyces spp.* de coloración blanca a crema, consistencia butirosa, cremosa, de forma circular cuando son sembradas en agar nutritivo. Con respecto a las “características tecnológicas”, se sabe que existe un gran número de sustancias, antisépticos químicos y antibióticos antifúngicos, que limitan a la multiplicación de las levaduras (Úbeda et al. 2014).

b. VINIFICACIÓN DEL MOSTO DE UVA

Con el conocimiento de que las levaduras son las responsables de la biotransformación del mosto (compuesto principalmente por glucosa y fructosa) en alcohol y dióxido de carbono, la vinificación comenzó a ser un proceso controlable desde la viña hasta el embotellado (Chambers y Pretorius 2010). En las fermentaciones vínicas interviene un gran número de especies de levaduras a lo largo de todo el proceso. Sin embargo, son las del género *Saccharomyces*, y en particular *Saccharomyces cerevisiae*, las que lo llevan a término (Ciani et al. 2004).

La microbiota que encontramos inicialmente en un mosto que va a ser fermentado depende de factores propios tanto de la uva como de la bodega, el método de recogida de la uva y su transporte, así como su temperatura, condición fitosanitaria y estado de maduración afectan a la flora microbiana propia de la uva, la adición de sulfitos, los tratamientos enzimáticos, el método de clarificación y, sobre todo, la adición de cultivos iniciadores en la bodega determinan también su población (Pretorius et al. 1999).

c. DINÁMICA DE LA POBLACIÓN DE LEVADURA DE VINO DURANTE LA FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA

Berradre et al. (2012) señalan que las fermentaciones espontáneas han mostrado siempre un alto grado de diversidad de cepas de la especie *S. cerevisiae*, (Querol et al. 1992) describieron en una fermentación espontánea una alta diversidad de cepas de esta especie durante todo el proceso de fermentación, hasta incluso en las fases finales. Las modernas tendencias en enología han apuntado siempre hacia una inoculación con una levadura seca activa para asegurar el inicio y final de la fermentación, así como una homogeneidad en el producto final vendimia tras vendimia. Berradre et al. (2012) dicen que durante la fermentación espontánea se ha observado una alta proporción de levaduras no-*Saccharomyces* durante los primeros días de fermentación. Estas levaduras, que hasta hace poco se han considerado dañinas en una fermentación, pueden producir algunos enzimas que potencien los aromas varietales, por lo que su desarrollo en las primeras fases de fermentación podría ser interesante. Recientemente, Andorrà et al. (2010) han realizado un trabajo en el que se realizan fermentaciones con inóculos de levaduras pertenecientes a las especies *S. cerevisiae*, *H. uvarum* y *Candida zemplinina* (previamente clasificada como *Candia stellata*), donde han encontrado que los vinos obtenidos con las

mezclas de las especies producían vinos con perfiles aromáticos que fueron más interesantes que aquellos producidos sólo con la especie *S. cerevisiae*. Por todo esto, (Berradre et al. 2012) menciona que la inoculación debe ser realizada de manera que permita que se exprese la microbiota natural de la uva, así podrán mostrar los vinos finales una mayor tipicidad.

2.2.3 FERMENTACIÓN MIXTA CONTROLADA

En fermentaciones mixtas, *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* la levadura no coexiste pasivamente; en cambio, muestran interacciones interesantes que pueden influir en el perfil analítico del vino (Andorrà et al. 2012). Las levaduras no *Saccharomyces* tienen características enológicas específicas que pueden tener efectos sobre el sabor y aroma del vino (Viana et al. 2008), el uso de fermentaciones mixtas de *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* se ha fomentado particularmente en vinos (Navarrete-Bolaños 2012) incluso cuando estas levaduras son generalmente reconocidas como levaduras de descomposición (Domizio et al. 2011). En un estudio, una cepa seleccionada de *Zygosaccharomyces florentina*, se utilizó en fermentaciones mixtas en inóculo diferente con *Saccharomyces cerevisiae*, provocó un aumento de la producción de polisacáridos y una modulación de las concentraciones finales de los diversos compuestos volátiles (Domizio et al. 2011).

a. LAS LEVADURAS NO SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMO INSTRUMENTO BIOTECNOLÓGICO

La biotecnología aplicada a la vinificación incluye varios aspectos de la industria de la fermentación, como el seguimiento de las poblaciones microbianas, el uso de cultivos iniciadores seleccionados y el control de levaduras no deseadas (King y Richard Dickinson 2000). Las fermentaciones mixtas que utilizan inoculaciones controladas de cultivos iniciadores de *Saccharomyces cerevisiae* y levaduras no *Saccharomyces* representan una forma práctica de mejorar la complejidad del vino y mejorar las características específicas de un vino (King y Richard Dickinson 2000). De hecho, los mostos de uva inoculado con cultivos puros de levaduras no *Saccharomyces* han demostrado producir varios metabolitos en condiciones desfavorables, incluidos el ácido acético, acetona, acetato de etilo y acetaldehído; esto excluiría, por tanto, el uso de tales levaduras no *Saccharomyces* en cultivos iniciadores seleccionados (Fleet 2003).

Sin embargo, cuando se cultivan levaduras no *Saccharomyces* como fermentaciones mixtas con la cepa de *S. cerevisiae*, es posible que no se expresen actividades metabólicas negativas (Kim et al. 2008).

2.3 ECOLOGÍA MICROBIANA EN EL VINO

Se produce una sucesión de poblaciones de microorganismos desde las uvas hasta el vino, actualmente, la mayoría de levaduras son seleccionadas y pertenecen al género *Saccharomyces* y habitualmente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, es decir, estas levaduras estarían presentes desde el inicio de la fermentación alcohólica (Barata et al. 2012). Las levaduras inoculadas producen una disminución de la población bacteriana, pero facilitan el desarrollo de otras bacterias. Tras la fermentación alcohólica, la población de *Saccharomyces cerevisiae* disminuye, aunque se mantiene presente hasta el vino final. Al principio de la fermentación maloláctica se observan bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*, siendo *Lactobacillus* el género predominante y *Oenococcus* minoritario (López Alfaro 2004) (Figura 1).

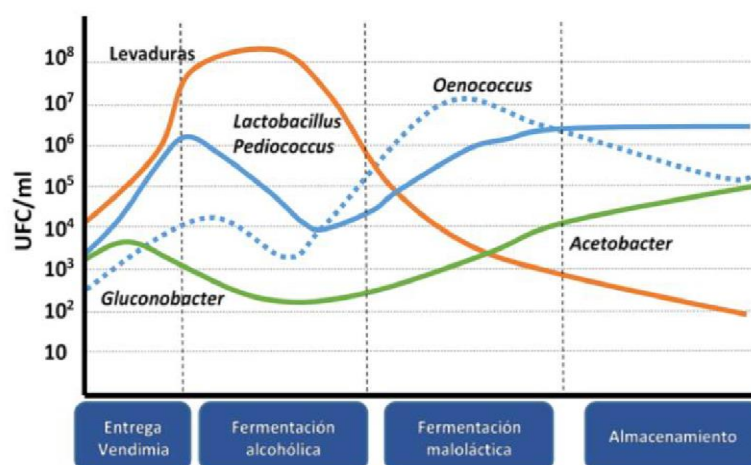


Figura 1. La ecología y su evolución de los microorganismos del vino: levaduras, bacterias lácticas y acéticas durante el proceso de vinificación y crianza. Representa la cantidad de células/ mL en cada fase de la producción del vino.

Fuente: López Alfaro (2004)

2.3.1 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE LA COMUNIDAD MICROBIOTA DEL VINO

Los microbios viven en asociaciones complejas con los tejidos de la uva y juegan un papel vital en la salud y productividad de la planta (Berg et al. 2005). Microorganismos de la vid (*Vitis vinífera*) suelen tener una influencia directa en las propiedades de las plantas y pueden estar implicadas en la fijación de nitrógeno, aceleración del crecimiento vegetal y control de patógenos vegetales (Zhang et al. 2017). La flora microbiana también puede conducir a enfermedades como el mildiú vellosa (*Plasmopara vitícola*), polvoriento mildiu *Erysiphe necator*) y podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), que modula sustancialmente el desarrollo y calidad del vino (Bokulich et al. 2016).

A continuación, se definen las medidas de biodiversidad para el estudio de un ecosistema:

- **Diversidad Alfa:** es la diversidad de especies existentes en un hábitat determinado. Se mide por la riqueza (número de especies) y la distribución de estas. La riqueza hallada va a depender fuertemente del tipo de muestreo realizado. Para corregir el sesgo introducido por el muestreo, se utilizan estimadores, como el índice de Chao (Magurran 2021).
- **Diversidad Beta:** es la tasa de cambio a lo largo de un gradiente o entre diferentes hábitats. Puede establecerse considerando sólo la composición de especies, mediante los índices de similitud de Jaccard, o la abundancia relativa de especies, con los índices de Bray-Curtis o Morisita-Horn (Anderson et al. 2011).
- **Diversidad Gamma:** es la intrínseca de un sitio, es decir, comprende las diversidades Alfa y Beta. Estima la variedad de especies en una zona determinada, incluyendo todas las comunidades que se encuentran en el sitio (Jost 2007).

2.3.2 AROMA SECUNDARIO: FERMENTACIÓN DEL MOSTO DE UVA

El aroma viene determinado por compuestos de naturaleza volátil, como son, alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas e hidrocarburos. Por el contrario, en el sabor influyen compuestos no volátiles tales como azúcares, ácidos orgánicos, derivados fenólicos y sustancias minerales (Carpena et al. 2020). Al igual que en otros muchos alimentos, el aroma de un vino está determinado por varios cientos de compuestos volátiles de diversa naturaleza química. Hasta la

fecha, se han identificado más de 680 compuestos volátiles, lo que indica su complejidad (Borren y Tian 2020). En términos enológicos y atendiendo al origen de los compuestos que lo constituyen, el perfil aromático de un vino se clasifica en tres categorías: aroma varietal o primario, aroma fermentativo o secundario y *bouquet* o aroma terciario (Styger et al. 2011).

2.4 EL PISCO

Cacho et al. (2013) mencionan que el Pisco es uno de los productos bandera del Perú, obtenido por destilación de un mosto recientemente fermentado de una gran variedad de uvas denominadas pisqueras y de producción en diferentes valles de la costa peruana y es considerado y valorado como una bebida de alta calidad por la materia prima utilizada y tecnología utilizada en su producción.

2.4.1 ORIGEN, VARIEDADES Y ZONAS PISQUERAS

a. ORIGEN

El término “Pisco” proviene del idioma quechua. “Pisqueras” hacía referencia a las aves pequeñas. Se cree que esta bebida tomó este nombre por varias razones: (a) porque se prepara a partir de las uvas pequeñas; (b) porque la ciudad donde se inició su producción y distribución se llamaba Pisco y/o (c) porque el primer aguardiente de uva que se produjo en el Perú se almacenó casualmente en unos recipientes fabricados desde la época del imperio Inca denominados piskos (Huertas Vallejos 2004).

Las primeras plantaciones de uva llegaron a Perú a mediados del siglo XVI, procedentes de las Islas Canarias con el fin de producir vino de consagrar para ser utilizado en los actos religiosos. Así, inicialmente la producción de uvas se destinó a la elaboración de vino. Sin embargo, a finales del mismo siglo, comenzó la elaboración de aguardiente de uva en los poblados de Ica y Pisco (Perú), que fueron comercializados a lo largo de la costa peruana (Huertas Vallejos 2004). A partir del siglo XVII se incrementó la producción de este aguardiente a gran escala en los departamentos de Lima, Arequipa, Cuzco, Ayacucho y Potosí, que era vendida por los jesuitas en territorios de dominio español a través del puerto de Pisco. Por todo ello, el comercio del Pisco creció con destino a los puertos del Pacífico. En el siglo XVIII la exportación de aguardiente de Pisco era mayor que la del vino, y en el año 1767 la producción de este

aguardiente ya representaba el 90 por ciento de la producción vinícola total, ya que los residuos y los vinos convertidos en vinagre también eran utilizados para producir esta bebida. La calidad de este producto, procedente de la fermentación de uvas especiales tratadas en alambiques de cobre, llegó a tener un gran realce y prestigio en el transcurso de los siglos XVII, XVIII y XIX, no solamente en el territorio del Perú, sino también fuera de él, llegando a países de Europa y a Estados Unidos de América (California). A partir de 1764 el nombre “aguardiente de Pisco” pasó a nombrarse como “Pisco” directamente (Lacoste et al. 2010). Más adelante la denominación “Pisco” se convirtió en un referente del aguardiente del Perú. Pero no fue hasta 1990 cuando el destilado denominado Pisco fue declarado como Denominación de Origen peruana mediante la resolución N.º 072087-DIPI, de la Dirección de Propiedad Industrial del Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas-ITINTEC. Un año después, se fija oficialmente el territorio de producción del Pisco del Perú en la zona costera de los departamentos de Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y los valles de Locumba, Sama y Caplina en el departamento de Tacna, mediante el Decreto Supremo N° 001-91- ICTI/IND del 16 de enero de 1991. Actualmente, este destilado es reconocido por la Organización Mundial de Propiedad Intelectual (OMPI) como Denominación de Origen de Perú, aunque algunos países de Europa, reconocen también con el nombre de Pisco al aguardiente de uva de Chile, que lo incluyó en sus tratados de libre comercio antes que Perú (Harrell 2009).

b. VARIEDADES

El Pisco peruano se obtiene de diferentes variedades de uva, dentro de las cuales se pueden distinguir el grupo de las uvas aromáticas como la Italia, Albilla, Moscatel y Torontel y el grupo de las uvas no-aromática como la Quebranta, Negra Criolla, Mollar y Uvina. Las variedades más representativas para la elaboración del Pisco peruano son la Italia y Quebranta; además la uva Italia es una de las variedades aromáticas con más alta producción en este sector (Huertas Vallejos 2004).

Las uvas pisqueras son ocho. Su especie y sus zonas de cultivo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Variedades de uvas pisqueras

Uva pisquera	Especie	Zona de cultivo
Quebranta	<i>Vitis vinífera L.</i>	Todas las zonas pisqueras
Negra Criolla	<i>Vitis vinífera L.</i>	Todas las zonas pisqueras
Mollar	<i>Vitis vinífera L.</i>	Todas las zonas pisqueras
Italia	<i>Vitis vinífera L.</i>	Todas las zonas pisqueras
Moscatel	<i>Vitis vinífera L.</i>	Todas las zonas pisqueras
Albilla	<i>Vitis vinífera L.</i>	Todas las zonas pisqueras
Torontel	<i>Vitis vinífera L.</i>	Todas las zonas pisqueras
Uvina	<i>Vitis aestivalis M.- cinerea</i> <i>E. x Vitis vinífera L</i>	Cultivo y producción circunscritos únicamente a los distritos de Lunahuaná, Pacarán y Zuñiga, de la provincia de Cañete, departamento de Lima

FUENTE: INDECOPI, (2011)

Son uvas no aromáticas las uvas: Quebranta, Negra Criolla, Mollar y Uvina y uvas aromáticas las uvas Italia, Moscatel, Albilla y Torontel (INDECOPI 2011). En cuanto a las variedades aromáticas Italia, Moscatel y Torontel, (Filho 2018) presenta la siguiente descripción:

Italia: esta variedad de uvas blancas es utilizada tanto como uva de mesa como para elaborar Pisco aromático, resultando un excelente producto. Sus racimos son sueltos, sus granos grandes, de forma oval, su película es gruesa y de color verde claro pasando a amarillo pajoso por efecto de la insolación y de una maduración más intensa. Se caracteriza por su riqueza en compuestos aromáticos tipo moscato muy pronunciado haciendo que se obtenga un Pisco de exquisito perfume.

Torontel: esta variedad aromática pertenece a la familia de los moscatos. Presenta cáscara de color verde pálido, pero por la acción de los rayos solares, las uvas pueden tornarse de color dorado tostado. Ofrece aromas de moscatel, similares a la uva Italia, pero más fina. Sus Piscos son elegantes, de aromas delicados y bien estructurados, evoca frutas tropicales y flores blancas como jazmín y magnolia.

Moscatel: esta variedad es importada. Sus racimos de mediano tamaño y de forma casi cilíndrica. Su mosto posee aroma característico de moscato, siendo muy azucarado. Presenta

rendimiento menor que las demás variedades, pero ofrece un Pisco muy fino de aroma y sabor delicado.

c. ZONAS PISQUERAS DEL PERÚ

Este es producido en la costa de los departamentos de Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y los Valles de Locumba, Sama y Caplina del departamento de Tacna (Figura 2) (INDECOPI 2011).



Figura 2. Zona Geográfica de la Denominación de Origen Pisco
Fuente: INDECOPI, (2011).

2.4.2 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PISCO

a. MATERIA PRIMA

Los controles se realizan en primer lugar sobre la uva, que cosechada convenientemente en recipientes no contaminantes como jabas de plástico deberá presentar un buen estado sanitario, exenta de restos de pesticidas o sustancias peligrosas que puedan influenciar el normal desarrollo de la fermentación alcohólica o transformarse en componentes volátiles tóxicos que pasen al destilado (INDECOPI 2011).

b. MOSTO

El procesado de la uva, para la obtención del mosto, se debe realizar lo más rápido posible, para evitar la oxidación del mosto. Este proceso deberá hacerse en condiciones higiénicas óptimas para conservar en el mosto las bondades intrínsecas de la uva que luego harán parte de las características cualitativas del destilado (INDECOPI 2011).

El prensado tiene por objeto extraer la solución acuosa contenida en las bayas, así como ciertos compuestos del hollejo bajo el efecto de la presión. Esta operación se realiza en una prensa, que es en general un cilindro en el interior del cual la vendimia es comprimida, sea por el movimiento de uno o dos platos (prensas mecánicas) o por el inflado de una membrana (prensas neumáticas). La presión aplicada debe ser progresiva y alcanzar valores finales bastante reactivos y demasiado para no romper los raspones, los hollejos y las pepitas (INDECOPI 2011).

c. FERMENTACIÓN

Proceso por el cual el azúcar del mosto se transforma, principalmente, en alcohol y gas carbónico, por acción de las levaduras alcohólicas (Hidalgo et al. 2016). Generalmente el mosto fermentado está listo para la destilación después de 7 a 15 días de fermentación; sin embargo, debe señalarse que para la elaboración del Pisco mosto verde, se utilizan caldos incompletamente fermentados (INDECOPI 2011).

2.4.3 COMPOSICIÓN DEL PISCO: LEGISLACIÓN PERUANA DEL PISCO

Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 3. En ella se han podido detectar hasta 19 compuestos químicos diferentes, pero sobre una cantidad de variedades más pequeña (Garrido et al. 2008).

Tabla 3. Composición de los Piscos

Componentes	ITA	QUEB	TOR	MOSC	ALB	MOL	UVI
Metanol	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Etanol	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Propan-1-ol	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Isobutanol	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
3 – Metil Butan-1-ol	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	X
2 – Metil Butan-1-ol	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	X
Dietil Acetal	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	X	SÍ	SÍ
Etil Acetato	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	X

FUENTE: Garrido et al. (2008)

Hidalgo et al. (2016) indican que el Pisco está constituido por una gran variedad de compuestos volátiles, como terpenos, alcoholes superiores, ésteres, metanol, acetaldehído, ácido acético y furfural. Unos nocivos para la salud como el metanol, acetaldehído y furfural, y otros buenos para el aroma como esterés, terpenos, entre otros. El sabor y aroma del Pisco es frutado y floral, características aportadas por los terpenos y diversos esterés, que provienen de la variedad de uva usada y los procesos de elaboración (fermentación y destilación) (Šipiczki et al. 2005).

2.4.4 COMPUESTOS AROMATICOS DEL PISCO

Se consideran componentes volátiles y congéneres del Pisco, las siguientes sustancias: ésteres, furfural, ácido acético, aldehídos, alcoholes superiores y alcohol metílico (INDECOPI 2011). Estos componentes están influenciados por varios factores durante el proceso de producción, entre los cuales podemos distinguir los siguientes aromas de sustancias generadas durante el proceso de destilación y aromas de sustancias generadas durante el proceso de maduración o envejecimiento (INDECOPI 2011).

2.4.5 COMPUESTOS VOLÁTILES DEL PISCO

Las bebidas destiladas son mezclas muy complejas que contienen cientos de compuestos individuales en una matriz de etanol y agua, mejorados o modificados por efectos sinérgicos o de enmascaramiento. Su papel en la formación del sabor del vino depende de su abundancia y

umbrales de olor (Falqué et al. 2001). El umbral de olor se define como la cantidad mínima de odorante que se debe agregar a una matriz de referencia para causar una diferencia sensorial significativa. Es diferente en agua pura y en soluciones modelo de alcohol diluido que oscilan entre 10 y 40 por ciento de etanol en agua (v/v). Por ejemplo, los umbrales correspondientes al linalool son 5, 50, 1000 $\mu\text{g/L}$ para agua, 10 y 40% de etanol/agua (v/v). El valor de la actividad del olor es una medida de la importancia de un compuesto específico para el olor (Cacho et al. 2012). Se calcula como la relación entre la concentración de la sustancia individual y su concentración umbral. El análisis de dilución de extracto de aroma también se puede utilizar para identificar los compuestos de aroma más importantes y determinar el factor de dilución de sabor más alto (Zhao et al. 2009).

Se han detectado más de 500 sustancias en bebidas espirituosas que pertenecen a un gran número de clases químicas, como terpenos, alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos y fenoles. Sin embargo, solo algunas de estas sustancias son importantes por su contribución a las características sensoriales del brandy. Muy recientemente, se ha empleado el uso de marcadores químicos para rastrear la contribución sensorial de cada una de las tres etapas posteriores a la fermentación del Pisco chileno. Utilizando métodos estadísticos multivariantes y aplicando heurísticas para igualar la diferenciación sensorial y química de muestras de Pisco, lograron determinar la principal contribución sensorial de los destilados de vinos de mezcla y crianza siguiendo la concentración de un solo marcador químico correspondiente (Lillo et al. 2005).

a. Terpenos

Los terpenos están presentes principalmente en los hollejos de la uva. Su concentración es particularmente alta en las variedades de uva moscatel. Se han identificado alrededor de 40 compuestos terpénicos en las uvas. Algunos de los alcoholes monoterpénicos, que poseen un aroma floral característico, se encuentran entre los más odoríferos, especialmente el linalol, α -terpineol, nerol, geraniol, citronelol y hotrienol. Los umbrales de percepción olfativa de estos compuestos son bastante bajos (algunos cientos de microgramos por litro). En los vinos moscatel, los terpenos se encuentran libres o unidos a azúcares en forma de glucósidos. Estos últimos también se denominan precursores del aroma, ya que no pueden expresar su carácter aromático. Sin embargo, tras la hidrólisis, que se produce durante la destilación, estos precursores liberan terpenos libres. Sin embargo, una temperatura de destilación alta y un pH

bajo pueden oxidar los terpenos, dando lugar a formas odorantes menos positivas o negativas (Osorio et al. 2004).

b. Alcoholes

El contenido de etanol del aguardiente de vino es habitualmente del 70 por ciento (v/v) con una recuperación del 99 por ciento, mientras que el contenido de etanol del Pisco, es del orden del 40 por ciento (v/v) (Tsakiris et al. 2014). El metanol (alcohol metílico) no se produce por fermentación alcohólica. Se forma exclusivamente a partir de la hidrólisis enzimática de los grupos metoxilo de las pectinas durante la fermentación. Siempre está presente en cantidades muy pequeñas, 40-60 mg/L en el vino. Sin embargo, en destilados se encuentra en concentraciones superiores 0,30-0,70 g/L de alcohol puro con una recuperación del 90 por ciento. Su sabor es similar al etanol y no afecta la calidad organoléptica de los licores. Sin embargo, afecta la seguridad del Pisco porque su toxicidad es bien conocida (Medinsky y Dorman 1995). El metanol se reduce durante el envejecimiento en barricas (Panosyan et al. 2001).

Los alcoholes de fermentación con más de dos átomos de carbono se conocen como alcoholes superiores. Son sintetizados por levaduras durante la fermentación, ya sea directamente a partir de azúcares o de aminoácidos de uva a través de la reacción de Ehrlich. En el vino, el mayor contenido de alcohol permanece casi inalterado antes de la destilación. Cuantitativamente, los alcoholes superiores más importantes son los alcoholes de cadena lineal: 1-propanol, alcohol isobutílico (metil-2-propanol-1) y alcoholes amílicos (una mezcla de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol). La mayoría de los alcoholes de cadena lineal y sus ésteres tienen un fuerte olor acre. A bajas concentraciones contribuyen a la complejidad aromática, pero a niveles más altos se caracterizan por olores penetrantes que enmascaran la finura aromática. En licores destilados, como brandis, Pisco, ron y whisky. Alcanzan concentraciones en el rango de 150 a 550 mg/L en vino y de 2,5 a 5,0 g/L de alcohol puro en destilados. La recuperación es de aproximadamente el 90 por ciento con la excepción del 2-fenil-etanol que se recupera en un 10% (Tsakiris et al. 2014). El olor herbáceo de los aguardientes se debe a los compuestos carbonílicos derivados de la uva con seis átomos de carbono. Las uvas inmaduras y las prensas continuas pueden inducir sabores herbáceos al liberar compuestos, como hexanoles (hexanol-1 y hexanol-2) y hexenoles (*cis*-3-hexeno-1-ol, *trans*-2-hexeno-1-ol, *cis*-2-hexeno-1-ol). El 1-

Octen-3-ol se caracteriza por un olor a hongo y se produce en uvas infectadas por *Botrytis cinérea* (Falqué et al. 2001).

c. Ácidos volátiles

El ácido acético es el principal ácido volátil y contribuye en gran medida a la acidez volátil. Tiene un olor intenso avinagrado y su concentración aumenta significativamente durante la crianza del vino. En el vino se encuentra en concentraciones que van de 300 a 700 mg/L, mientras que en los destilados la concentración varía de 0,20 a 1,0 g/L de alcohol puro. La recuperación es tan baja como del 2 al 5 por ciento debido a la eliminación de las cabezas de destilación. Sin embargo, los destilados producidos por destilación continua pueden contener cantidades más altas de ácido acético debido a la ausencia de remoción de las cabezas de destilación (Tsakiris et al. 2014). También pueden estar presentes otros ácidos carboxílicos, como el ácido propiónico y los ácidos butíricos, y también están asociados con la actividad bacteriana. El ácido butírico se caracteriza por desagradables aromas a mantequilla y queso y su concentración aumenta durante el envejecimiento. Las levaduras forman los ácidos hexanoico, octanoico, decanoico, dodecanoico, mirístico (14 átomos de carbono), palmítico (16 átomos de carbono) y esteárico (18 átomos de carbono) (Lillo et al. 2005).

d. Ésteres etílicos

Los ésteres son productos de condensación del grupo carboxilo de un ácido orgánico y el grupo hidroxilo de un alcohol o un fenol. Los ésteres son producidos por levaduras después de que ha cesado la división celular. También pueden estar presentes en las uvas, pero su cantidad e importancia sensorial suelen ser insignificantes. Los ésteres están presentes en los aguardientes frescos y al tener aspectos afrutados, tienen una contribución importante en el desarrollo de su aroma. Se han identificado más de 160 ésteres en vinos y la mayoría de ellos también están presentes en el Pisco. La recuperación varía del 40 al 60% según la técnica de destilación. De los ésteres de ácidos monocarboxílicos, los más importantes son los basados en etanol y ácidos carboxílicos saturados, como los ácidos hexanoico (caproico), octanoico (caprílico) y decanoico (cáprico). El contenido de ésteres etílicos de los brandis aumenta durante el envejecimiento, como consecuencia de la esterificación lenta de diferentes ácidos orgánicos con etanol (Tsakiris et al. 2014). La concentración de butirato de etilo aumenta con el envejecimiento, con la

ausencia de agentes antioxidantes y antimicrobianos, y principalmente con el aumento de la temperatura. Las levaduras producen una pequeña cantidad durante la fermentación, pero se forma principalmente por la actividad de las bacterias aerobias acéticas. Los destilados y brandis contienen alrededor de 0,4 a 0,8 g/L de alcohol puro. El acetato de etilo tiene una recuperación del 100% en destilación continua y del 60% en destilación discontinua (Campo et al. 2007).

e. Acetatos de alcoholes superiores

También es importante la formación de ésteres entre el ácido acético y los alcoholes superiores, ya que pueden proporcionar un carácter afrutado. Por ejemplo, el acetato de isoamilo, que tiene un olor característico a plátano, influye positivamente en el aroma del Pisco. Las bajas temperaturas de fermentación favorecen la síntesis de ésteres afrutados, como los acetatos de isoamilo, isobutilo y hexilo, mientras que las temperaturas más altas favorecen la producción de ésteres de mayor peso molecular (Tsakiris et al. 2014). Tanto los bajos niveles de SO₂ como la clarificación del jugo favorecen la síntesis y retención de ésteres. La ausencia de oxígeno durante la fermentación de la levadura mejora la formación de ésteres. La síntesis de ésteres y la descomposición hidrolítica continúan de forma no enzimática durante el envejecimiento en función de la composición química y las condiciones de almacenamiento del Pisco (Saerens et al. 2010).

f. Aldehídos y cetonas

El acetaldehído (etanal) es el principal aldehído que se encuentra en el vino. Es uno de los primeros subproductos metabólicos de la fermentación de la levadura. Se produce más acetaldehído a través de la autooxidación del etanol. Una cantidad importante se une al anhídrido sulfuroso en los casos en que se ha añadido al vino base. La toxicidad asociada al acetaldehído es bien conocida y su presencia en las bebidas alcohólicas se relaciona con bastante frecuencia con náuseas y vómitos. En destilados y aguardientes se encuentra en concentraciones que oscilan entre 0,20 y 0,25 g/L de alcohol puro (Tsakiris et al. 2014).

Otros aldehídos que se pueden encontrar en los brandis son el formaldehído, el 5-hidroxiacetilfurfural, la acroleína, el propionaldehído, el butiraldehído, el benzaldehído, el isovaleraldehído y el *n*-valeraldehído. El contenido aldehídico del Pisco se puede analizar

mediante HPLC de fase inversa (Nascimento et al. 1997). El isobutanal en concentraciones superiores a 25 mg/L podría dar un carácter herbáceo al Pisco. La β -damascenona es una cetona isoprenoide presente en las uvas. Dado que es un compuesto altamente odorífero con una fragancia poderosa y agradable, es un compuesto importante en las industrias de perfumes y saborizantes. Como tiene un umbral sensorial muy bajo, se considera que la β -damascenona es un compuesto de olor clave en el Pisco, que imparte un carácter de manzana estofada, frutal-floral y parecido a la miel (Carneiro et al. 2006).

g. Derivados del azufre

El Pisco puede contener concentraciones extremadamente bajas de diferentes compuestos de azufre volátiles desagradables (huevos podridos, ajo), como sulfuro de hidrógeno, sulfuro de carbonilo, dióxido de azufre, tioles, sulfuros, polisulfuros y tioesteres. La determinación de estos compuestos en vinos y licores es difícil debido a su volatilidad y sus bajísimas concentraciones, que requieren el uso de detectores de alta sensibilidad. Entre las diferentes técnicas analíticas, la separación por cromatografía de gases junto con la detección específica de azufre, es decir, la detección fotométrica de llama es el método más utilizado (Tsakiris *et al.* 2014).

h. Carbamato de etilo

El carbamato de etilo es un compuesto cancerígeno potencial y su presencia se controla estrictamente en vinos y bebidas espirituosas. Las levaduras pueden estar involucradas en la síntesis de carbamato de etilo a través de la producción de fosfato de carbamil y por la síntesis y degradación de urea (Tsakiris et al. 2014). El método oficial de determinación de carbamato de etilo en bebidas alcohólicas es GC-MS. Sin embargo, también se han empleado otros métodos como HPLC y HPLC con derivatización de fluorescencia posterior a la columna (Li et al. 2015).

i. Compuestos orgánicos de estaño

Los compuestos orgánicos de estaño se utilizan ampliamente en la agricultura y la industria. También pueden estar presentes en bebidas espirituosas y vinos. Debido a su alta toxicidad, incluso en concentraciones muy bajas, se deben emplear procedimientos analíticos

sensibles y selectivos para su análisis (Tsakiris et al. 2014). Se identificó una tetrahydro- β -carbolina (1-metil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina-3-carboxílico éster etílico del ácido) en bebidas alcohólicas en cantidades que van desde niveles indetectables hasta 534 mg/L. Para su identificación se utilizó RP-HPLC con detección de fluorescencia y GC-MS (Herraiz 1999).

j. Tricloroanisol

En las bebidas espirituosas, se describió que el 2,4,6-tricloroanisol posee un aroma similar al de la nuez y puede ser perceptible entre 5 y 30 min después de su consumo (Butzke et al. 1998).

k. Furfural y compuestos furánicos

Otro aldehído que tiene un impacto sensorial de horneado en el Pisco es el furfural (0,5–82,5 mg/L de alcohol puro). Su síntesis implica la oxidación de azúcares y se activa con el calor. Se produce principalmente durante la destilación a partir del contenido restante de pentosa de las lías y, en consecuencia, está muy influenciado por el sistema de destilación empleado (Tsakiris et al. 2014).

2.5 EVALUACIÓN SENSORIAL

La evaluación sensorial constituye un campo de estudio interdisciplinario donde seres humanos en calidad de evaluadores, usan sus sentidos visuales, gustativos, olfativos, táctiles y auditivos para determinar las cualidades sensoriales y el grado de aceptación de productos comestibles y de una amplia gama de productos (Lawless y Heymann 2010). Por otro lado, los enfoques convencionales para investigar estas propiedades sensoriales, como el uso de grupos de catadores expertos, dispositivos de medición de color y equipos para evaluar la textura, tienden a ser métodos que requieren un alto grado de intervención y esfuerzo, además de estar limitados a pequeñas muestras (Özdoğan et al. 2021). Finalmente, este proceso de evaluación sensorial busca cuantificar las reacciones humanas hacia los productos alimenticios, implementando estrategias para reducir los prejuicios que podrían alterar la percepción, tales como la marca o información adicional del producto (Mukhopadhyay et al. 2013).

2.5.1 FACTORES QUE AFECTAN LA PERCEPCIÓN SENSORIAL

Las pruebas sensoriales deben realizarse bajo condiciones estandarizadas y controladas, minimizando sesgos psicológicos, como el error del estímulo y el efecto halo, y fisiológicos como la adaptación, que afectan las respuestas humanas (Lesschaeve y Noble 2022). Además, es fundamental reconocer a los participantes como instrumentos de medición que cambian con el tiempo y difieren entre ellos, siendo susceptibles a prejuicios. Es crucial identificar los elementos psicológicos que pueden afectar a un participante para reducir estas diferencias (Carr *et al.* 2007). Debido a que los errores en los análisis sensoriales pueden distorsionar los resultados de las pruebas es necesario prevenirlos, es esencial ocultar información previa sobre las muestras (error de expectativa), alternar el orden de presentación de las mismas para evitar preferencias por familiaridad (error de habituación) y asegurar que las muestras sean comparables en apariencia para que solo se evalúe la característica de interés (error de estímulo) (Carr *et al.* 2007).

2.5.2 BUENAS PRÁCTICAS DE EVALUACIÓN SENSORIAL

Las pruebas sensoriales deben realizarse en un entorno controlado, libre de interrupciones visuales, sonoras y olfativas, como olores a comida o café que podrían afectar los resultados. Es esencial que el espacio sea silencioso, con temperatura regulada y sin olores. Aunque no es imprescindible, se aconseja mantener una presión de aire positiva en la sala de degustación o asegurarse de que el aire se pueda renovar eficazmente (Lesschaeve y Noble 2022).

2.5.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS SENSORIALES DESCRIPTIVOS

Actualmente, las prácticas sensoriales estándar en la industria y en la academia están evolucionando, gracias a la incorporación de métodos avanzados que minimizan sesgos y proporcionan una visión más integral de la percepción sensorial. Herramientas como el monitoreo biométrico, entornos inmersivos como la realidad virtual y aumentada, y la inteligencia artificial se están utilizando para enriquecer nuestro entendimiento sobre cómo los consumidores interactúan sensorialmente con alimentos y bebidas (Torrico *et al.* 2023). Por otro lado, los métodos descriptivos en análisis sensorial evalúan cómo los sentidos humanos perciben un producto, basándose en principios de neurofisiología y psicología. Tradicionalmente, estos

métodos han medido la intensidad promedio de las percepciones sensoriales, sin enfocarse en la variación de estas percepciones a lo largo del tiempo (Di Monaco et al. 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología de los alimentos y laboratorio de investigación de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). En el laboratorio de Biotecnología Enológica Aplicada del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) – España. La elaboración del Pisco se realizó en las instalaciones de la empresa Antonio Biondi e Hijos S.A.C – Moquegua.

3.2 MATERIA PRIMA, EQUIPOS, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Materia Prima:

- Las uvas se recogieron manualmente en tres zonas situadas en el valle de Moquegua, que tiene denominación de origen (Anexo 1). Dieciocho muestras de uva de la variedad Italia (I) y 18 muestras de la variedad Negra Criolla (NC) fueron transferidas asépticamente a recipientes plásticos estériles de 100 mL y almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Se recolectaron 20 kg de uvas de las variedades Italia y Negra Criolla para la producción de Pisco.

EQUIPOS:

- Cabina de Bioseguridad (Marca Telstar)
- Centrifuga Hettich 320 R (Marca Hettich)
- Centrífuga de vacío (Speed Vac - SPD 111V, Savant Instruments de Thermo Scientific, Midland - EE.UU.)
- Incubadora orbital refrigerado (Marca Inforst HT)
- Real Time PCR (Marca Applied Biosystems Vii7)
- Baño Termostatizado (Marca Memmert)

- Incubadora programable (Sanyo)
- Autoclave Tomy (Marca SX-700E)
- Ultracongelador -80°C Sanyo MIC (Marca Sanyo)
- Micropipetas p100µ, p200 µ, p20 µ (Eppendorf)
- Vortex 06 (Marca VWR)
- Nanodrop 1000 (Termo Scientific)
- Secuenciador 3730xl DNA Analyzer (96 capilares, Applied Biosystems).
- Espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo Scientific, EE.UU.)
- Estación VacMaster 10(Biotage)
- Cromatografo de gases 436GC acoplado a un detector EVOQ GC-TQ (MSD) (Bruker, Billerica, MA, USA)
- Alambique de cobre de 20 L

REACTIVOS Y MEDIOS:

- Agar dextrosa sabouraud con cloranfenicol (Laboratorio Conda)
- Agar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (Laboratorio Conda)
- Caldo dextrosa de papa (Laboratorio Conda)
- Kit de extracción de ADN número 78870 (Thermo scientific, Illinois-EE.UU.)
- Kits de secuenciación cíclica BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)
- Agua de peptona tamponada (PanReac Química S.L.U., España)
- PerfeCTa SYBR Green FastMix Low ROX (Quanta biosciences Laboratory Cat. No. 95074-012).
- Azúcar reductor (5-10 g), extracto de carne (1 g), peptona (10 g), cloruro sódico (5 g) y púrpura de bromocresol (0.015 g) (Laboratorio Conda)
- Pectina cítrica (Spectrum Chemical, Gardena, CA)
- Caldo de malta de levadura (YM) (Laboratorio Conda)
- Caldo YPD (glucosa 20 g/L, peptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, pH 5.6) (Laboratorio Conda)

- Las cepas de levaduras nativas: Cepas identificadas de la variedad Italia: *Pichia terrícola* (P), *Metschnikowia pulcherrima* (M), y *Naganishia vaughanmartinae* (N). Cepas de levaduras nativas de la variedad Negra Criolla: *Vishniacozyma carnescens* (C), *Vishniacozyma heimaeyensis* (V) y *Aureobasidium pullulans* (A).
- Diclorometano y metanol de grado HPLC (laboratorio Lab-Scan)
- Etanol 12 % v/v (laboratorio labKem)
- Los estándares químicos utilizados para las identificaciones de compuestos volátiles (Anexo 2)

3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA ETAPA I

3.3.1 Aislamiento y cultivo

Las uvas recolectadas se descongelaron a 25 °C durante 30 min y, a continuación, se seleccionaron aleatoriamente 10 g de las muestras de cada variedad de uva (I y NC) y se colocaron en un frasco estéril. A continuación, se añadieron 90 mL de caldo dextrosa de papa (Laboratorio Conda, Madrid, España) a cada frasco y se incubaron a 25 °C a 130 rpm durante 24 h (incubadora Sanyo - Modelo Mir 154) para promover el crecimiento del microbiota superficial de la uva. De cada frasco se tomó una muestra con un asa de siembra y se procedió al aislamiento de las levaduras en placas de Agar Sabouraud Cloranfenicol Dextrosa (SCD) y Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC) a 25 °C durante 72 h. De las placas, se seleccionaron al azar 34 colonias (24 y 10 colonias de las variedades Italia y Negra Criolla, respectivamente) en función de las diferencias de color y morfología y se volvieron a aislar en agar SDC a 25 °C durante 72 h. A continuación, se tomó una colonia aislada de cada una de las placas y se inoculó en tubos estériles de 25 mL que contenían caldo Dextrosa de Papa y se incubó a 25 °C a 150 rpm durante 96 h. Finalmente, se recogieron 10 mL del caldo de incubación y se congelaron a - 20 °C durante 24 h para provocar la lisis física de la membrana celular y facilitar la extracción del ADN de la levadura aislada.

3.3.2 Extracción, amplificación y secuenciación del ADN

El ADN se extrajo de la levadura aislada utilizando un kit de extracción de ADN N°. 78870 siguiendo las instrucciones del fabricante. La suspensión de células de levadura en medio de

agar caldo dextrosa de papa (10 mL) se centrifugó durante 5 min a 5000 g a temperatura ambiente. El precipitado obtenido (~ 70 mg) se resuspendió con 560 µL de reactivo de extracción de proteínas de levadura y la mezcla se incubó a 65 °C durante 10 min y después se centrifugó a 13 000 g durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 400 µL de reactivo de liberación de ADN A y B al precipitado, se homogeneizó la mezcla y se incubó a 65 °C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 200 µL de reactivo de eliminación de proteínas, se agitó varias veces y se centrifugó a 13000 x g durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos estériles de 1,5 mL. La precipitación del ADN se realizó añadiendo 600 µL de alcohol isopropílico, mezclando por inversión y centrifugando a 13000 g durante 10 min y eliminando el sobrenadante por aspiración. El ADN extraído se lavó añadiendo 1,5 mL de etanol al 70% v/v al pellet, suspensión y centrifugación a 13000 g durante 1 min. El pellet que contenía ADN se secó en una centrífuga de vacío durante 5 min y luego se resuspendió en 50 µl de agua de peptona tamponada por homogeneización durante 5 min. La concentración de ADN a 260 nm y la pureza como la relación A260 nm/A280 nm se midieron utilizando un Nanodrop 1000. La suspensión de ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El ADN se amplificó para los espaciadores transcritos internos ribosómicos (ITS) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores ITS1-F (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4-B (5'-TCCTCCGTCTATTGATATGC), que es específico para hongos y basidiomicetos (Gardes y Bruns 1993). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 96 °C durante 2. min 30 s, seguido de 40 ciclos a 60 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min y una extensión final a 72 °C durante 1 min. Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en un volumen de 20 µL con el concentrado comercial PerfeCTa SYBR Green FastMix Low ROX, concentrado 2X que contiene los componentes necesarios, a excepción del cebador cuya concentración fue de 0,5 µM. El ADN amplificado se purificó utilizando un kit ExoCleanUp (VWE-Life Science, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ADN se midieron en un Nanodrop 1000.

La secuenciación del ADN se realizó utilizando 100-150 ng de ADN (500 y 1000 pb) y los mismos cebadores (5 pmol) y el kit de secuenciación cíclica BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EE.UU.) en un analizador de ADN 3730xl (Applied Biosystems, EE.UU.). Previamente a la secuenciación del ADN, los productos de reacción se purificaron para eliminar

los ddNTPS y los cebadores libres utilizando Optima DTR 96 well Plate (EdgeBio, EE.UU.). La similitud de secuencias se obtuvo mediante el uso de Basic Local Alignment Search (BLAST) del National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). La identificación se consideró correcta cuando la identidad de las secuencias genéticas era del 98 % o superior.

3.3.3 Caracterización fenotípica

a. Fermentación de carbohidratos

Se analizó la capacidad de las cepas de levadura no *Saccharomyces* (NSYS) aisladas para fermentar diferentes carbohidratos como fructosa, melibiosa, sacarosa, glucosa, maltosa, manosa, rafinosa y lactosa (Garrity, G et al. 2005). Se inoculó un asa celular en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo estéril por filtración: azúcar reductor (5-10 g), extracto de carne (1 g), peptona (10 g), cloruro sódico (5 g) y púrpura de bromocresol (0.015 g) en 1 L de agua destilada a pH= 6.6. En cada tubo de ensayo se sumergió un tubo Durham invertido estéril. Para cada sustrato ensayado, se consideró positiva para la fermentación las muestras con producción de gas, y positiva para la formación de ácido los cambios en el color del indicador. Las pruebas se realizaron por duplicado y las lecturas se efectuaron a las 48 h.

b. Actividad poligalacturonasa

Antes del cribado de la actividad poligalacturonasa, las NSYS se cultivaron durante 24 h a 30 °C con agitación en caldo de malta de levadura (YM) a 200 rpm (para la levadura) suplementado con 1.5 % p/v de pectina cítrica, para inducir la producción de enzimas pectinolíticas (Golomb et al. 2013). Se inoculó un total de 5 µl de cada levadura constituyendo aproximadamente 5×10^6 células en los pocillos de la placa de ensayo de difusión que contenía agar YM suplementado con pectina que sirvieron como controles negativos para el ensayo. Las placas de ensayo de difusión se incubaron durante la noche a 30 °C y se midió el diámetro de las zonas circulares de aclaramiento para evaluar la capacidad de hidrolizar ácido poligalacturónico.

c. Tolerancia al etanol

El análisis de tolerancia al etanol se realizó en caldo YPD (glucosa 20 g/L, peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, pH 5.6) con cantidades específicas de etanol (6, 12 y 16 % v/v) (De La Torre-González *et al.* 2016). El asa de siembra de NSYS aislado se inoculó en caldo YPD y se incubó a 30 °C; el crecimiento se controló cualitativamente por turbidimetría a 600 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S (Sturm *et al.* 2014).

d. Producción de sulfito

Para medir la producción de sulfito se utilizó un ensayo colorimétrico basado en el verde de malaquita con algunas modificaciones (Sullivan *et al.* 1986). El asa de siembra aislado de NSYS se inocularon en solución estéril por filtración de carbohidratos (5 mL) y mosto de uva Italia o Negra criolla (5 mL) y se incubaron durante 48 h en anaerobiosis. A continuación, se añadieron 0,5 mL de solución de verde de malaquita (25%) por encima de la solución, se mezcló durante 2 min y se midió la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S. El sulfito producido se estimó a partir de una curva de calibración de sulfito de sodio (20-100 mg/L; $Y = -0.0029X + 0.304$, $R^2 = 0.995$).

e. Consumo de nitrógeno

El consumo de nitrógeno por las NSYS aisladas se midió como amonio utilizando el ensayo de Nessler (Fernandez-San Millan *et al.* 2020). La levadura aislada se inoculó en caldo YPD (extracto de levadura 1 % p/v, peptona 2 % p/v, glucosa 2 % p/v) y se incubó a 28 °C durante 48 h y 120 rpm. Quinientos microlitros de alícuotas se centrifugaron a 10000 g durante 5 min y 250 μ l se transfirieron a la placa de 96 pocillos y se mezclaron con 10 μ l de reactivo de Nessler (0.66 g de NaI, 1 g de HgI₂ y 0.42 g de KCl disueltos en 100 mL de NaOH 3M) y se incubaron hasta desarrollar un color entre amarillo y marrón, que se midió a 405 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo Scientific, EE.UU.). Se utilizó una curva estándar de cloruro de amonio (0.1-400 mg/L; $Y = 0.001 + 0.0156X$; $R^2 = 0.9982$) para estimar el contenido de amonio. El consumo de nitrógeno en porcentaje se estimó a partir de la concentración de amonio del medio inoculado y del medio puro.

3.3.4 Análisis de compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos del Pisco obtenido de las variedades de uva Italia y Negra Criolla fueron analizados por cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas utilizando el procedimiento descrito por (Cacho et al. 2012) con algunas modificaciones. La extracción en fase sólida (SPE) se realizó en una estación VacMaster 10 (Biotage, USA) utilizando cartucho LiChrolut EN, el cual se lavó con diclorometano (4 mL), metanol grado HPLC (4 mL) y etanol 12 % v/v (4 mL) para acondicionar. El Pisco se diluyó con agua Milli-Q para obtener muestras que contenían etanol 12 % v/v y se añadió β -damasceno como patrón interno (200 mg/L). A continuación, la muestra anterior se pasó por el cartucho de LiChrolut EN acondicionado y los compuestos retenidos se secaron al vacío (-0.6 bar durante 20 min) y se eluyeron con 1.6 mL de diclorometano. La muestra eluida se mezcló con los patrones internos 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona y 2-octanol disueltos en diclorometano (400 mg/L). Se inyectó un microlitro de muestra con split/splitless utilizando un automuestreador CTC en un cromatógrafo de gases Bruker 436GC acoplado a un Bruker EVOQ GC-TQ (MSD). La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C. El horno cromatográfico se mantuvo a 40 °C durante 5 min y luego se elevó a 136 °C a 4 °C/min y a 250 °C a 6 °C/min. El gas portador fue helio a un flujo constante de 1 mL/min. La columna capilar utilizada fue una Restek Rxi-5Sil MS: 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m de espesor de película. Los parámetros de la MS fueron línea de transferencia MS a 250 °C y temperatura de ionización de la cámara 200 °C con una energía de electrones de 70 eV. Se registró un rango de 35-350 m/z en modo de barrido completo. Se prepararon curvas estándar de compuestos volátiles en diclorometano para llevar a cabo el análisis cuantitativo (tabla 4).

Tabla 4. Datos de la calibración de 20 compuestos, los cuales son analizados mediante una extracción en fase sólida seguida de una inyección en un cromatógrafo de gases acoplado MS.

Compuesto	RT (min)	Curva estándar			Rango de calibrado (mg/L)
		Pendiente	Intercepción	R ²	
Butanoato de etilo (Eb) ¹	6.539	2x10 ⁻⁸	2x10 ⁻⁹	0.984	0.02016-2.016
Furfural (F) ²	7.600	1x10 ⁻⁸	8x10 ⁻¹⁰	0.995	0.02072-2.072
3-hexen-1-ol (3-H-ol) ¹	8.424	5x10 ⁻⁸	3x10 ⁻⁹	0.993	0.0168-1.68
1-hexanol(-H) ¹	9.247	3x10 ⁻⁸	7x10 ⁻¹⁰	0.999	0.02336-2.336
Acetato de isoamilo (Ia) ¹	9.535	2x10 ⁻⁸	2x10 ⁻¹⁰	0.994	0.02112-2.112
Etil valerato (Ev) ¹	10.527	2x10 ⁻⁸	1x10 ⁻⁹	0.984	0.01624-1.624
Etil hexanoato (Ehx) ¹	14.694	3x10 ⁻⁸	2x10 ⁻⁹	0.984	0.0164-1.64
Alcohol de bencilo (Ba) ¹	16.110	6x10 ⁻⁸	-4x10 ⁻¹⁰	0.994	0.02376-2.376
Etil heptanoato (Ehp) ²	18.651	2x10 ⁻⁸	7x10 ⁻¹⁰	0.994	0.01608-1.608
Linalol (L) ¹	18.788	2x10 ⁻⁸	6x10 ⁻¹⁰	0.999	0.01736-1.736
Alcohol de feniletilo (Pa) ³	19.517	7x10 ⁻⁸	-1x10 ⁻⁹	0.996	0.0268-2.68
α -Terpineol (α -T) ²	22.296	3x10 ⁻⁸	6x10 ⁻¹⁰	0.999	0.02016-2.016
Etil octanoato (Eo) ¹	22.391	2x10 ⁻⁸	9x10 ⁻¹⁰	0.991	0.03264-3.264
Nerol (N) ²	23.344	4x10 ⁻⁸	-1x10 ⁻⁹	0.999	0.0232-2.32
Citronelol (C) ²	23.447	2x10 ⁻⁸	-8x10 ⁻¹¹	0.999	0.02056-2.056
Geraniol (G) ¹	24.277	4x10 ⁻⁸	-2x10 ⁻⁹	0.999	0.0204-2.04
2-fenilacetato (2-Pa) ²	24.372	8x10 ⁻⁸	-8x10 ⁻⁹	0.998	0.05472-5.472
Etil pelargonato (Ep) ²	25.871	2x10 ⁻⁸	5x10 ⁻¹⁰	0.988	0.018-1.8
Etil decanoato (Ed) ³	29.160	4x10 ⁻⁹	4x10 ⁻¹⁰	0.965	0.01832-1.832
Etil laurato (El) ²	34.359	2x10 ⁻⁸	-3x10 ⁻¹⁰	0.971	0.0196-1.96

Comprado en los laboratorios: Sigma-Aldrich¹, Fluka² and Merk Schuchardt³

3.3.5 Análisis sensorial

El análisis sensorial del Pisco Italia y Negra Criolla se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por (Rabitti et al. 2022) con jueces expertos de 30-50 años de edad (4 mujeres y 6 hombres) de la Asociación Nacional de Catadores Oficiales- PISCO. En la primera fase, los jueces expertos seleccionaron 23 descriptores aromáticos para el análisis sensorial incluyendo: químico, frutal, cítrico, anisado, floral, rosas, hierbas, especiado, aceitoso, sulfuroso, avinagrado, emperreumático, caramelo, mantequilla, almíbar, alcohol, queso, cebolla, fenólico,

aceituna, frutos secos, vegetal, vegetal cocido. En la segunda fase, el juez identificó y evaluó la intensidad de los descriptores en la muestra de Pisco. El juez recibió 25 ml de Pisco en copas AFNOR, las cuales fueron codificadas con números de tres dígitos pegados con cinta adhesiva, se tapo con una placa petri para evitar la pérdida de los compuestos volátiles. El juez midió la intensidad de los descriptores utilizando una escala hedónica de cinco puntos, las muestras se sirvieron a 22 °C en orden aleatorio. Para garantizar la precisión de los resultados, se realizaron dos replicas. Entre los análisis sensoriales, el panelista se lavó la boca con agua mineral y una galleta para evitar análisis erróneos. El juez no fumó, comió ni bebió nada al menos una hora antes del análisis sensorial.

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA ETAPA II

3.4.1 Recuento de células viables

Para cada una de las cepas, se realizaron estudios con el método descrito por Tournas (Tournas et al. 2001): Conteo de células microbianas de levaduras en polvo liofilizado (UFC/g), se realizó de la siguiente manera: Se tomaron muestras de 0.100 gramos de los viales y se efectuaron diluciones hasta 1:10000000000 (10-10) para cada cepa, las cuales se sembraron por extensión en superficie utilizando un volumen de 0.15 ml en placas de Petri con agar extracto de malta (YM) (Amyl Media, Dande-nong, Australia). Los microorganismos se incubaron a 28 °C durante 48 horas para levaduras. Una vez crecidas las colonias, se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y se procedió a calcular su concentración sobre gramo evaluado (UFC/g).

3.4.2 Análisis de compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos del Pisco obtenido de las variedades de uva Italia y Negra Criolla fueron analizados por cromatografía de gases-espectrofotómetro de masas utilizando el procedimiento descrito por Cacho (Cacho et al. 2012), con algunas modificaciones. La extracción en fase sólida (SPE) se realizó en una estación VacMaster 10 (Biotage, USA) utilizando cartucho Supelclean Envi-Carb Spe Tube 200 mg (volumen total de 3 mL), el cual se lavó con diclorometano (4 mL), metanol grado HPLC (4 mL) y etanol 12 % v/v (4 mL) para acondicionar. El Pisco se diluyó con agua Milli-Q para obtener muestras que contenían etanol

12 % v/v y se añadió β -damasceno como patrón interno (200 mg/L). A continuación, la muestra anterior se pasó por el cartucho acondicionado y los compuestos retenidos se secaron al vacío (-0.6 bar durante 20 min) y se eluyeron con 1.6 mL de diclorometano. La muestra eluida se mezcló con los patrones internos 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona y 2-octanol disueltos en diclorometano (400 mg/L). Se inyectó un microlitro de muestra con split/splitless utilizando un automuestreador CTC en un cromatógrafo de gases Bruker 436GC acoplado a un Bruker EVOQ GC-TQ (MSD). La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C. El horno cromatográfico se mantuvo a 40 °C durante 5 min y luego se elevó a 136 °C a 4 °C/min y a 250 °C a 6 °C/min. El gas portador fue helio a un flujo constante de 1 mL/min. La columna capilar utilizada fue una Restek Rxi-5Sil MS: 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m de espesor de película. Los parámetros de la MS fueron línea de transferencia MS a 250 °C y temperatura de ionización de la cámara 200 °C con una energía de electrones de 70eV. Se registró un rango de 35-350 m/z en modo de barrido completo. Se prepararon curvas estándar de compuestos volátiles en diclorometano para llevar a cabo el análisis cuantitativo.

La curva de calibración se preparó mediante el análisis GC-MS de las soluciones de diclorometano que contenían cantidades conocidas de los estándares de aromas y de los patrones internos. Hay 19 compuestos que se emplearon para la cuantificación según la Tabla 5.

Tabla 5. Datos de la calibración de 19 compuestos, los cuales son analizados mediante una extracción en fase sólida seguida de una inyección en un cromatógrafo de gases acoplado MS.

Compuesto	RT (min)	Curva estándar			
		Pendiente	Intercepción	R ²	Rango de calibrado (mg.L ⁻¹)
Butanoato de etilo (Eb)**	6.467	0.2085	0.0045	0.974	0.02016 - 2.0160
Furfural (F)*	7.568	0.2470	-0.0091	0.990	0.02072 - 2.0720
3-hexen-1-ol (3-H-ol)**	8.568	0.8067	-0.0215	0.993	0.01680 - 1.6800
1-hexanol(-H)**	9.181	0.7547	-0.0221	0.944	0.02336 - 2.3360
Acetato de isoamilo (Ia)**	9.525	0.4895	0.0165	0.978	0.02112 - 2.1120
Etil hexanoato (Ehx)**	14.696	0.3516	0.0070	0.984	0.01640 - 1.6400
Limoneno (Li)*	15.834	0.1021	-0.0003	0.976	0.01472 - 1.4720
Alcohol de Bencilo (Ba)**	16.103	1.1590	-0.0845	0.996	0.02376 - 2.3760
Linalol (L)**	18.711	0.7808	-0.0140	0.969	0.01736 - 1.7360
Alcohol de feniletilo (Pa)***	19.095	1.9827	-0.1671	0.967	0.02680 - 2.6800
α -Terpineol (α -T)*	22.259	1.1396	-0.0359	0.965	0.02016 - 2.0160
Etil octanoato (Eo)**	22.372	0.3378	-0.0043	0.996	0.03264 - 3.2640
Nerol (N)*	23.382	1.3915	-0.0743	0.991	0.02320 - 2.3200
Citronelol (C)*	23.485	0.7730	-0.0257	0.976	0.02056 - 2.0560
Geraniol (G)**	24.303	1.7949	-0.0955	0.967	0.02040 - 2.0400
2-fenilacetato (2-Pa)*	24.361	2.6415	-0.3466	0.966	0.05472 - 5.4720
Etil pelargonato (Ep)*	25.860	0.3644	-0.0046	0.997	0.01800 - 1.8000
Etil decanoato (Ed)***	29.155	0.1048	-0.0015	0.994	0.01832 - 1.8320
Etil laurato (El)*	34.356	0.4836	-0.0284	0.955	0.01960 - 1.9600

Comprado en laboratorio *: Fluka; **: Sigma-Aldrich; ***: Merk Schuchardt

3.4.3 Análisis sensorial

Los análisis sensoriales se llevaron a cabo por un panel de 10 jueces expertos (4 mujeres y 6 hombres entre los 30 y 50 años de edad) de la Asociación Nacional de Catadores Oficiales-PISCO que juzgaron diferencia entre los Piscos elaborados a partir de uva variedad Italia y Negra Criolla. Este análisis se realizó en dos sesiones (Sesión 1: Pisco Uva Italia, Sesión 2: Pisco Uva Negra Criolla) y dos fases cada una.

Fase 1: Los Piscos inoculados con levaduras nativas (no *Saccharomyces*) y Pisco control (Sin inoculación) fueron tratadas utilizando un test Duo-trío (Iso 2004). Se entregó una muestra de referencia central (Pisco inoculado con levaduras nativas), y con otra muestra diferente en el otro lado (Pisco control). El catador debe identificar la muestra (copa izquierda o derecha) que es igual a la muestra de referencia central.

Fase 2: Este estudio se realizó siguiendo el método de Rabitti, *et al.*, 2022 (Rabitti et al. 2022). Se evaluaron 11 Piscos uva Italia y 11 Pisco uva Negra Criolla. En esta fase, los jueces expertos definieron los atributos sensoriales del Pisco; los atributos identificados en la investigación realizada por Cacho *et al.* (2012^a, 2013), sumado a ello descriptores que consideraron en su experiencia. Identificando 10 descriptores de aroma como los más apropiados para describir a los Piscos variedad Italia y Negra Criolla. Este grupo de descriptores incluía: Fruta (Fr), cítrico (Ci), anisado (An), floral (Fl), hierba (He), especias (Sp), aceitoso (Oi), mantequilla (Bu), almíbar (Sy), alcohol (Al), aceituna (Oi), frutos secos (Nu), verdura cocida (Cv). Posteriormente, se les pidió que seleccionaran de una lista de descriptores todas las sensaciones que describían las muestras y evaluaran su intensidad. El juez experto recibió 25 ml de Pisco en copas AFNOR, las cuales fueron codificadas con números de 3 dígitos y cubiertas con una placa de Petri para evitar la pérdida de componentes volátiles. Se les entregó una ficha de cata con la lista de los descriptores para que evaluarán su intensidad en una escala de 5 puntos (izquierda, “Bajo”; medio, “Medio”; derecha, “Alto”). Evaluaron las muestras bajo luz blanca y se les proporcionó agua mineral y galletas sin sal para limpiarse la boca entre degustaciones. Los Piscos se servían a temperatura ambiente, que se fijaba a 22 °C. Cada muestra se evaluó por duplicado en las mismas condiciones experimentales. Las órdenes de presentación se variaron sistemáticamente entre los jueces. Se pidió a los jueces que no fumaran, comieran ni bebieran nada, excepto agua, al menos una hora antes de las sesiones de cata.

3.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE LA ETAPA I

Primeramente, se realizó la identificación de levaduras nativas presentes en la piel de la uva (Figura 3). Posteriormente, la elaboración del Pisco variedad Italia y variedad de uva Negra Criolla fueron despalladas y estrujadas a mano y el mosto obtenido se maceró durante 24 h. A continuación, se eliminaron los orujos de uva y el mosto se colocó en recipientes de vidrio y se

realizó la fermentación a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 días. El mosto se destiló en un alambique de cobre de 20 L de capacidad, el corte de cabeza se hizo al 0.8 % del volumen total del mosto y para el corte de Pisco se utilizó 42 % de grado alcohólico (Figura 4). El destilado obtenido se transfirió a un recipiente de vidrio para su posterior análisis de compuestos aromáticos y análisis sensorial (Figura 5).

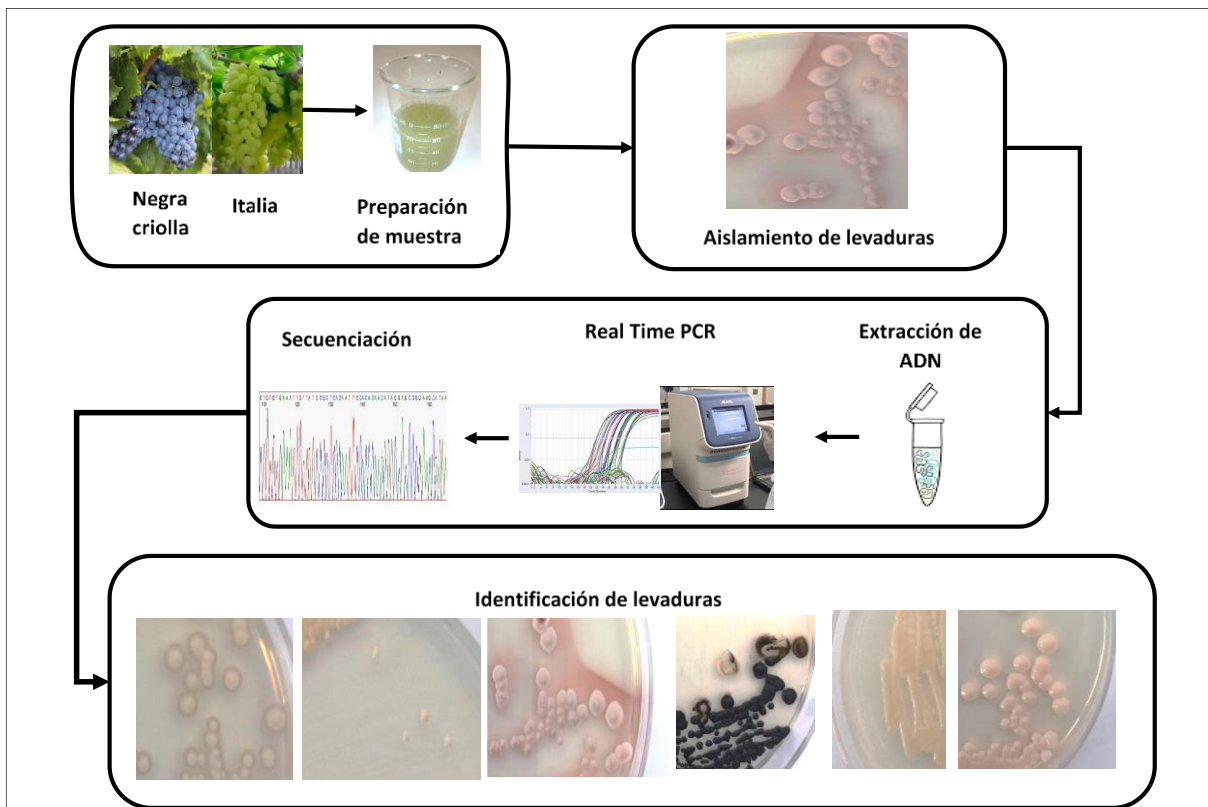


Figura 3. Esquema experimental de la etapa I – Identificación de levaduras

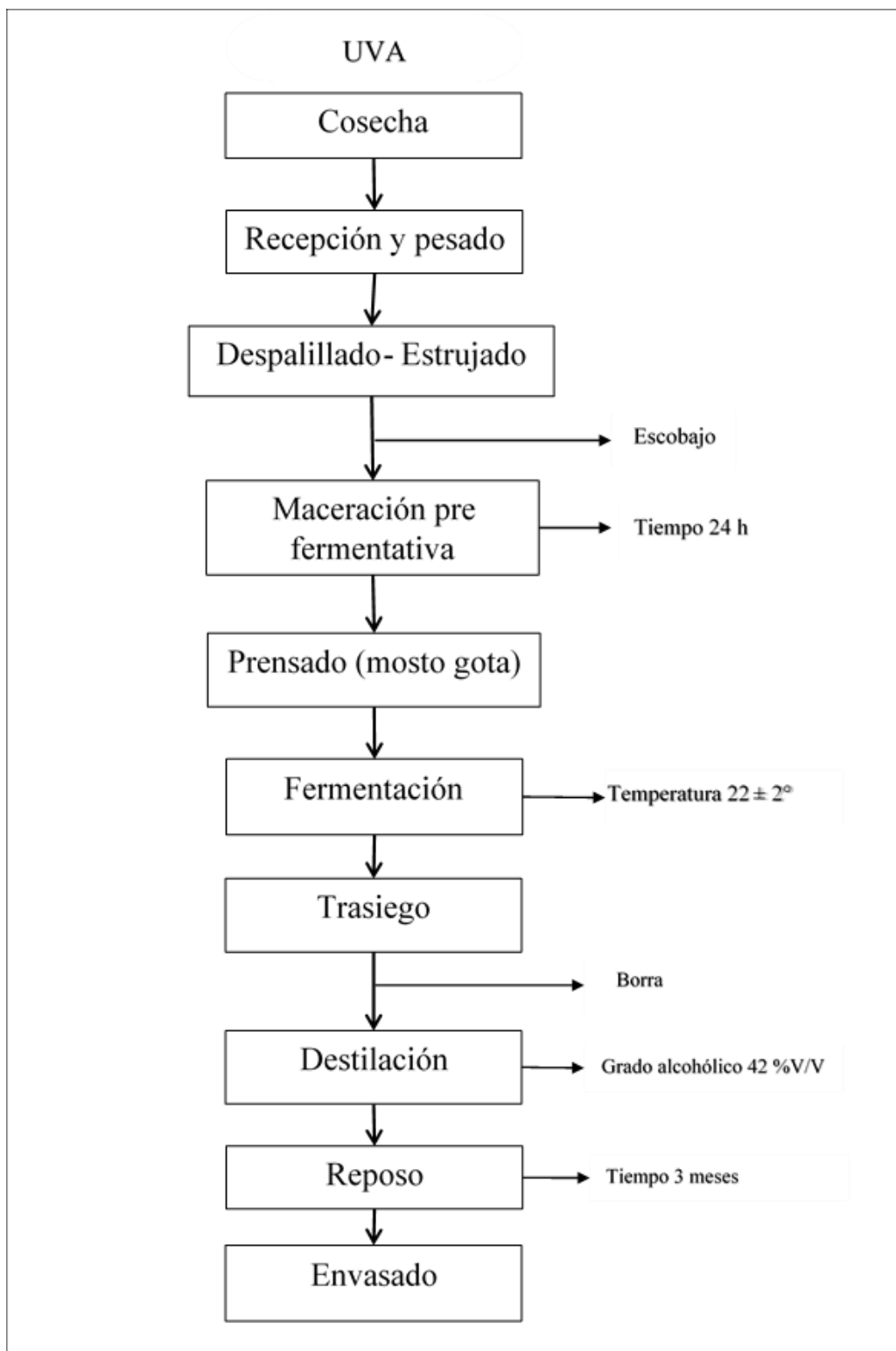


Figura 4. Flujo de operaciones de la etapa I – Elaboración del Pisco

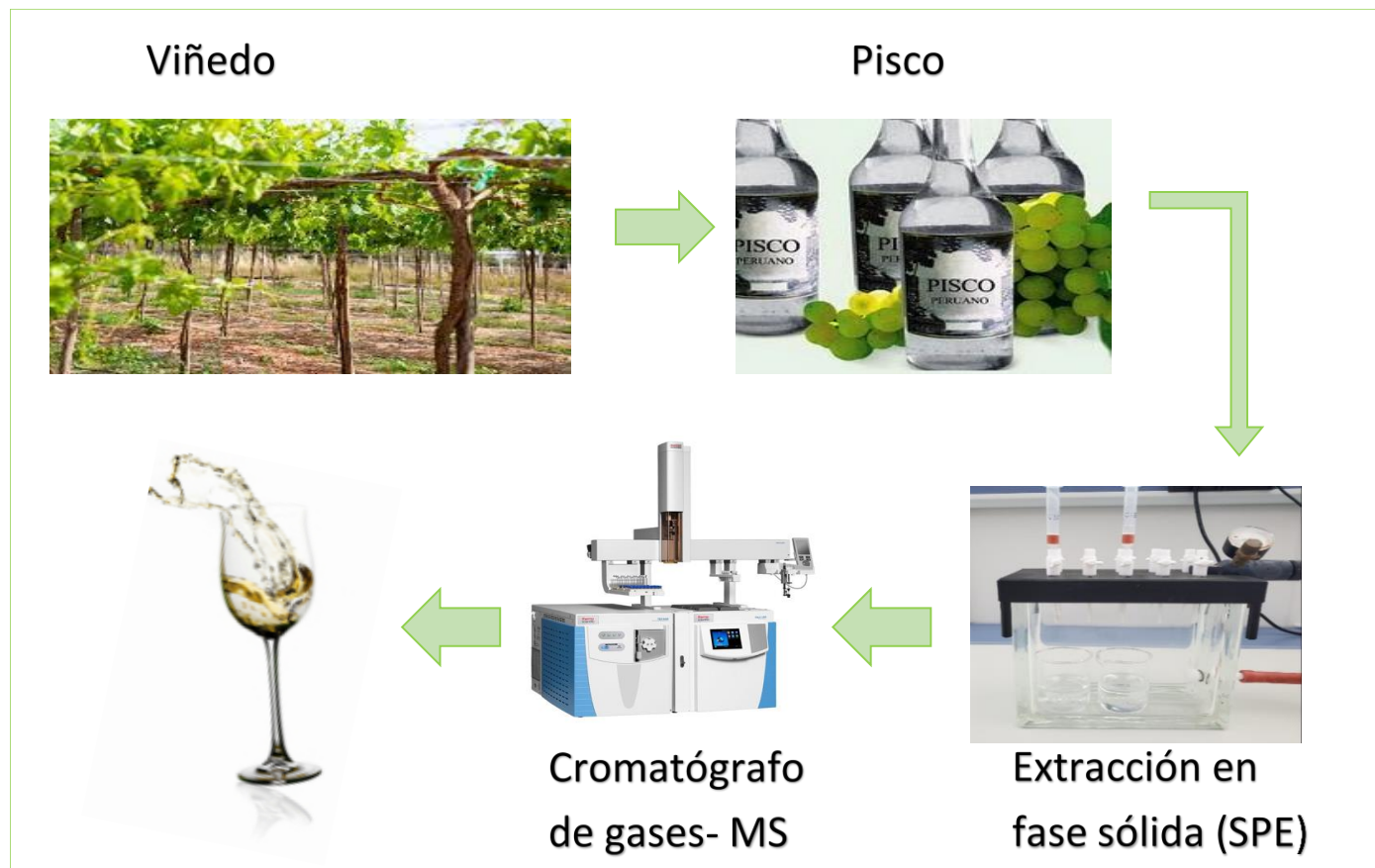


Figura 5.

Esquema experimental de la ETAPA I – Determinación de Compuestos Volátiles

3.6 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE LA ETAPA II

a. Estrategia de inoculación de levaduras

Se utilizaron uvas cultivadas por la empresa Agroindustrial “Antonio Biondi e Hijos S.A.C.”, procedentes del valle de Moquegua (Área dentro de la Denominación de Origen), Perú. Durante la cosecha 2022. Se recolectaron 300 kg. de uva de la Variedad Italia y 300 kg. de variedad Negra Criolla. Todas las muestras se transfirieron asépticamente a recipiente de plástico 25 kg. Solo se recolectaron uvas sanas y sin daños de los viñedos y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Las uvas cosechadas tuvieron las siguientes características: Contenido de azúcar $22,5 \pm 0,10\text{ }^{\circ}\text{Brix}$; acidez total: 6.15 ± 0.11 ; pH 3.4 ± 0.01 .

Para desarrollar mezclas de cepas de levaduras liofilizadas de ambas variedades, se implementó un diseño de mezcla simplex-centroide con tres componentes (tabla 6, tabla 7), Este es un método eficaz para comprender los componentes del producto y sus interacciones (Dooley et al. 2012). El porcentaje combinado de cada cepa en cada mezcla totaliza el 100 %. Se formularon diez tratamientos. El centroide simplex permite una distribución uniforme de las mezclas en toda la parcela, lo que da como resultado Piscos individuales (3), mezclas binarias (3) y mezclas terciarias (4). Se seleccionó este tipo de diseño de mezcla debido a la igualdad de espacio entre las ubicaciones de los productos en la parcela ternaria y el número total de mezclas producidas. Las 10 muestras fueron suficientes para obtener una comprensión analítica y del catador adecuadamente y fueron rentables desde el punto de vista de las pruebas sensoriales. Además, se adicionó un tratamiento número once en el cual no se inoculo ninguna cepa de levadura.

Tabla 6. Diseño de mezclas centroide simplex para formulaciones con cepas de levaduras de la variedad Italia.

Tratamiento	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (M)	<i>Pichia terrícola</i> (P)	<i>Naganishia vaughanmartinae</i> (N)
I0M100P0N	0	2.4	0
I0M50P50N	0	1.2	1.2
I33M33P33N	0.8	0.8	0.8
I100M0P0N	2.4	0	0
I16M66P16N	0.4	1.6	0.4
I50M50P0N	1.2	1.2	0
I50M0P50N	1.2	0	1.2
I66M16P16N	1.6	0.4	0.4
I0M0P100N	0	0	2.4
I16M16P66N	0.4	0.4	1.6
I0M0P0N	0	0	0

Tabla 7. Diseño de mezclas centroide simplex para formulaciones con cepas de levaduras de la variedad Negra Criolla.

Tratamiento	<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i> (V)	<i>Vishniacozyma carnescens</i> (C)	<i>Aureobasidium pullulans</i> (A)
N0V100C0A	0	2.4	0
N0V50C50A	0	1.2	1.2
N33V33C33A	0.8	0.8	0.8
N100V0C0A	2.4	0	0
N16V66C16A	0.4	1.6	0.4
N50V50C0A	1.2	1.2	0
N50V0C50A	1.2	0	1.2
N66V16C16A	1.6	0.4	0.4
N0V0C100A	0	0	2.4
N16V16C66A	0.4	0.4	1.6
N0V0C0A	0	0	0

b. Elaboración del vino base y elaboración del Pisco

Las micro vinificaciones se llevaron a cabo en mostos frescos sin adición de SO₂, obtenido de un despalillado y estrujado a mano. Las uvas se maceraron durante 24 h, luego se retiró el hollejo y el mosto se vertió en envases de vidrio de 4 L hasta los ¾ de su capacidad. Después de 24 h se inocularon las levaduras liofilizadas P, M y N aisladas de la uva Italia y levaduras liofilizadas C, V y A aisladas de la uva Negra Criolla, de acuerdo al diseño planteado en la Tabla 1a y Tabla 1b. Se resuspendieron 30 g/hl de levaduras liofilizadas, que contenían aproximadamente 10¹⁰ células viables/g, en 300 ml de agua químicamente pura a 35° C durante 20 min (Bovo et al. 2014). Continuando con la parte experimental, la fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 22 ± 2°C. Sin embargo, para comprobar y corroborar que se implantaron las levaduras inoculadas se tomaron muestras de mosto en 3 puntos durante la vinificación: después de 24 h del inoculado de levaduras (Mosto I), al día 6 de la fermentación (Mosto II) y al día 12 de la fermentación (Mosto III). Las muestras se tomaron en tubos estériles de cada uno de los tratamientos, posteriormente se conservó bajo refrigeración hasta su análisis. Las muestras se diluyeron en serie con agua de peptona estéril; para el recuento de levaduras, se esparcieron 0.1 ml de cada dilución por triplicado sobre el medio de cultivo GPYA (glucosa, peptona, extracto de levadura). Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas para el desarrollo de colonias (Oliva et al. 2020). Una vez finalizada la fermentación alcohólica después de 13 días, los mostos recién fermentados, se destilaron en un alambique de cobre de capacidad de 20 litros, se hizo corte de “cabeza” en base al 0.80 % del volumen total del mosto fermentado y para el corte de “cola” se consideró como grado final del cuerpo 42 % (v/v). El grado alcohólico se determinó a 20°C mediante escala hidrostática utilizando 100 ml del destilado. Al finalizar esta etapa cada tratamiento (Pisco) se vertió en envases de vidrio para su posterior caracterización de compuestos volátiles (Figura 6 y Figura 7).

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En la primera etapa se aplicó Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey con el software Prism GraphPad versión 6.1 (GraphPad software Inc., EE.UU.), a 5% de significancia. Un Análisis de Componentes Principales (ACP) se aplicó a los compuestos volátiles y perfil sensorial usando el software Minitab 17 (Minitab Inc., EE.UU.). En la segunda etapa, estos análisis se realizaron utilizando el software R (R Core Team).

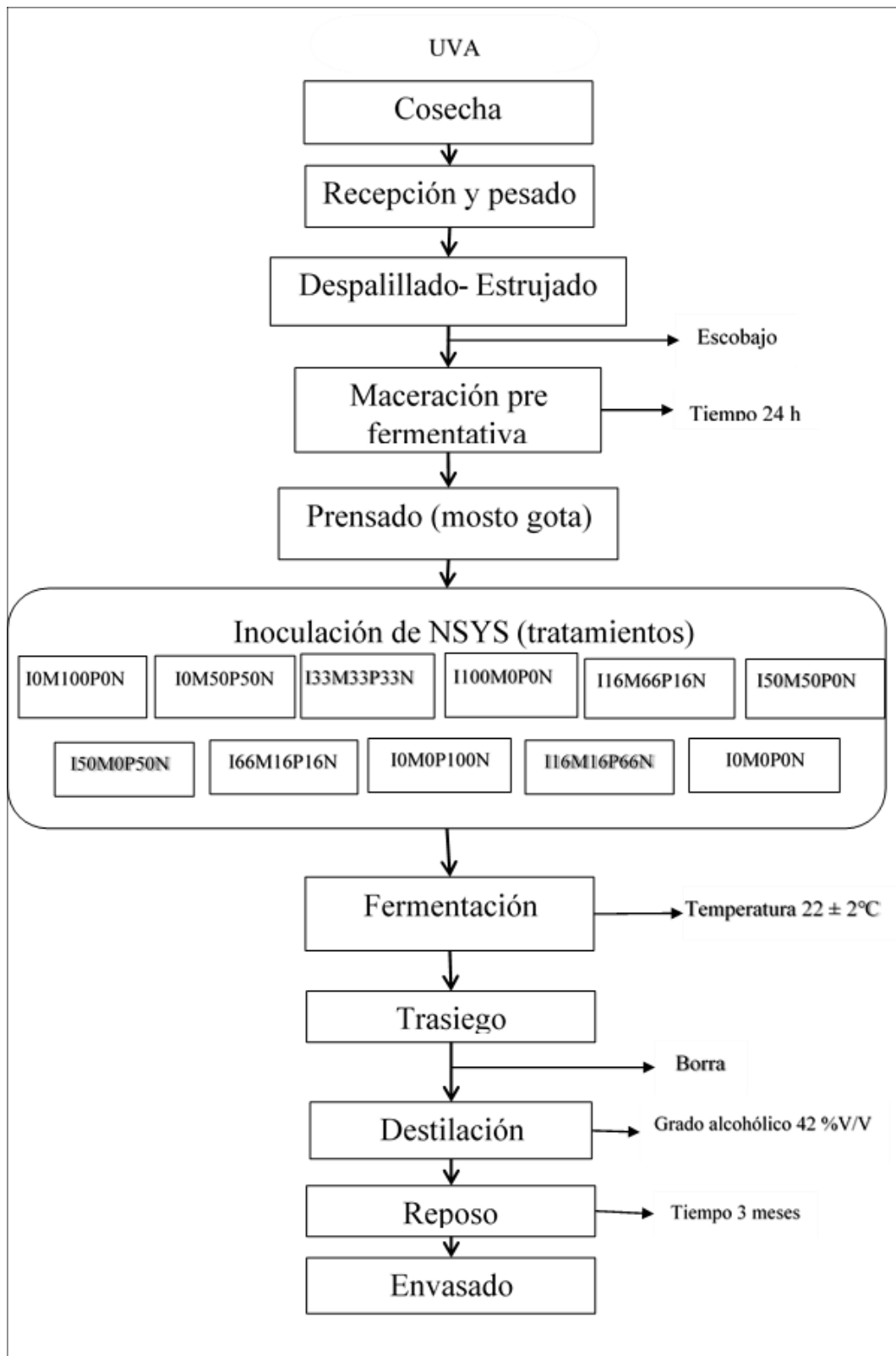


Figura 6. Diagrama de elaboración del Pisco variedad Italia con estrategias de inoculación de levaduras en la etapa de fermentación, etapa II.

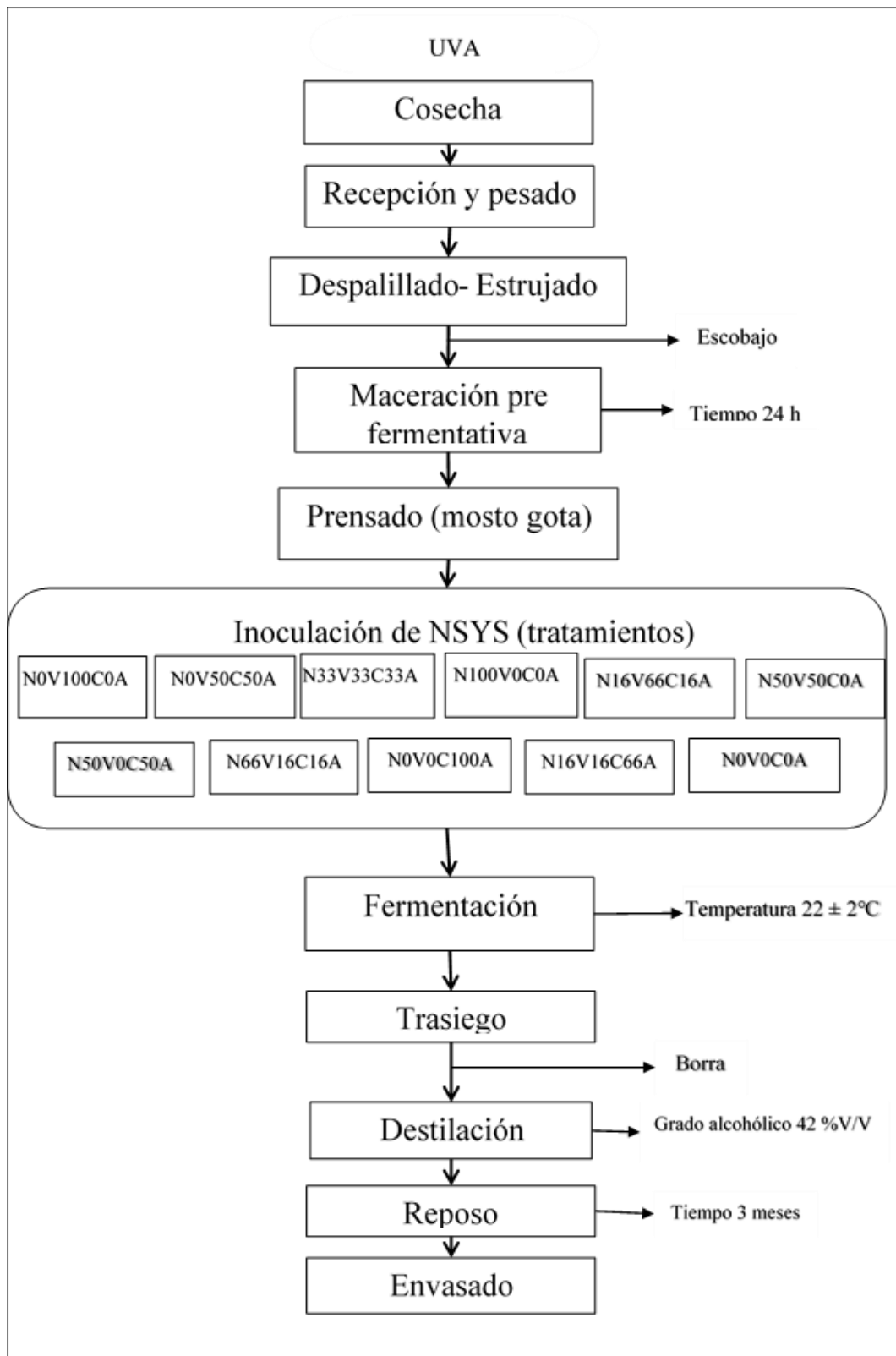


Figura 7. Diagrama de elaboración del Pisco variedad Negra Criolla con estrategias de inoculación de levaduras en la etapa de fermentación, etapa II.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS APARTIR DEL HOLLEJO DE UVAS ITALIA Y NEGRA CRIOLLA

Se utilizaron los medios SCD y DRBC para aislar las levaduras de la superficie de las variedades de uva Italia y Negra Criolla recolectadas en Moquegua, una región ubicada en el sur del Perú, basándose en el color y las características morfológicas. La identificación anterior fue confirmada por procedimientos moleculares. La abundancia y el tipo de levadura aislada dependieron de las variedades de uva, encontrándose diferentes NSYS en las variedades de uva Italia y Negra Criolla. *Pichia terrícola* (56%), *Metschnikowia pulcherrima* (31%) y *Naganishia vaughanmartinae* (13%) con un porcentaje de identificación del 100% fueron aisladas e identificadas en la uva Italia (Tabla 8 y Figura 8A). De la uva Negra Criolla, variedad típica de la región de Moquegua, se aislaron e identificaron tres NSYS *Vishniacozyma carnescens* (50 %), *Vishniacozyma heimaeyensis* (30 %) y *Aureobasidium pullulans* (20 %) con un Per Ident de 99,81, 98,48 y 99,49 %, respectivamente (Tabla 8 y Figura 8A).

Tabla 8. Identificación molecular de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de las variedades de uva Italia y Negra criolla.

Muestra	Amplificación			Purificación			Secuenciación				
	Concentración DNA (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Concentración DNA (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Cepas de levaduras	Producto amplificado	E- Valué	Identific ado (%)	Acceso
I	1484.3	2.17	2.30	458.8	2.06	1.02	<i>Pichia terricola</i>	778	0	100	NR_153294.1
I	1139.0	1.92	1.44	479.0	2.03	1.03	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	697	0	100	MN915122.1
I	107.3	1.91	1.01	464.4	2.06	1.00	<i>Naganishia vaughanmartiniae</i>	932	0	100	HM589363.1
NC	172	1.78	1.72	479.4	2.02	1.00	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	965	0	99.81	OU989508.1
NC	330.7	2.04	1.47	386.6	2.05	0.98	<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i>	928	0	98.48	JQ768937.1
NC	78.9	2.02	1.11	461.9	2.04	1.01	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1061	0	99.49	MN752213.1

I: Uva variedad Italia, NC: Uva variedad Negra criolla

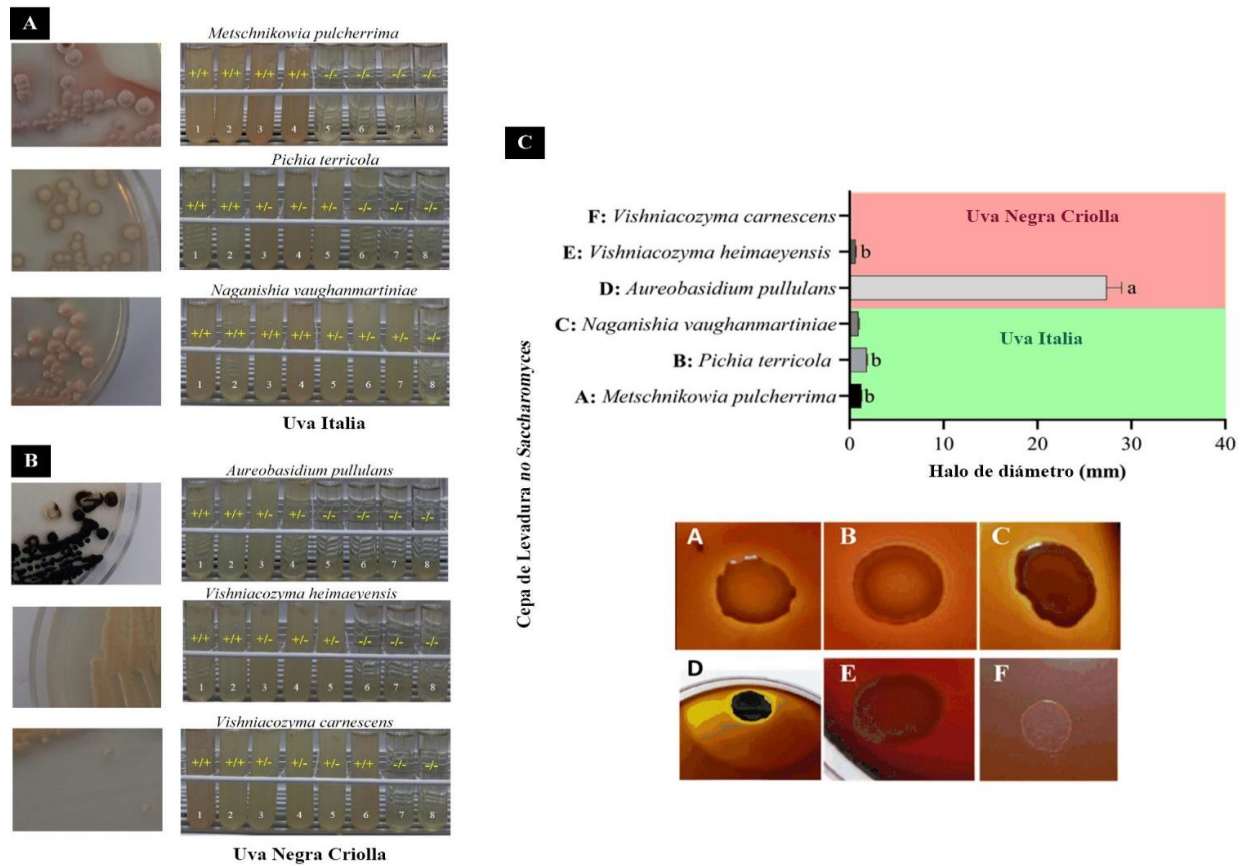


Figura 8. Fermentación de carbohidratos (A, B) y actividad poligalacturonasa (B) de cepas aisladas de levaduras no-Saccharomyces procedentes de uvas Italia (*Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia terricola* y *Naganishia vaughanmartinae*) y Negra criolla (*Aureobasidium pullulans*, *Vishniacozyma heimaeyensis* y *Vishniacozyma carnescens*) de la región de Moquegua. +/+ = cambios de color del indicador de bromocresol/producción de gas, +/- = cambios de color del indicador de bromocresol/no producción de gas y -/- = sin cambios de color del indicador de bromocresol/no producción de gas. 1: fructosa, 2: melibiosa, 3: sacarosa, 4: glucosa, 5: maltosa, 6: manosa, 7: rafinosa y 8: lactosa.

A pesar de que las NSYS están generalmente presentes al inicio de la fermentación del vino, contribuyen al aroma del vino a través de la biosíntesis directa de compuestos aromáticos volátiles, incluyendo terpenos, ésteres, acetaldehído, entre otros, o liberan compuestos volátiles a partir de precursores glucosídicos (Capozzi et al. 2015). Así, se ha producido vino con diferentes características aromáticas mediante la inoculación simultánea o secuencial de NSYS aisladas de uva de diferentes regiones (Binati et al. 2020). Las NSYS aisladas de la piel de la uva están implicadas en el perfil aromático de los vinos e incluyen *Torulasporea delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, *Lachancea thermotolerans*, y *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida railenensis*, *Hanseniasporas* genus, *Debaryomyces hansenii*, entre otras (Delač Salopek et al. 2022, Hu et al. 2020, González-Alonso et al. 2021, Ge et al. 2022, Hu et al. 2018). Algunas actividades enzimáticas encontradas en las NSYS como β -glucosidasa, β -xilosidasa, actividades proteolíticas y xilanolíticas se han asociado a la composición aromática de los vinos (Maturano et al. 2015, Hong et al. 2019).

En general, la microbiota de la piel de la uva depende de las variedades de uva, la región geográfica, el clima, el emplazamiento del viñedo y la topografía, lo que explica la presencia de NSYS en las variedades Italia y Negra Criolla (Lappa et al. 2020, Chen et al. 2022, González-Alonso et al. 2021). En el presente estudio se aisló NSYS *Metschnikowia pulcherrima* a partir de hollejos de uva Italia cosechados en la Región de Moquegua (Tabla 8 y Figura 8A). *Metschnikowia pulcherrima* como agente de biocontrol y potenciador del aroma del vino (butirato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de isoamilo y β -fenil etanol) en combinación con *S. cerevisiae* produciendo vino con contenido de SO₂ (Canónico et al. 2023). *Metschnikowia spp* se ha asociado a la formación de terpenos, tioles volátiles, alcoholes superiores y ésteres, y a la reducción de fenoles volátiles (Binati et al. 2020, Casas-Godoy et al. 2021). Además, el género *Pichia* coinoculado con *S. cerevisiae* permitió mejorar el atributo aromático de los vinos (Scansani et al. 2022) y *P. terrícola*, anteriormente *Issatchenkia terrícola* aumentó el contenido de volátiles en el vino Cabernet Sauvignon, lo que se ha asociado a la actividad β -glucosidasa (Zhang et al. 2021, Bezus et al. 2023). Por otro lado, el género *Naganishia* aparece como el género de levaduras más extendido dentro del microbioma del núcleo de los suelos de viñedo en todo el mundo (Vicente et al. 2023, Ramírez et al. 2020) al encontrarse por primera vez en los hollejos de uva Negra Criolla (Tabla 8 y Figura 8B). El género *Naganishia* mostró actividad

β -glucosidasa (Bezus et al. 2023) y, por lo tanto, podría desempeñar un papel en los compuestos volátiles de los vinos. En relación con la uva Negra Criolla, se encontró que el género *Vishniacozyma* era la cepa de levadura predominante (80%), similar a lo reportado previamente en otras variedades de uva durante los procesos de fermentación del vino de hielo, representando alrededor del 69,13% (Chen et al. 2020). El género *Vishniacozyma* fue la levadura más abundante en bayas de uva de las variedades Vidal (Shi et al. 2020). Por otro lado, *Vishniacozyma victoriae* es de gran interés ya que muestra actividad de control biológico contra algunos patógenos de la uva de mesa (Perpetuini et al. 2022). Sin embargo, el mecanismo que confiere resistencia al frío en el género *Vishniacozyma*, así como los efectos sobre el sabor del vino de hielo, merecen ser investigados (Chen et al. 2020). *Aureobasidium pullulans* también se aisló de uvas Negra Criolla y mostró una actividad pectinasa muy elevada (Figura 8B). *A. pullulans* es una cepa de levadura bien reconocida con alta actividad pectinasa aislada de uva Bonarda argentina y de la viticultura de la región de Mendoza (Merín et al. 2015, Merín y Morata De Ambrosini 2018). Los compuestos orgánicos volátiles producidos por *A. pullulans* inducen pérdida de electrolitos y estrés oxidativo en *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* (Yalage Don et al. 2021). Finalmente, en el presente estudio no se aisló *Saccharomyces cerevisiae* en el viñedo joven de Moquegua, lo que está asociado a la edad del viñedo. Así mismo, no se identificó *S. cerevisiae* en la corteza ni en la superficie de la uva del viñedo más joven, lo que pone de manifiesto la importancia de la edad de la vid en la colonización por levaduras (Nadai et al. 2019).

4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE NSYS AISLADOS DE ITALIA Y DE LAS VARIEDADES DE UVA NEGRA CRIOLLA

4.2.1 FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Todas las NSYS aisladas de uvas Italia fueron capaces de metabolizar fructosa y mellibiosa reduciendo el pH con producción de gas (Figura 8A). *M. pulcherrima* y *N. vaughanmartinae* metabolizaron sacarosa y glucosa, lo que se refleja en cambios de pH y producción de gas, mientras que *P. terricola* sólo produjo disminución del pH (Figura 8A). Las levaduras se clasifican fisiológicamente con respecto al tipo de proceso generador de energía implicado en el metabolismo de los azúcares, es decir, levaduras no fermentativas, facultativas u obligado. Las primeras levaduras presentan exclusivamente un metabolismo respiratorio y no son capaces

de realizar fermentaciones alcohólicas a partir de la glucosa (Rodrigues et al. 2006). El metabolismo del azúcar de la *M. pulcherrima* ha sido caracterizado como una cepa que realiza una vía metabólica respiratoria y rendimientos fermentativos más lentos; por lo tanto, puede ser utilizada para reducir la concentración final de etanol de los vinos (Aplin et al. 2019, Castrillo y Blanco 2023, Paup et al. 2022). La vía metabólica respiratoria incluye el ácido tricarbóxico (TCA), que es capaz de producir diferentes ácidos, que a su vez reducen el pH (Yin et al. 2015) como se muestra en el presente estudio. *P. terrícola*, anteriormente *Issatchenkia terrícola* (Barata et al. 2012, Bezus et al. 2023) encontrada en uva, ha sido identificada como NSYS que produce β -glucosidasa tolerante a glucosa y etanol y con potencial de liberar rápidamente compuestos aromático tanto en el vino blanco como tinto en muy poco tiempo (De Ovalle et al. 2018, James et al. 2023). De forma similar a *M. pulcherrima*, *P. terrícola* metabolizó glucosa y fructosa por TCA, reflejado por la acidificación del medio (Figura 8A) pero sin producción de gas. Además, *P. terrícola* y *N. vaughanmartinae* también fueron capaces de producir cambios de pH en presencia de maltosa (Fig. 8A).

Curiosamente, *N. vaughanmartinae* cambió el pH cuando se añadieron manosa y rafinosa al medio de cultivo (Figura 8A) aunque esta cepa de levadura ha sido aislada de hojas de plantas y del suelo y su contribución enológica no ha sido caracterizada (Li et al. 2020). Cuando NSYS metabolizó la lactosa, no se observaron cambios en el pH ni producción de gas (Figura 8A).

Todas las NSYS aisladas de uva Negra Criolla fueron capaces de metabolizar fructosa y melibiosa, lo que se reflejó en disminuciones de pH a nivel ácido y producción de gas (Figura 8B). *Aureobasidium pullulans* es un hongo dimórfico ascomiceto, también llamado levadura negra, una especie común similar a la levadura, que ha sido aislado de diferentes cultivares de uva con daños físicos (Barata et al. 2012) y puede ser utilizado como agente de biocontrol eficaz en la agricultura contra varios de los principales patógenos postcosecha (Onetto et al. 2020). Sin embargo, *A. pullulans* ha sido reconocido como el principal residente de la piel de la uva que en co-cultivo con *S. cerevisiae* puede acelerar la fermentación alcohólica (Watanabe y Hashimoto 2021). Una explicación aceptable es la actividad poligalacturonasa encontrada en *A. pullulans* (Belda et al. 2016), que podría aumentar la disponibilidad de carbono a partir de materiales de la piel de la uva como la pared celular y las cutículas (Watanabe y Hashimoto 2021) mejorar el color, reducir el tiempo de filtración y la turbidez (Merín y Morata De Ambrosini 2018). En el

presente estudio, la actividad enzimática de *A. pullulans* fue muy superior a la encontrada en todas las NSYS aislados de las variedades de uva Italia y Negra Criolla, incluyendo *M. pulcherrima* (Figura 8C). Además, *A. pullulans* es capaz de hidrolizar glucósidos de uva mostrando actividades β -D-glucosidasa, α -L-arabinofuranosidasa y α -L-ramnosidasa (Padilla et al. 2016, Graf et al. 2022). Por otro lado, *Vishniacozyma carnescens* es una levadura silvestre asociada a la uva como prometedor agente de biocontrol contra hongos patógenos de la uva (Cordero-Bueso et al. 2017). Se ha encontrado *V. carnescens* en bayas de uva marchitas y sanas de las variedades Nosiola, Corvina y Garganega (Lorenzini y Zapparoli 2019) y en bayas de Cabernet Sauvignon (Wang et al. 2021). Sin embargo, no se ha informado de la relevancia tecnológica de *V. carnescens* para la elaboración del vino, por lo que merece una mayor investigación, teniendo en cuenta que representa alrededor del 50% de los NSYS aislados de las variedades de uva Italia y Negra Criolla. Del mismo modo, se ha encontrado *Vishniacozyma heimaeyensis* en la microbiota de las bayas de uva cv. Vinhão y Loureiro, aunque no se ha informado de su relevancia tecnológica (Martins et al. 2022). Además, *A. pullulans*, *V. carnescens* y *V. heimaeyensis* también fueron capaces de metabolizar sacarosa y glucosa reduciendo el pH pero no se detectó producción de gas (Figura 8B). *Vishniacozyma heimaeyensis* y *Vishniacozyma carnenses* fueron capaces de metabolizar maltosa reduciendo el pH pero sin producción de gas (Figura 8B). Las NSYS tardías metabolizaron la manosa produciendo una disminución del pH y gas (Figura 8B). Ninguno de NSYS metabolizó rafinosa y lactosa (Figura 8A).

4.2.2 ACTIVIDAD POLIGALACTURONASA

A. pullulans aislada de las variedades de uva Negra Criolla mostró una actividad poligalacturonasa (PGA) muy superior a la de otras NSYS aisladas de uvas de Moquegua, incluso *M. pulcherrima*, cuya PGA fue similar (Figura. 8C). En otro estudio, *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Metschnikowia fructicola* habían mostrado actividad poligalacturonasa, que puede influir en la filtrabilidad, la turbidez y el aumento del color, la antocianina y el contenido en polifenoles de los vinos fermentados en combinación con *S. cerevisiae* (Belda et al. 2016). En particular, *A. pullulans* ha demostrado durante la maceración prefermentativa en frío su influencia en la calidad del vino tinto, mejorando el color y la producción de compuestos volátiles deseables, como ésteres y norisoprenoides, además de la

filtración y la mejora del color, que se han asociado a las enzimas pectinolíticas (Merín et al. 2015, Merín y Morata De Ambrosini 2018, Paup et al. 2022, Merín et al. 2011).

4.2.3 TOLERANCIA AL ETANOL

Todas las NSYS aisladas de las uvas Italia y Negra Criolla mostraron un crecimiento medio y bajo a 8-12% v/v de etanol (Tabla 9). La tolerancia al etanol de *M. pulcherrima* depende de las cepas y ha oscilado entre 6-12% v/v (Barbosa et al. 2018). En el presente estudio, *M. pulcherrima* mostró un crecimiento medio a 16 % v/v de etanol. En concordancia con el crecimiento reportado para *Pichia kudriavzevii*, que fue capaz de crecer a concentraciones de etanol superiores al 16% v/v (Nieto-Sarabia et al. 2022), *P. terrícola* aislado de uvas de Italia mostró un crecimiento lento a la misma concentración de etanol. *A. pullulans* fue capaz de crecer, al menos a un ritmo lento, en un medio que contenía hasta un 12% v/v de etanol, lo que concuerda con el hecho de que la mayoría de los aislados de *A. pullulans* podían tolerar hasta un 10% de etanol antes de una marcada disminución de la viabilidad (Lin et al. 2020). Del mismo modo, *N. vaughanmartiniae*, *V. heimaeyensis* y *V. carnescens* sólo mostraron crecimiento a 8 y 10% v/v de etanol (Tabla 9). Las NSYS suelen presentar bajos rendimientos fermentativos a lo largo de toda la fermentación debido a su escasa tolerancia al etanol (Binati et al. 2020, Suárez-Lepe y Morata 2012). En otro estudio se ha demostrado que NSYS como *R. mucilaginosa*, *D. pseudopolymorphus* y *Brettanomyces spp* también mostraron una moderada capacidad de tolerancia al etanol en un ambiente con 14-15 % v/v de etanol manteniendo el 40-60% de la actividad máxima (Zhang et al. 2021). Los diferentes niveles de tolerancia al etanol entre las levaduras se correlacionan con la composición de su membrana lipídica, que define su respuesta a la acción disruptiva del etanol (Pina et al. 2004).

4.2.4 PRODUCCIÓN DE SULFITO

En general, se reconoce que las cepas de levadura son capaces de producir sulfitos (SO_3^{2-}) a partir del sulfato (SO_4^{2-}) del zumo, el cual es importado a la cepa de levadura a través de una serie de pasos enzimáticos (Dahabieh et al. 2015, Donalies y Stahl 2002). Las NSYS aisladas de Italia y de uvas Negra Criolla producen sulfitos muy elevados que oscilan entre 45,3-66,0 mg/l (Tabla 9), lo que no se había informado anteriormente. Las cepas de levadura de vinificación aisladas de uva blanca aromática producen alrededor de 20 mg/L de sulfito

(Dahabieh et al. 2015). En caldo YPG, *P. terricola*, *A. pullulans*, *V. heimaeyensis* y *V. carnescens* mostraron una mayor producción de sulfito en comparación con *M. pulcherrima* y *N. vaughanmartiniae* (Tabla 9). Sin embargo, todas las NSYS mostraron el mismo nivel de producción de sulfitos cuando se utilizó mosto de uva (Italia o Negra Criolla) como medio (Tabla 9). En la práctica, los enólogos informan frecuentemente de un aumento del afrutado en los vinos tintos fermentados sin sulfitos con el uso de NSYS como bioprotector y potenciador del perfil aromático de los vinos (Windholtz et al. 2021). Cepas seleccionadas de *M. pulcherrima* desempeñan un doble papel como actividad de biocontrol y potenciador del perfil aromático del vino (Canónico et al. 2023). Un mecanismo de biocontrol valorable podría estar relacionado con la producción de sulfito descrita en el presente estudio.

4.2.5 CONSUMO DE NITRÓGENO

Las NSYS aisladas no mostraron diferencias en el consumo de nitrógeno, que osciló entre el 90,8 y el 95,8 % (Tabla 9) a 28 °C. Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de consumir alrededor del 66% del nitrógeno asimilable expresado como amonio a 25 °C de fermentación (Beltran et al. 2007). Está bien establecido que la capacidad de las cepas de *S. cerevisiae* para consumir rápidamente las fuentes de nitrógeno y carbono disponibles en el zumo de uva, junto con la alta tolerancia al etanol, les confiere una ventaja adaptativa clave sobre otras levaduras, incluidas las NSYS (Comitini et al. 2021). Durante la fermentación del vino, NSYS como *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* y *Metschnikowia fructicola* consumieron diferentes fuentes de nitrógeno en un orden similar al de *S. cerevisiae*, pero no tan rápidamente debido a su tolerancia al etanol (Comitini et al. 2021), lo que podría influir en el consumo de nitrógeno hallado en el presente estudio. Las NSYS consumieron preferentemente algunas fuentes de nitrógeno como la alanina, el amonio, el ácido aspártico y entre otras (Comitini et al. 2021, Gobert et al. 2017, 2019) o la prolina, que es una fuente de nitrógeno no asimilable para *S. cerevisiae* en condiciones anaerobias que favorecen el crecimiento y la fermentación de *S. cerevisiae* (Englezos et al. 2022). La absorción diferencial de nitrógeno tiene un impacto en la velocidad de fermentación y en la producción de compuestos volátiles en el caso de las NSYS, por lo que afecta al proceso de eficiencia y a la calidad del vino (Beltran et al. 2007, Gobert et al. 2017).

Tabla 9. Tolerancia al etanol, producción de sulfito y consumo de nitrógeno de levaduras no-*saccharomyces* aisladas de las variedades de uva Italia y Negra criolla.

Levadura aislada no- <i>Saccharomyces</i>	Tolerancia al etanol ¹			Producción de sulfito (mg/L)		Consumo de nitrógeno (%)
	8 % v/v	12% v/v	16% v/v	Caldo YPG	Mosto uva	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	++	++	++	45.3±5.2 ^b	62.6±8.1 ^a	93.3±4.7 ^a
<i>Pichia terrícola</i>	++	++	+	51.5±3.4 ^a	59.4±5.4 ^a	95.8±4.8 ^a
<i>Naganishia vaughanmartiniae</i>	+	+	-	49.1±5.1 ^b	60.5±6.7 ^a	90.8±4.8 ^a
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	-	66.0±5.8 ^a	57.7±6.2 ^a	99.3±5.0 ^a
<i>Vishniacozyma heimaeyensis</i>	+	+	+	58.1±6.4 ^a	63.2±8.7 ^a	94.8±4.9 ^a
<i>Vishniacozyma carnescens</i>	+	+	-	62.8±7.8 ^a	60.8±7.5 ^a	94.8±4.9 ^a

¹ Crecimiento de la cepa en medio con etanol (+++: crecimiento alto; ++: crecimiento medio; +: crecimiento bajo, -: sin crecimiento). Una letra superior diferente en cada columna significa una diferencia estadística mediante la prueba de Tukey (p < 0,05).

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL PISCO OBTENIDO DE LAS VARIEDADES ITALIA Y NEGRA CRIOLLA

4.3.1 COMPUESTOS AROMÁTICOS

El Pisco obtenido de uvas Italia colectadas de tres zonas ubicadas en el valle de Moquegua (Anexo 1) tiene terpenos incluyendo citronelol (C), geraniol (G), linalol (L), nerol (N) y α -Terpineol (α -T), los cuales no fueron detectados, excepto α -T en baja concentración, en el Pisco de la variedad Negra Criolla (Tabla 10). Sin embargo, el contenido de C, G, L, N y α -T fueron más bajos que los valores encontrados previamente en Pisco de uvas Italia muestreadas de la Región de Moquegua (C= 575 μ g/L, G = 1451 μ g/L, L = 4821 μ g/L y N = 885 μ g/L) (Cacho et al. 2012). Una diferencia valorable en los compuestos volátiles se asoció con las propiedades químicas de la uva de Italia relacionadas con la zona y el mes en que se realizó la recolección y el proceso de elaboración, fermentación y destilación del Pisco. No obstante, nuestros resultados concuerdan con los anteriores que mostraron que los terpenos dominan el perfil volátil de los Piscos producidos a partir de la variedad de uva Italia. Como se mostró anteriormente, los terpenos influyen en el aroma primario o varietal y tienen un impacto en la calidad sensorial a pesar de sus concentraciones muy bajas (Cacho et al. 2012), que en parte explica las diferencias en los atributos sensoriales de Pisco obtenido de variedades de uva Italia y Negra Criolla y se ha encontrado en alta concentración en Pisco Italia de la región de Ica. Sin embargo, el Pisco Negra Criolla tiene mayor 2-fenilacetato (2-Pa) que el encontrado en el Pisco Italia (Tabla 10) a pesar de que este compuesto aromático ha sido asociado con las propiedades sensoriales del Pisco; así, 2-Pa ha sido encontrado en otros Piscos de Italia en concentraciones que van desde 263 a 982 μ g/L (Cacho et al. 2012).

Generalmente, los Piscos aromáticos están marcados por sus altas concentraciones de 2-feniletanol, 2-feniletil acetato y terpenos (Cacho et al. 2012). Tanto el Pisco Italia como el Negra Criolla mostraron un contenido muy alto de 1-hexanol (Tabla 10) en comparación con los Piscos comerciales reportado anteriormente producidos a partir de uvas Italia muestreado en tres regiones peruanas que oscilaba entre 2.3-3.6 μ g/L (Cacho et al. 2012). Se ha demostrado que el 1-hexanol contribuye a los atributos sensoriales hierbas y florales del Pisco peruano, aunque está en una concentración más baja comparada con otros destilados (Cacho et al. 2012). El

alcohol de bencilo (Ba) se encontró por primera vez tanto en el Pisco Italia como en el Negra Criolla, el alcohol de bencilo (Ba) se encontró en bajas concentraciones y el alcohol de feniletilo (Pa) en una concentración muy alta (más alta en el Pisco Negra Criolla) (Tabla 10). El Ba se ha encontrado en la sidra y contribuye con propiedades sensoriales afrutadas, florales y dulces (Antón-Díaz et al. 2016). Además, el 3-hexen-1-ol (3-H-ol) también se encontró en altas concentraciones en el Pisco Italia comparado con el Pisco Negra Criolla (cerca de 30 veces), similares a las encontradas en los destilados de uva (Lukić et al. 2006). Sin embargo, la contribución del 3-H-ol a la calidad sensorial del Pisco no ha sido establecida. Por otro lado, el Pisco Negra Criolla mostró mayor contenido de ésteres etílicos (Eb, Ed, Ehx, Ehp, El Eo, Ep y Ev) que el Pisco Italia (Tabla 3). Además, el contenido de Ehx y Ed encontrado en el Pisco Italia fue más alto que los reportados para el Pisco Italia muestreado de diferentes zonas del Sur del Perú (Ehx = 36.6 µg/L y Ed = 242 µg/L) y otros ésteres etílicos no han sido previamente reportados (Cacho et al. 2012). Los ésteres etílicos se han encontrado en bajas concentraciones en otros destilados obtenidos de orujo de uva (Cortés et al. 2010) y sorgo (Szambelan et al. 2020). Finalmente, los NSYS aislados de las uvas Italia y Negra Criolla podrían contribuir con los compuestos volátiles encontrados en el Pisco.

Tabla 10. Valores mínimos, máximos, media y desviación estándar de compuestos volátiles en Pisco de las variedades de uva Italia y Negra Criolla producidos en condiciones industriales.

Compuesto Volátiles ($\mu\text{g/L}$)	Pisco de uva variedad Italia (n=18)				Pisco uva variedad Negra Criolla (n=18)			
	Min	Max	Media	SD	Min	Max	Media	SD
1-hexanol(1-H)	256.47	773.59	504.58	146.00	446.85	2784.50	1143.64	590.01
3-hexen-1-ol (3-H-ol)	50.93	343.74	184.67	83.68	1.07	12.85	5.15	2.72
2-fenilacetato (2-Pa)	122.86	525.20	238.03	104.53	278.07	2923.13	847.10	561.88
Alcohol de bencilo (Ba)	6.67	75.00	33.07	21.52	6.67	112.24	35.24	24.04
Butanoato de etilo (Eb)	4.65	95.63	35.50	23.39	13.29	81.33	32.59	14.82
Citronelol (C)	138.67	352.34	226.04	71.13	-	-	-	-
Etil decanoato (Ed)	91.65	1248.89	454.18	306.08	48.77	830.48	330.35	208.97
Alcohol de feniletilo (Pa)	2721.95	13330.25	7630.61	2641.98	13524.83	38837.24	22770.97	6095.05
Furfural (F)	7.54	166.47	82.73	44.46	6.67	86.68	36.81	21.41
Geraniol (G)	181.10	442.19	309.63	66.45	-	-	-	-
Etil hexanoato (Ehx)	20.77	219.85	69.50	55.36	24.67	144.02	79.40	32.45
Etil heptanoato (Ehp)	-	-	-	-	n.d	5.34	0.88	1.59
Acetato de isoamilo (Ia)	13.06	303.48	103.74	79.15	80.13	632.38	187.41	134.68
Etil laurato (El)	222.03	1056.14	484.35	235.46	325.37	1970.95	849.26	391.05
Linalol (L)	873.43	2342.24	1386.83	398.29	-	-	-	-
Nerol (N)	106.66	188.41	133.15	23.294	-	-	-	-
Etil octanoato (Eo)	41.48	290.01	123.73	81.86	31.48	427.67	171.12	103.29
Etil pelargonato (Ep)	0.00	4.11	1.50	0.93	0.85	4.71	2.04	1.07
α -Terpineol (α -T)	190.61	456.48	284.55	64.44	3.46	133.68	16.76	27.92
Etil valerato (Ev)	n.d	0.83	0.089	0.22	-	-	-	-

n.d.: No detectado

4.3.2 ANÁLISIS SENSORIAL

Descriptorios cítricos (Ci), florales (Fl), alcohol (Al) y almibar (Sy) fueron marcados en el Pisco Italia y frutos secos (Un), almibar (Sy), alcohol (Al) y floral (Fl) en el Pisco Negra Criolla (Figura 9). Los descriptorios sensoriales Ci del Pisco Italia estarán asociados con su contenido de terpenos incluyendo citronelol (C), geraniol, linalool, nerol y α -Terpineol, que ha sido reportado en el Pisco Italia (Cacho et al. 2012). De hecho, el Pisco Negra Criolla ha sido caracterizado como de aroma neutro sin notas aromáticas particulares (Cacho et al. 2013). Además, en el caso del Pisco Negra Criolla, el contenido de 1-hexanol y 2-feniletíl alcohol contribuyen a los atributos sensoriales florales y verdes (Cacho et al. 2012). Por otro lado, el contenido de alcohol Bencilo que se encuentra en el Pisco, también aporta propiedades sensoriales frutales, florales y dulces (Antón-Díaz et al. 2016). El descriptor sensorial frutos secos se encontró marcadamente en el Pisco Negra Criolla, pero no se encontró en el Pisco Italia, en contraste con el informe para el Pisco Italia muestreado de diferentes regiones peruanas, incluso Moquegua, aunque este descriptor sensorial no se ha asociado con ningún compuesto volátil específico encontrado en el Pisco (Cacho et al. 2012). Sin embargo, el sensorial de frutos secos ha sido descrito en brandy que contiene compuestos furanos como 2-acetil-5-metilfurano y 5-metil-2(3H)-furanona (Yuan et al. 2023). El descriptor sensorial alcohol (Al) ha sido asociado con el contenido de alcohol (Jung et al. 2014) pero en el caso del Pisco de Italia es parcialmente enmascarado por el contenido de terpenos, que le confieren una fuerte característica aromática.

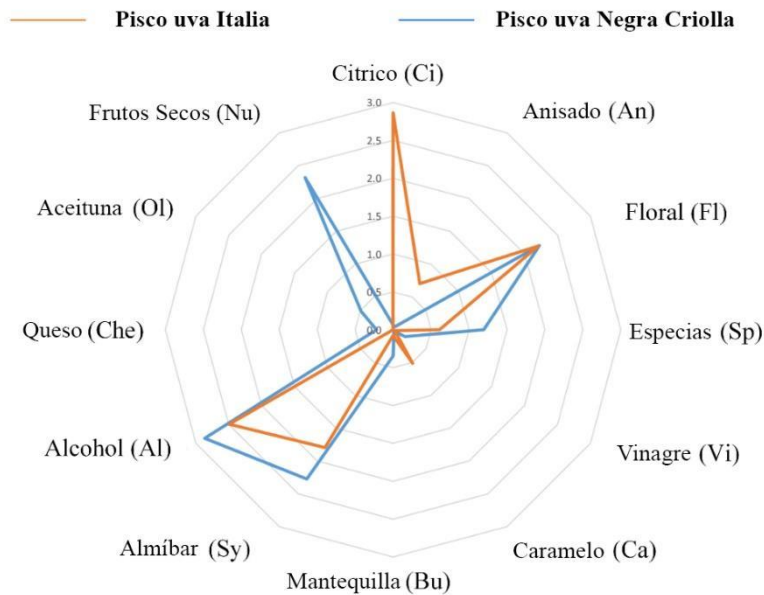


Figura 9. Análisis sensorial del Pisco de Italia y Negra Criolla.

4.3.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y PROPIEDADES SENSORIALES

El análisis de componentes principales (ACP) del contenido de compuestos volátiles y atributos sensoriales de los Piscos Italia y Negra Criolla se utilizó para mejorar la comprensión de la información volátil y sensorial para reducir la complejidad del conjunto de datos para poder visualizar mejor las correlaciones entre estas variables. Así, el score plot mostró que el Pisco Italia y Negra Criolla pueden ser diferenciados en contenido de compuestos volátiles y atributos sensoriales por los dos primeros componentes, que explicaron > 58 % (Figura 10A). El Biplot demostró que los atributos sensoriales cítricos (Ci) y rosados (Ro) del Pisco Italia están asociados con un alto contenido de geraniol, citronelol, linalol, α -terpineol y probablemente con 3-hexen-1-ol. Por otra parte, el contenido de acetato de 2-feniletilo (2-Pa) se relacionó con los atributos de mantequilla, verduras cocidas y picante. Además, el sulfuroso (Su), químico (Ch), emperreumático (Em), vinagre (Vi), almíbar (Sy), cebolla (O), vegetal V, queso (Che), frutos secos (Nu), fenólico (Phe) y oliva (Ol) del Pisco Italia y Negra Criolla no se asoció con ningún

compuesto volátil. Finalmente, el contenido de derivados etílicos no se asoció con ningún atributo sensorial (Figura 10B).

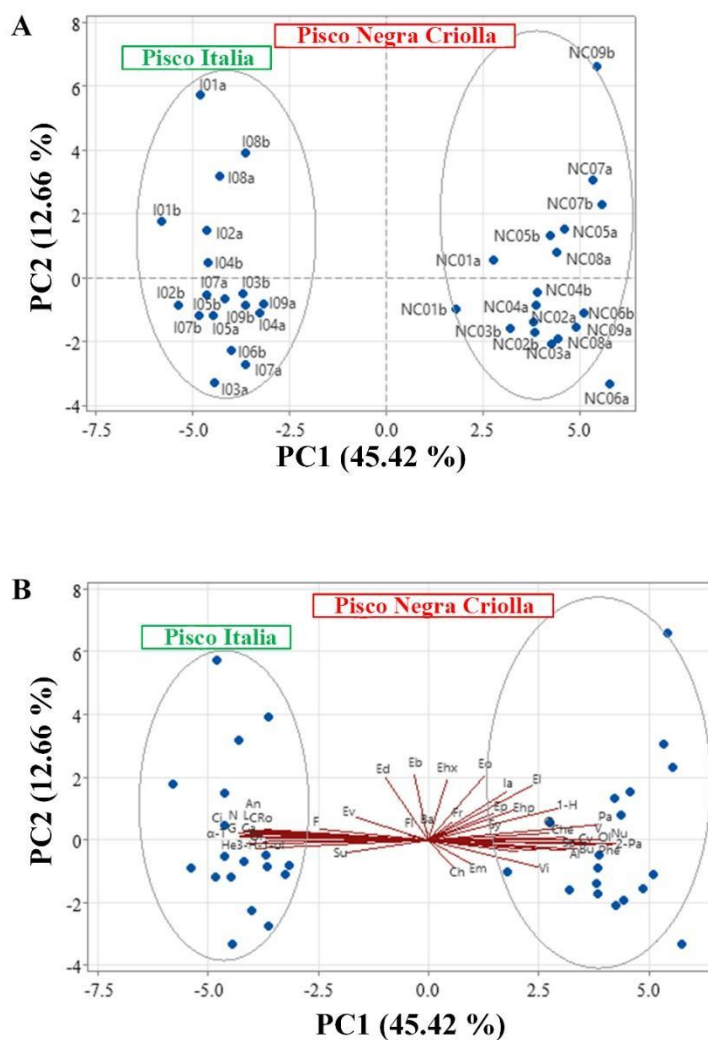


Figura 10. Análisis de componentes principales de compuestos volátiles y atributos sensoriales del Pisco obtenido por fermentación espontánea de las variedades Italia y Negra criolla de la región Moquegua. A) Score plot y B) Biplot de compuestos volátiles:

1-hexanol (1-H), 3-hexen-1-ol (3-H -1-ol), 2-fenilacetato (2-Pa), alcohol de bencilo (Ba), butanoato de etilo (Eb), citronelol (C), Etil decanoato (Ed), alcohol de feniletilo (Pa), furfural (F), geraniol (G), Etil hexanoato (Ehx), Etil heptanoato (Ehp), acetato de isoamilo (Ia), Etil laurato (dodecanoato de etilo) (El), linalol (L), nerol (N), Etil octanoato (Eo), Etil pelargonato (Ep), α -terpineol (α -T), Etil valerato (Ev) y atributos sensoriales: Químico (Ch), Frutal (Fr), Cítrico (Ci), Anisado (An), Floral (Fl), Rosas (Ro), Hierbas (He), Especias (Sp), Aceitoso (Oi), Sulfuroso (Su), Vinagre (Vi), Emperreumatic (Em), Caramelo (Ca), Mantequilla (Bu), Almíbar (Sy), Alcohol (Al), Queso (Che), Cebolla (O), Fenólico (Phe), Aceituna (Ol), Frutos secos (Nu), Verdura (V), Verdura cocida (Cv).

4.4 EVALUAR LA CONTRIBUCIÓN DE LAS NSYS ANALIZANDO LOS COMPUESTOS VOLÁTILES Y ATRIBUTOS SENSORIALES DEL PISCO VARIEDAD ITALIA Y VARIEDAD NEGRA CRIOLLA RELACIONADOS CON LAS DIFERENTES ESTRATEGIAS DE MEZCLAS DE CEPAS INOCULADAS.

4.4.1 CUANTIFICACIÓN DE LEVADURAS DE LA SUPERFICIE DE LA UVA

Luego de la incubación (28°C, 48 h) se observó una amplia variación de concentraciones de levaduras entre variedades de uva (Figura 11). Se observaron recuentos elevados de células de NSYS ($>10^{10}$ UFC/g) de ambas variedades de uva durante el inicio (primeras 24 h) del proceso de fermentación. Las NSYS identificadas en la variedad Italia, en orden de abundancia, fueron: *Pichia terricola* (56 %), *Metschnikowia pulcherrima* (31 %) and *Naganishia vauhanmartinae* (13 %); y en la variedad Negra Criolla: *Vishniacozyma carnescens* (50 %), *Vishniacozyma heimaeyensis* (30%) and *Aureobasidium pullulans* (20%). Las NSYS fueron las especies preponderantes en la superficie de la uva. Los mayores recuentos se obtuvieron con valores en torno a $3.5 \cdot 10^{10}$ UFC/ml (*Aureobasidium pullulans*), y valores más bajos con valores en torno a $1.10 \cdot 10^{10}$ UFC/ml (*Metschnikowia pulcherrima*). El *Aureobasidium* ha sido reportado como género mayoritario en varios estudios (Gao et al. 2019, Wei et al. 2018), esta levadura se caracteriza por su capacidad inhibitoria frente a hongos fitopatógenos, así como capacidad de síntesis de celulasa, enzima asociado a la descomposición del material lignocelulósico y liberación de compuestos aromáticos varietales (Lorenzini y Zapparoli 2019). Por otro lado, la cepa *M. pulcherrima*, se encuentra en la superficie de la uva y en los mostos de vino; y presenta actividad poligalacturonasa (Belda et al. 2016), similar a nuestra investigación. Por lo tanto, la selección de cepas de levaduras pectinolíticas puede ser una herramienta útil para elaborar vinos de mayor calidad sin recurrir a preparados enzimáticos comerciales más caros. Sin embargo, para garantizar la seguridad y la calidad del producto final, es crucial llevar a cabo una cuidadosa selección basada en criterios científicos sólidos.

La cepa *Pichia terricola* (P), obtuvo un recuento de células viables de 2.64×10^{10} UFC/g, similar a los reportado en investigaciones previas (Shi et al. 2019). Cabe mencionar, que especies de levaduras pertenecientes al género *Pichia* son conocidos por impartir atributos enológicos beneficiosos, efectos asociado a la actividad de la β -glucosidasa, responsables de la hidrolisis de glucósidos y liberación de compuestos de sabor como fenoles y alcoholes aromáticos

(Scansani et al. 2022), y es una levadura que se encuentra naturalmente en la superficie de las uvas. A pesar de la prevalencia del género *Naganishia*, *Aureobasidium* y *Picchia* en la poscosecha y el mosto de uva, se caracterizan por su limitada capacidad fermentativa, es decir, su abundancia relativa se reduce o es baja durante la etapa de fermentación alcohólica comparado a otras cepas resistentes al alcohol como *Saccharomyces cerevisiae* y *Lachancea thermotolerans*. Otra levadura llamada *Naganishia vaughanmartinae*, perteneciente a la uva variedad Italia el cual obtuvo un elevado promedio de células viables comprendido entre 3.11×10^{10} UFC/g. Sin embargo, al igual que otras levaduras, *Naganishia vaughanmartinae* puede influir en la calidad de la uva y su contribución a la fermentación del vino (Vicente et al. 2023). *Naganishia* aparece como el género de levadura más extendido dentro del microbioma central de suelos de viñedos de todo el mundo (Gobbi et al. 2022). La capacidad de las especies de *Naganishia* para crecer a bajas temperaturas (Bijlani et al. 2022). Algunas cepas de esta levadura se han encontrado que producen compuestos de aroma frutal y floral, mientras que otras cepas pueden contribuir a la degradación de ácidos orgánicos importantes para la calidad del vino. Cabe mencionar, que la *Saccharomyces cerevisiae* está ausente en los aislamientos de la superficie de uva, pero siempre es la levadura predominante al final de la fermentación (Vaudano et al. 2019).

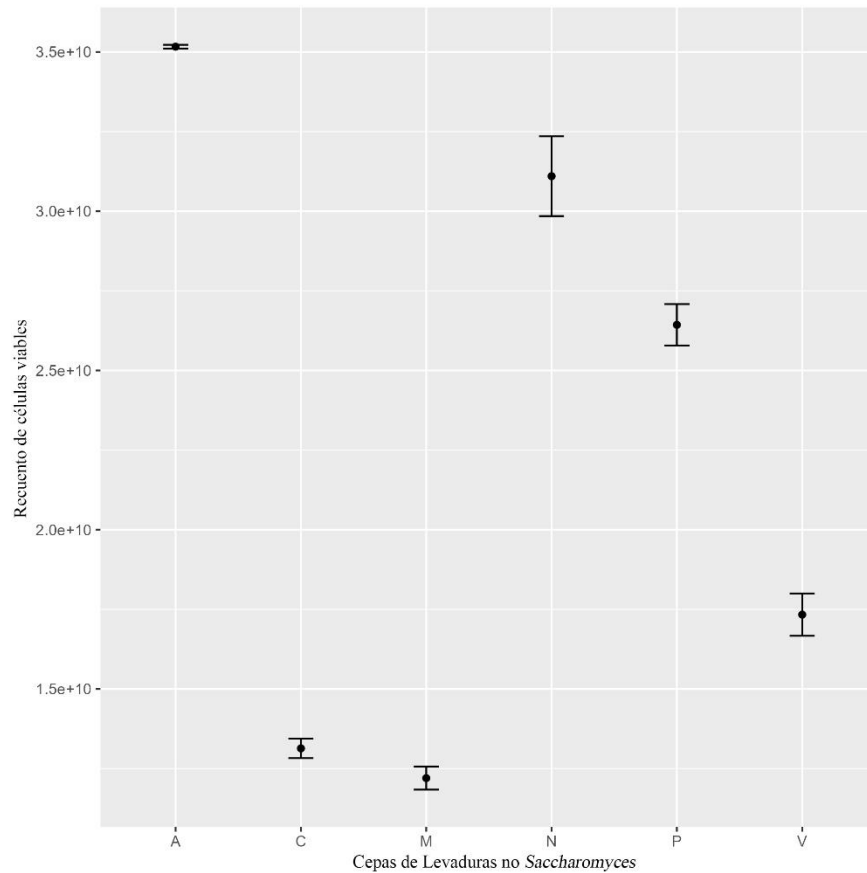


Figura 11. **Recuento de células viables por periodo en días para las distintas levaduras.**
Uva Variedad Italia (*Metschnikowia pulcherrima*: M; *Pichia terricola*: P; *Naganishia vaughanmartinae*: N).
Uva Variedad Negra Criolla (*Vishniacozyma heimaeyensis*: V); *Vishniacozyma carnescens*: C; *Aureobasidium pullulans*: A).

4.4.2 DINÁMICA DEL CRECIMIENTO DE LAS DIVERSAS MEZCLAS DE LEVADURAS NATIVAS

La Figura 12, presenta la dinámica de crecimiento de las diferentes mezclas de las NSYS, la inoculación se realizó al inicio de fermentación de los mostos de ambas variedades. Se mostraron los cambios en los contenidos de células viables en tres puntos de la etapa fermentativa (Día 1. Día 6 y día 12) aumentando gradualmente del día 1 a día 12, por medio de análisis de recuento en placas. Entonces, la tasa de crecimiento comenzó una disminución general en la población de levaduras, hasta obtener un mosto con densidad 1000, quedando listo para iniciar la destilación.

La población de células viables alcanzó un promedio máximo de 6×10^7 células/g. Como era de esperar, comparando I0M50P50N con las otras mezclas incluidas los controles (sin inoculación de levaduras) presentan un crecimiento elevado (> 3500 UFC/g) durante el día 1, la concentración de levaduras es significativamente mayor en ambas variedades inoculadas. La población máxima obtenida con cultivo único de *M. pulcherrima* fue de 4.2×10^7 UFC/g. Cada mezcla de levaduras muestra una cinética de crecimiento diferente, que es mayor con respecto a los datos reportados para uvas no dañadas, que comprenden entre aproximadamente 2 y 4 UFC/g (Prakitchaiwattana et al. 2004). En consecuencia, no es raro encontrar una mezcla de bayas dañadas y no dañadas en racimos de uvas maduras en el momento de la cosecha. Se tuvo especial cuidado en separar las bayas dañadas y no dañadas para el análisis de levadura. La microbiota en la piel de la uva varían según la variedad de uva, el método de recolección y el grado de maduración. Estas especies nativas asociadas a la superficie externa de la baya, constituyen el microbiota predominante en el mosto y se desarrollan durante las primeras etapas del proceso. Además, durante la fermentación alcohólica, tanto la persistencia de las levaduras como el número de células son los principales factores que afectan las características aromáticas. Como se informó en muchos estudios previos, las especies de *Metschnikowia*, *Pichia*, *Aureobasidium pullulans* y *Candida*, predominan en las uvas para vino en el momento de la cosecha (Loureiro 2003, Sabate et al. 2002, Barata et al. 2008). *Saccharomyces cerevisiae* no se aisló directamente de la superficie de la uva, ya que predominaron otros microorganismos como las levaduras *No Saccharomyces*. De hecho, *S. cerevisiae* puede encontrarse fácilmente durante la fermentación del mosto, cuando prevalecen otras levaduras debido a su alto rendimiento fermentativo y tolerancia al etanol (Martini 1993, Capozzi et al. 2015) (Martini 1993, Capozzi et al. 2015). En contraste, las levaduras del género *No Saccharomyces*, poseen una capacidad de fermentación más débil (Binati et al. 2020).

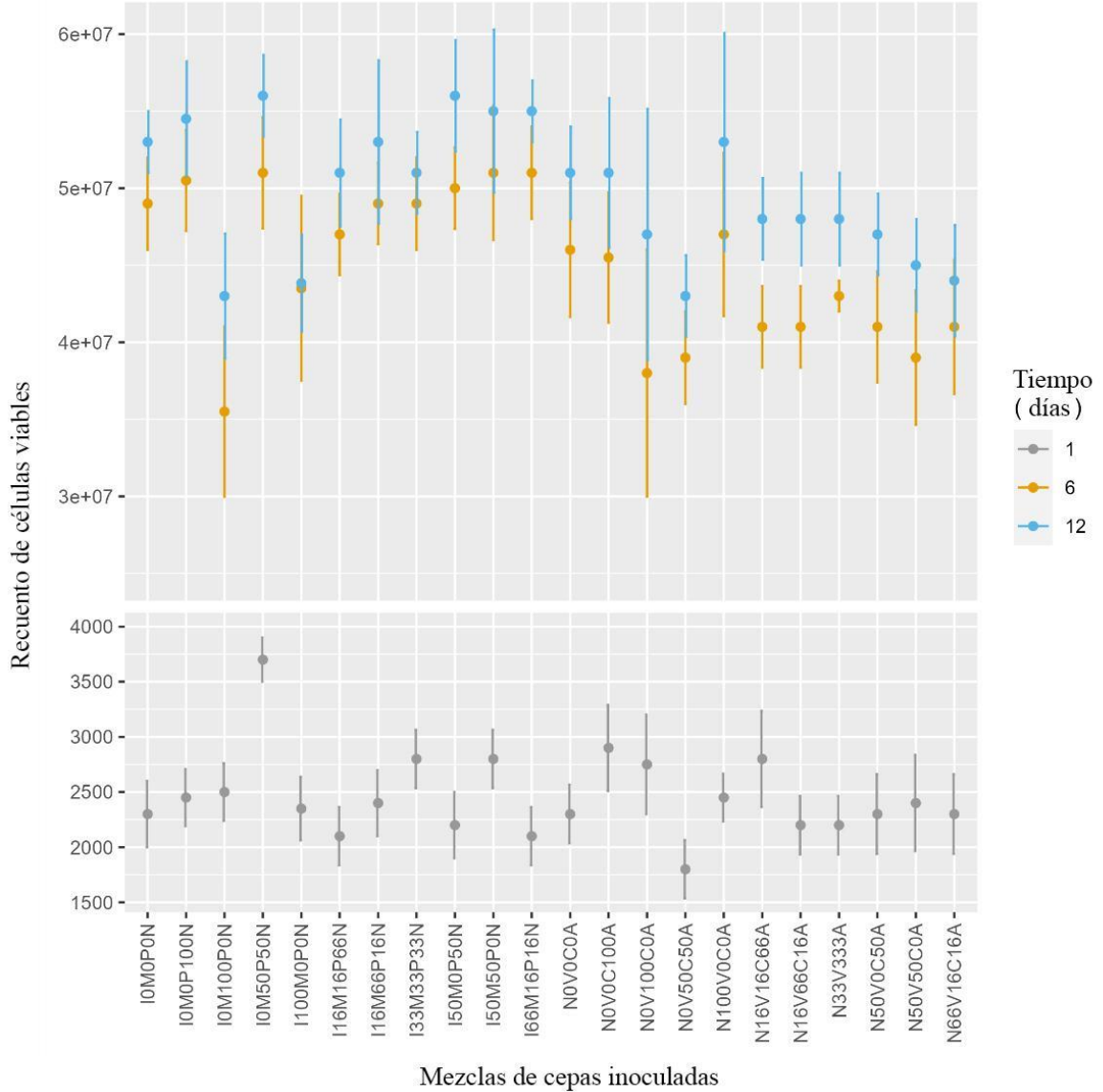


Figura 12. Recuento de la población total de levaduras (ufc/g de mosto) en mosto de la variedad Italia y mosto variedad Negra Criolla durante 12 días de fermentación. Los valores indicados en el gráfico en cada momento de muestreo representan las mezclas de levaduras inoculadas y muestra control (sin inocular).

4.4.3 INFLUENCIA DE LAS INTERACCIONES SOBRE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES PRODUCIDOS Y LIBERADOS POR LAS LEVADURAS

La biodiversidad microbiana que se encuentra en diferentes regiones vitivinícolas es un determinante importante del terroir vitivinícola. Es bien sabido, que las interacciones microbianas son factores de importancia que afectan la estructura del vino y modulan las propiedades sensoriales (Liang et al. 2023).

Con el proceso de fermentación, la diversidad microbiana de los mostos cambió significativamente. De acuerdo con los diferentes cultivos iniciadores utilizados, se detectaron 19 compuestos volátiles y se enumeran en la Tabla 11. Se cuantificó 7 compuestos varietales (citronerol (C), Linalool (L), Limonene (Li), Nerol (N), α -terpineol (α T), Geraniol (G), 1-Hexanol (H), 3-hexen-1-ol (Hol)), 1 ésteres de acetato (acetato de Isoamilo (Ia)), 5 ésteres etílicos (Etil butanoate (Eb), Etil decanoate (Ed), Etil hexanoate (Ehx), Etil laurate (El), Etil octanoate (Eo)), 3 Feniletilos (Alcohol de bencilo (Ba), 2-fenilacetato (Pac), Alcohol de feniletilo (Pal)) y 1 furfural (F). Estos compuestos fueron determinados por el análisis GC-MS de extractos obtenidos por extracción en fase sólida a partir de Pisco diluido. El aroma es una característica más importante que contribuyen a la calidad del Pisco. El tema principal de nuestro estudio fue evaluar las interacciones de las levaduras sobre los componentes volátiles del Pisco variedad Italia. Junto con el Pisco control (IOMOPON) é inoculados secuencialmente (IOMOP100N, IOM100PON, IOM50P50N, I100MOPON, I16M16P66N, I16M66P16N, I33M33P33N, I50MOP50N, I50M50PON, I66M16P16N), los tratamientos mostraron diferencias significativas para todos los compuestos aromáticos analizados.

Las levaduras encontradas en la piel de las uvas participan en las fermentaciones naturales del vino y posteriormente influyen en los destilados. Los Piscos de Italia destacan especialmente por su alto contenido en linalol, que en nuestra investigación es mayor con respecto a otras investigaciones previas (Cacho et al. 2012) y nos interesaba saber si la adición de *Pichia*, habría cambiado el perfil de terpenos del destilado final. Los ésteres producidos por las levaduras durante la etapa fermentativa que contribuyen aromas agradables, los más importantes de ellos presentan de manera individual aromas frutales o florales. De hecho, al seleccionar una cepa de levadura específica, los productores pueden buscar características aromáticas deseadas. Algunas cepas pueden ser conocidas por producir perfiles aromáticos intensos y complejos, mientras que otras pueden ser más sutiles o tener perfiles específicos, como notas frutales, florales, especiadas

o terrosas. En los tratamientos I0M100P0N, el empleo de *Pichia Terrícola* provocó una ausencia de etil butanoate y etil hexanoate, Sin embargo, este mono-inoculo tiene un alto contenido varietal de α -terpineol (600.38 $\mu\text{g/l}$) y un alto contenido de esteres etílicos como etil laurate (549.69 $\mu\text{g/l}$), en comparación con las otras mezclas de levaduras. Investigaciones anteriores han demostrado que las levaduras *Pichia* pueden producir altas cantidades de alcohol de feniletilo (Martínez-Avila et al. 2020), asimismo es un importante compuesto de sabor y fragancia con olor a rosas (Etschmann. et al. 2002) que comparando con nuestros resultados son de menor impacto.

Sin embargo, la mono-inoculación con *M. pulcherrima* (I100M0P0N) provoco un alto contenido del compuesto citronerol (496.64 $\mu\text{g/l}$) y un alto contenido de geraniol (691.38 $\mu\text{g/l}$) ambos compuestos son de origen varietal, influenciando en el mosto control (sin inocular) y el mosto inoculado. Los terpenos pertenecen al aroma primario, como el linalool, el nerol, el citronelol, el geraniol, el α -terpineol son componentes que contribuyen positivamente al perfil de sabor y aroma del vino y los destilados concentrándose en las bayas de uva (Williams y Buica 2020, Karabegović et al. 2021). Cabe mencionar que esta cepa muestra niveles más bajos de alcoholes superiores que esteres etílicos, cuya relación indica características de calidad. En los atributos sensoriales de la bebida espirituosa intervienen positivamente los alcoholes superiores, influidos por la variedad de uva, las condiciones de fermentación y los procesos de destilación, mientras que los ésteres contribuyen a realzar el aroma de los destilados (Bovo et al. 2015). Los alcoholes isoamílicos muestran concentraciones más altas en los destilados obtenidos a partir de mostos sin inocular, es significativamente mayor ($p\text{valor} < 0,05$) comparándolos con las demás mezclas de levaduras nativas. El Pisco Negra Criolla, de acuerdo a los diferentes cultivos iniciadores utilizados, se detectaron 13 compuestos (Tabla 12). Se cuantifico 3 compuestos varietales (Limoneno, 1-Hexanol, 3-hexen-1-ol), 1 esteres de acetato (Acetato de Isoamilo), 5 esteres etílicos (Butanoate de etilo, Etil decanoate, Etil hexanoate, Etil laurate, Etil octanoate), 3 Feniletilos (Alcohol de Bencilo, 2-fenilacetato, Alcohol de feniletilo) y 1 furfural. Cabe resaltar, a diferencia del Pisco Italia, cinco compuestos terpenicos (Citronerol, Linalol, Nerol, α -terpineol y Geraniol), no se detectaron en el Pisco Negra Criolla.

El compuesto predominante en todos los tratamientos fue el Alcohol de feniletilo (2-phenyl ethanol), inclusive con concentraciones superiores que las observadas en el Pisco Italia. Todos los tratamientos no mostraron diferencias significativas ($p\text{valor} < 0,05$), pero se observó un

incremento del contenido de alcohol de feniletilo (entre 19 700 a 35900 $\mu\text{g/l}$) comparado al tratamiento control sin inóculo (15800 $\mu\text{g/l}$), con excepción del tratamiento N16V66C16A con un valor inferior (10900 $\mu\text{g/l}$). Este compuesto es común encontrarlo en diversas bebidas alcohólicas, entre ellas el Pisco, con descripción olfativa a rosas y flores (Etschmann. et al. 2002), siendo uno de los principales contribuyentes en el perfil aromático del Pisco Negra Criolla. Los seis siguientes compuestos mayoritarios presente en todos los tratamientos fueron: alcohol de bencilo, acetato de isoamilo, Etil laurate, 2-fenilacetato, 1-Hexanol y Etil decanoate. En alcohol de bencilo, el incremento fue significativo ($p\text{valor} < 0,05$) en los tratamientos con inoculación N0V0C100A, N0V100C0A, N0V50C50A y N33V33C33A (con un rango en concentración de 489.48 a 734.82 $\mu\text{g/l}$) respecto al control N0V0C0A (sin inoculación) con 117.51 $\mu\text{g/l}$. El importante nivel de ambos compuestos bencénicos, el alcohol de feniletilo y alcohol de bencilo, es consistente con estudios previos del vino tinto (Vilanova et al. 2008), destilado de orujo (Cortés y Fernández 2011) y del Pisco Italia (Cacho et al. 2012), capaces de contribuir con aromas de perfume floral, polen y rosas (Shi et al. 2019). Este resultado es consistente con reportes previos, donde el efecto de co-inoculación con NSYS introducidos en el proceso de fermentación tienden a aumentar las concentraciones de feniletilos (como alcohol de feniletilo, alcohol de bencilo y 2-fenilacetato), pero dependerá de factores como la estrategia de inoculación, variedad de uva y tipo de cepa empleada (Vilela 2020, Marcon et al. 2018).

En el caso de esteres etílicos, el contenido de Etil laurate disminuyo como efecto de la inoculación (en todos los tratamientos), a valores entre 220.74 a 473.15 $\mu\text{g/l}$, respecto al control (sin inoculación) con 1220 $\mu\text{g/l}$. De igual forma, el Etil decanoate mostro una reducción por la inoculación (todos los tratamientos), a valores entre 70.36 a 236.2 $\mu\text{g/l}$, respecto al control (sin inoculación) con 536.58 $\mu\text{g/l}$. Comúnmente la co-inoculación en la fermentación vínica incrementa o no afecta los niveles de específicos esteres etílicos respecto a levaduras puras *Saccharomices* y NS, como fue el caso del uso de *Lachancea (Kluyveromyces) thermotolerans* (Gobbi et al. 2013) y *Pichia fermentans* (Ma et al. 2017). La reducción de Etil laurate y Etil decanoate observada en nuestro trabajo puede atribuirse al uso de NSYA sin estudios previos y la compleja interacción de la combinación entre las cepas nativas y los componentes de uva durante la fermentación.

El contenido de acetato de isoamilo, 2-fenilacetato y 1-Hexanol no registraron diferencia entre todos los tratamientos, las concentraciones estuvieron en un rango de 306.15 a 895 $\mu\text{g/l}$, 179.73 a 474.09 $\mu\text{g/l}$ y 125.2 a 387.54 $\mu\text{g/l}$, respectivamente. El resto de los compuestos poseen concentraciones inferiores a 174 $\mu\text{g/l}$ y sin diferencia significativa ($p\text{valor} < 0,05$) entre todos los tratamientos, induciendo una menor influencia en el perfil aromático del Pisco. En general, comparando con el Pisco variedad Italia, la composición química del Pisco Negra Criolla no mostró características destacables, con niveles bajos en la mayoría de todos los volátiles analizados.

Tabla 11. Media y desviación estándar de las concentraciones de compuestos volátiles (µg/l) en las muestras de Pisco Italia

	I0M0P0N	I0M0P100N	I0M100P0N	I0M50P50N	I100M0P0N	I16M16P66N	I16M66P16N	I33M33P33N	I50M0P50N	I50M50P0N	I66M16P16N
Ba	99.59 ±0.59	89.34 ±9.02	96.88 ±7.73	126.8 ±3.47 ^a	125.02 ±4.35 ^b	72.91 ±0.0 ^{bc}	92.62 ±1.19	122.6 ±0.16	111.1 ±0.23	134.79 ±1.48 ^c	82.5 ±0.97
C	233.0 ±4.91	265.14 ±3.99	251.62 ±2.15	208.33 ±8.87	496.64 ±8.25	99.53 ±2.69	194.72 ±4.94	182.5 ±1.88	403.09 ±3.94	318.66 ±8.17	179.26 ±4.61
Eb	74.39 ±13.86 ^{abcdefg}	6.6 ±0.64 ^a	0.0 ±0.0 ^b	23.34 ±1.03 ^c	13.09 ±1.15 ^d	0.0 ±0.0 ^e	0.0 ±0.0 ^f	24.63 ±1.76 ^g	0.0 ±0.0 ^h	0.0 ±0.0 ⁱ	0.0 ±0.0 ^j
Ed	1.78E+03 ±1.33E+02 ^{abcdefg}	158.71 ±6.73 ^a	179.11 ±9.86 ^b	122.98 ±5.66 ^c	276.42 ±8.13 ^d	135.2 ±4.93 ^e	130.55 ±3.13 ^f	115.4 ±6.19 ^g	163.86 ±3.88 ^h	243.53 ±8.72 ⁱ	195.26 ±7.06 ^j
Ehx	317.78 ±14.24 ^{abcdefg}	25.47 ±2.65 ^a	0.0 ±0.0 ^b	0.0 ±0.0 ^c	20.48 ±2.66 ^d	0.0 ±0.0 ^e	0.0 ±0.0 ^f	0.0 ±0.0 ^g	38.01 ±5.06 ^h	26.62 ±1.64 ⁱ	21.82 ±0.34 ^j
El	2.73E+03 ±1.89E+02 ^{abcdefg}	265.77 ±3.18 ^a	649.69 ±5.64 ^b	226.42 ±11.22 ^c	339.67 ±1.94 ^d	224.04 ±7.55 ^e	197.02 ±7.02 ^f	213.43 ±2.47 ^g	244.32 ±3.17 ^h	338.12 ±3.64 ⁱ	281.47 ±4.43 ^j
Eo	737.24 ±40.07 ^{abcdefg}	83.95 ±5.56 ^a	240.62 ±6.03 ^b	67.45 ±2.86 ^c	125.15 ±8.96 ^d	62.92 ±3.02 ^e	97.56 ±1.08 ^f	61.97 ±0.82 ^g	114.3 ±5.2 ^h	106.59 ±12.63 ⁱ	85.38 ±9.75 ^j
Ep	4.60E+08 ±1.93E+07	8.07E+07 ±0.15E+08	3.28E+08 ±0.78E+08	7.98E+08 ±1.12E+07	4.96E+08 ±1.73E+08	12.62 ±0.0	12.62 ±0.0	7.02E+08 ±1.87E+07	3.79E+08 ±0.55E+07	12.62 ±0.0	5.21E+08 ±0.92E+07
F	46.96 ±2.26	43.02 ±1.18	36.84 ±0.0 ^{abcd}	52.61 ±2.04	50.47 ±2.56 ^b	54.76 ±2.08	43.33 ±0.02 ^{bc}	48.08 ±0.06	48.05 ±1.38	49.17 ±0.74 ^{cd}	40.55 ±0.05 ^e
G	162.31 ±2.46	293.67 ±8.71	334.32 ±5.1	294.94 ±13.36	691.38 ±26.98	140.8 ±12.85	208.12 ±3.98	243.68 ±4.19	496.55 ±6.5	364.4 ±30.96	167.12 ±21.86
H	191.92 ±3.46 ^a	230.06 ±7.61 ^a	544.0 ±16.56 ^{bcd}	348.5 ±5.09	460.52 ±47.08 ^{bcd}	106.54 ±34.89 ^{cd}	291.18 ±26.35	312.49 ±5.44	301.55 ±8.16	332.86 ±6.57	145.5 ±0.3 ^{def}

... Continuación tabla 11.

Hol	54.66 ±0.08	70.03 ±7.29	118.36 ±5.91	160.64 ±10.34	204.25 ±26.71	60.31 ±1.7	88.67 ±8.27	166.44 ±0.5	92.35 ±11.5	156.35 ±16.32	55.7 ±1.33
Ia	556.08 ±8.69 ^{abcdefghij}	47.27 ±2.24 ^a	111.17 ±0.44 ^b	140.45 ±7.39 ^c	90.41 ±9.0 ^d	17.0 ±6.92 ^c	19.4 ±2.4 ^f	89.9 ±0.33 ^g	63.92 ±1.34 ^h	24.09 ±2.3 ⁱ	46.52 ±1.06 ^j
L	1.25E+03 ±0.93E+01	1.34E+03 ±0.90E+02	3.58E+03 ±1.00E+03 ^a	837.62 ±8.97	1.87E+03 ±0.18E+02	1.18E+03 ±0.10E+02	988.72 ±4.57	608.12 ±2.27 ^a	1.84E+03 ±0.59E+01	1.53E+03 ±0.95E+02	927.46 ±6.53
Li	20.0 ±0.11 ^a	21.96 ±3.49 ^b	2.94 ±0.0 ^{cd}	2.94 ±0.0 ^{de}	2.94 ±0.0 ^{hi}	2.94 ±0.0 ^{ij}	34.95 ±13.02	2.94 ±0.0 ^{mno}	67.98 ±6.34 ^{abcdehmnop}	50.41 ±3.48 ^{deghij}	2.94 ±0.0 ^p
N	116.74 ±7.28	186.93 ±8.19	186.17 ±3.31	162.29 ±5.12	331.81 ±5.79	116.69 ±2.67	161.92 ±2.7	138.47 ±1.0	275.17 ±5.3	226.91 ±6.76	139.07 ±3.88
Pac	222.01 ±1.76	181.26 ±3.2	218.82 ±3.91 ^a	161.36 ±1.97 ^b	235.36 ±4.16 ^{abcde}	162.03 ±2.26 ^c	172.5 ±1.7	153.65 ±0.31 ^d	214.34 ±6.22	190.12 ±7.13	158.24 ±2.09 ^e
Pal	6.10E+03 ±0.54E+02 ^a	8.04E+03 ±0.75E+03 ^b	2.41E+04 ±0.07E+04 ^{abcd}	1.12E+04 ±0.63E+02	1.76E+04 ±0.27E+03	5.98E+03 ±0.97E+02 ^c	9.88E+03 ±0.25E+02	1.19E+04 ±1.91E+02	1.18E+04 ±2.66E+02	1.60E+04 ±1.73E+03	4.87E+03 ±4.81E+02 ^d
aT	252.18 ±8.93	236.14 ±1.29	600.38 ±0.52 ^a	179.14 ±6.92	378.52 ±7.32	209.97 ±5.54	166.82 ±4.87	130.41±1.77 ^a	348.56 ±7.63	275.73 ±28.38	162.0 ±13.68

Los valores con la misma letra en la línea son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (95%).

Compuesto volátiles: Alcohol de bencilo (Ba), Citronelol (C), Etil butanoate (Eb), Etil decanoate (Ed), Etil hexanoate (Ehx), Etil laurate (ethyl dodecanoate) (El), Etil octanoate (Eo), Etil pelargonate (Ep), Furfural (F), Geraniol (G), 1-hexanol (H), 3-hexen-1-ol (Hol), acetate de isoamilo (Ia), Linalol (L), Limoneno (Li), Nerol (N), 2-fenilacetato (Pac), alcohol de feniletilo (Pal), α -terpineol (α T).

Tabla 12. Media y desviación estándar de las concentraciones de compuestos volátiles ($\mu\text{g/l}$) en las muestras de Pisco Negra Criolla

	N0V0C0A	N0V0C100A	N0V100C0A	N0V50C50A	N100V0C0A	N16V16C66A	N16V66C16A	N33V33C33A	N50V0C50A	N50V50C0A	N66V16C16A
Ba	117.51 $\pm 3.79^{abc}$	489.48 $\pm 9.55^a$	632.97 $\pm 10.62^a$	734.82 $\pm 1.25^b$	439.47 ± 9.22	513.76 ± 12.32	255.23 ± 1.16	685.26 $\pm 8.58^c$	312.15 ± 5.37	332.79 ± 6.84	445.82 ± 7.18
Eb	21.39 ± 3.59	5.99 ± 0.37	25.28 ± 3.27	25.1 ± 0.25	32.12 ± 4.88	19.3 ± 0.6	8.28 ± 0.68	26.48 ± 0.93	0.0 ± 0.0	17.34 ± 3.78	31.66 ± 0.56
Ed	536.58 $\pm 52.45^{abcde}$	217.79 ± 4.01	223.71 ± 32.38	215.81 ± 15.91	229.03 ± 10.89	202.67 $\pm 2.25^a$	70.36 $\pm 8.07^b$	236.2 ± 7.17	127.39 $\pm 13.45^c$	152.88 $\pm 8.21^d$	220.22 $\pm 7.81^e$
Ehx	93.68 ± 7.42	61.32 ± 5.01	43.8 ± 25.78	43.2 ± 2.51	82.17 ± 8.37	47.58 ± 4.02	5.5 ± 0.54	44.21 ± 0.81	27.94 ± 0.06	24.46 ± 2.16	79.97 ± 1.45
Ei	1.22E+03 $\pm 0.49E+02^{bcdefghij}$	442.77 $\pm 29.03^a$	447.24 $\pm 45.07^b$	418.4 $\pm 2.51^c$	362.61 $\pm 33.06^d$	484.76 $\pm 18.39^e$	220.74 $\pm 1.53^f$	473.15 $\pm 8.26^g$	303.24 $\pm 4.18^h$	407.33 $\pm 13.22^i$	423.76 $\pm 10.86^j$
Eo	173.85 ± 21.1	112.18 ± 13.25	90.65 ± 13.34	88.16 ± 0.38	134.25 ± 16.83	93.97 ± 4.09	41.41 ± 0.7	90.72 ± 1.59	67.31 ± 0.31	65.52 ± 0.05	118.75 ± 2.23
F	64.62 ± 2.84	78.0 ± 17.6	147.55 ± 63.54	108.52 ± 0.21	80.61 ± 14.19	60.26 ± 1.63	51.01 ± 1.37	101.91 ± 4.45	50.69 ± 0.13	63.07 ± 1.81	64.8 ± 2.35
H	191.18 ± 5.99	339.59 ± 27.75	291.34 ± 41.68	387.54 ± 12.07	252.21 ± 44.49	210.14 ± 25.47	125.2 ± 1.16	303.78 ± 5.43	255.2 ± 25.75	231.21 ± 13.12	297.92 ± 2.59
Hol	26.65 $\pm 0.0^a$	26.65 $\pm 0.0^b$	36.72 ± 11.65	55.6 $\pm 5.03^{bcdefg}$	34.8 ± 4.81	26.65 $\pm 0.0^c$	26.65 $\pm 0.0^d$	26.65 $\pm 0.0^e$	26.65 $\pm 0.0^f$	26.65 $\pm 0.0^g$	40.68 ± 2.76
Ia	376.24 ± 49.38	882.59 ± 46.36	430.5 ± 51.97	441.84 ± 5.76	458.38 ± 18.66	819.12 ± 24.56	306.15 ± 17.66	481.18 ± 21.5	460.35 ± 6.68	398.96 ± 6.36	895.0 ± 25.39

... Continuación tabla 12.

Li	14.41 ±1.3	9.1 ±1.39	7.61 ±1.4	16.35 ±0.18	7.64 ±0.45	2.94 ±0.0	12.85 ±0.11	13.07 ±3.14	17.27 ±1.57	15.55 ±2.27	16.08 ±0.76
Pac	222.56 ±10.15	356.41 ±52.75	362.73 ±43.99	400.9 ±2.04	375.58 ±55.54	310.86 ±0.47	179.73 ±1.82	281.78 ±5.05	259.19 ±3.38	243.36 ±3.95	474.09 ±11.08
Pal	1.58E+04 ±1.79E+03	3.47E+04 ±0.34E+04	2.62E+04 ±4.00E+03	2.99E+04 ±2.80E+02	2.50E+04 ±3.68E+03	3.39E+04 ±1.70E+03	1.09E+04 ±1.52E+02	2.11E+04 ±6.31E+01	2.01E+04 ±4.96E+02	1.97E+04 ±3.33E+02	3.59E+04 ±1.29E+02

Los valores con la misma letra en la línea son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (95%).

Compuestos volátiles: Alcohol de bencilo (Ba), Butanoato de etilo (Eb), Etil decanoate (Ed), Etil hexanoate (Ehx), Etil laurate (ethyl dodecanoate) (El), Etil octanoate (Eo), Furfural (F), 1-hexanol (H), 3-hexen-1-ol (Hol), Acetato de isoamilo (Ia), Limoneno (Li), 2-fenilacetato (Pac), Alcohol de feniletilo (Pal).

4.4.4 DIFERENCIAS VARIETALES ENTRE LAS MEZCLAS DE LEVADURAS NO SACCHAROMYCES DE PISCO VARIEDAD ITALIA Y NEGRA CRIOLLA

El análisis de componentes principales (ACP) del contenido de compuestos volátiles y atributos sensoriales de los Piscos Italia y Negra Criolla se utilizó para mejorar la comprensión de la información latente reduciendo la complejidad de los datos y descubriendo correlaciones entre algunos componentes y la muestra (puntuaciones) y los compuestos y la muestra examinada (biplot). Así, el score plot mostró que el Pisco Italia (Figura 13), pueden ser diferenciados en el contenido de compuesto volátiles y atributos sensoriales por los dos primeros componentes del ACP realizado sobre datos de vectores de aroma y de diferentes mezclas de levaduras., que explica > 60 %. Permitiendo identificar los vectores de aroma potencialmente responsables de las diferentes mezclas observadas entre las muestras, que reveló diferencias químicas pudiendo ser suficientes para agrupar según la mezcla de levaduras. El carácter con aromas varietales de los Piscos elaborados con mono-inoculos *M. pulcherrima* (I100M0P0N), *P. terrícola* (I0M100P0N), *N. vaughanmartiniae* (I0M0P100N) y la interacción de las 3 NSYS (I33M33P33N), son consistente con niveles más altos de terpenos, especialmente citronerol (C), Linalol (L), Limoneno (Li), Nerol (N), α -terpineol (α T), Geraniol (G), 1-Hexanol (H) y 3-Hexen-1-ol (Hol), la acción de las NSYS en la fermentación ayudo a resaltar y desarrollar estos aromas específicos, brindando una contribución única al carácter sensorial del destilado. La elección de este mono-inoculo, puede ser una estrategia para lograr perfiles aromáticos distintivos y deseables en los destilados de uva “Pisco”. Con respecto a los ésteres etílicos, tienen mayor relevancia hacia los Pisco que no sufrieron inoculación de levaduras, compuestos como butanoato de etilo, Etil decanoato, Etil hexanoato, Etil laurato, Etil octanoato, que son producidos durante el proceso de fermentación. Sin embargo, las que sufren mezcla de levaduras terciarias (I66M16P16N, I16M66P16N I16M16P66N), es el opuesto de las anteriores.

Por otra parte, el score plot mostró que el Pisco Negra Criolla (Figura 14), son diferenciados en el contenido de compuestos volátiles y diferentes mezclas de levaduras, que explica > 63%. Explica la varianza total, y permite diferenciar el Pisco Control con los Pisco que han sido inoculados con las NSYS. Observando el grafico se aprecia que el contenido de alcohol de bencilo (Ba), Furfural (F) y 3-Hexen-1-ol (Hol) son niveles altos en las mezclas binarias (N0V50C50A). Sin embargo, las mezclas mono-inoculadas *V. heimaeyensis* (N100V0C0A); *V.*

carnescens (NOV100C0A); *A. pullulans* (NOV0C100A), aportan compuestos elevados como: acetato de isoamilo (Ia), alcohol de feniletilo (Pal), 1-Hexanol (H), 2-fenilacetato (Pac).

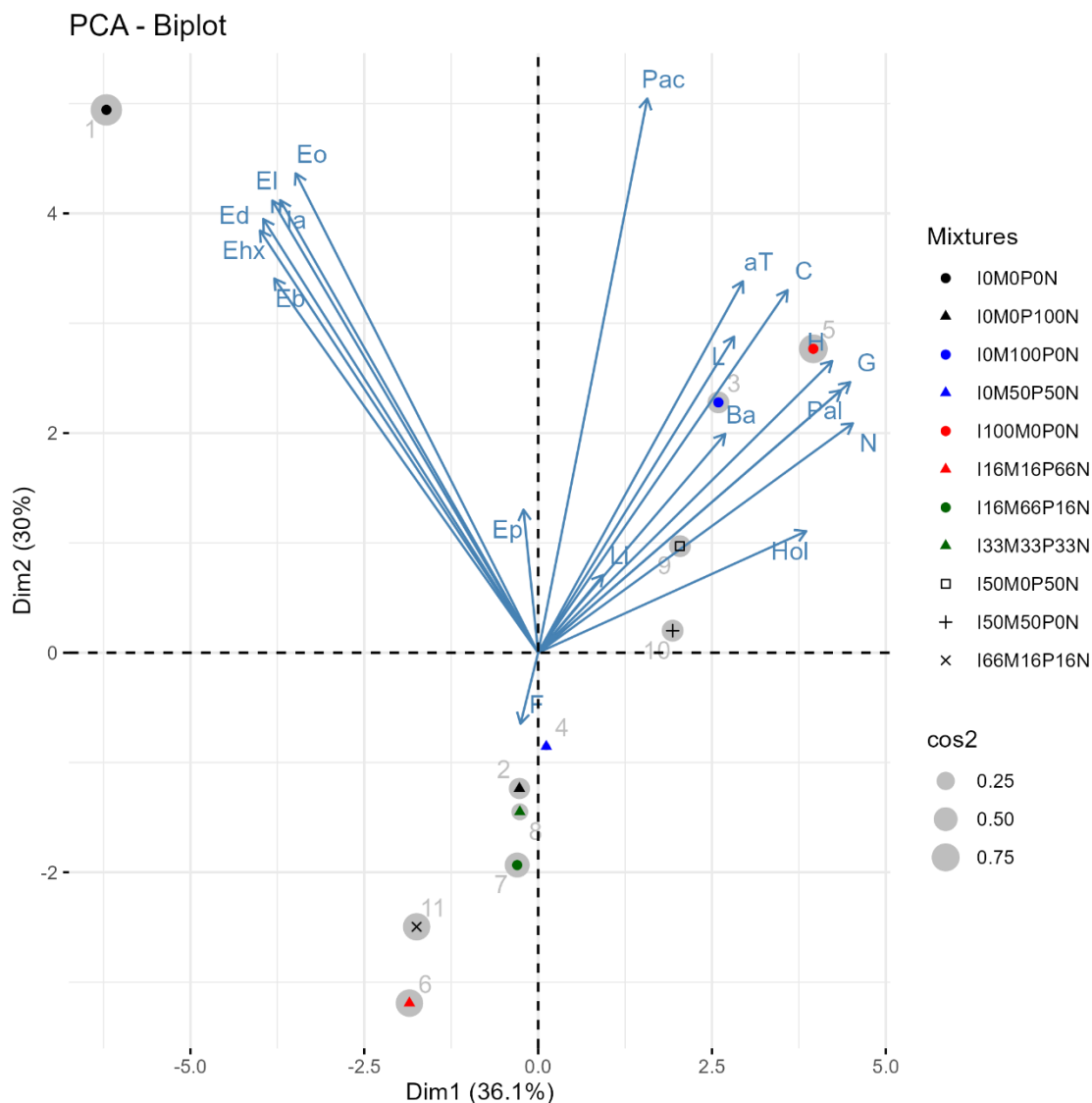


Figura 13. PCA biplot: Pisco Italia. Compuestos Volátiles: Alcohol de bencilo (Ba), Citronelol (C), butanoato de etilo (Eb), Etil decanoato (Ed), Etil hexanoato (Ehx), Etil laurato (ethyl dodecanoate) (EI), Etil octanoato (Eo), Etil pelargonato (Ep), Furfural (F), Geraniol (G), 1-hexanol (H), 3-hexen-1-ol (Hoi), acetato de isoamilo (Ia), Linalol (L), Limoneno (Li), Nerol (N), 2-fenilacetato (Pac), alcohol de feniletilo, α -terpineol (α T).

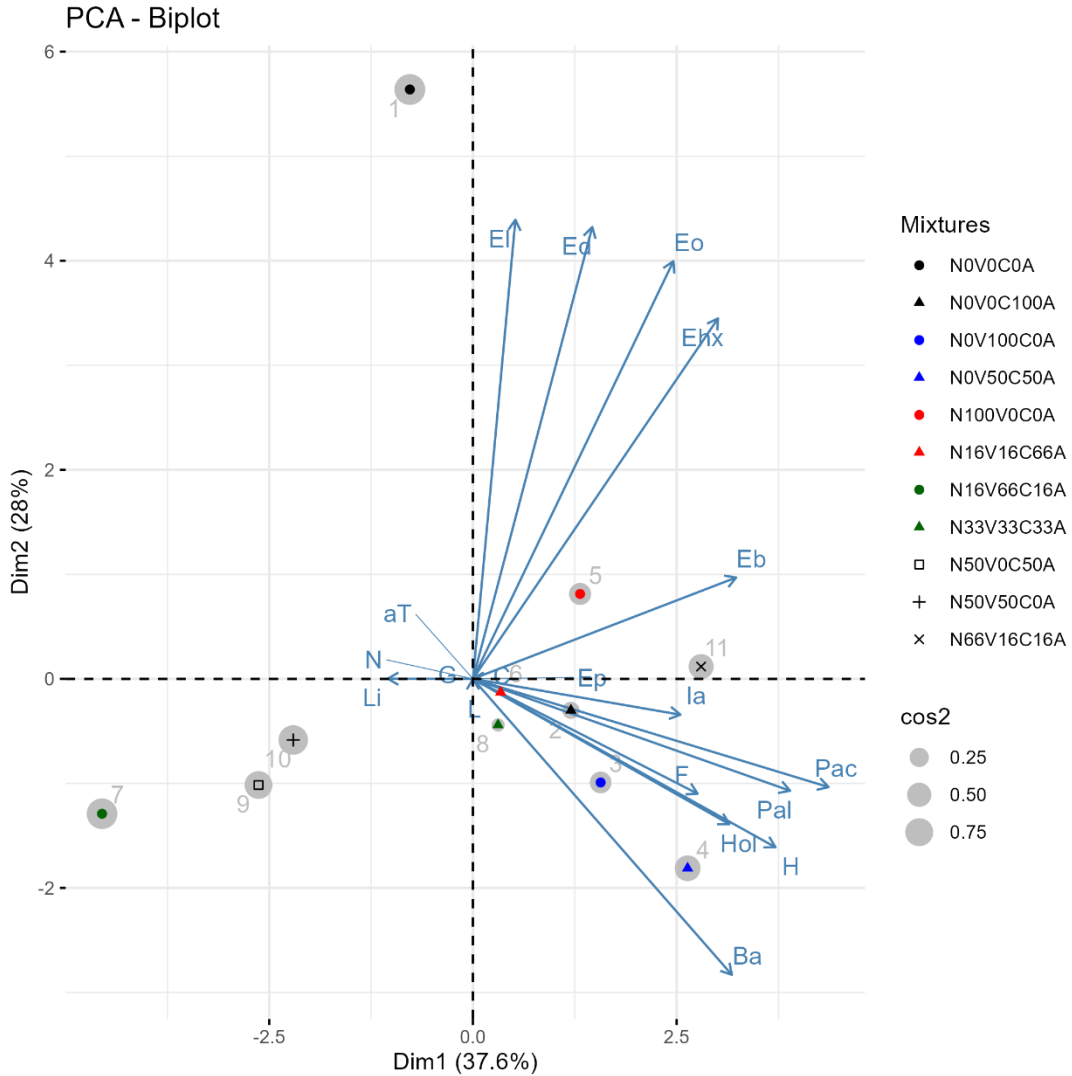


Figura 14. **PCA biplot: Pisco Negra Criolla. Compuestos Volátiles: Alcohol de Bencilo (Ba), butanoato de etilo (Eb), Etil decanoato (Ed), Etil hexanoato (Ehx), Etil laurato (ethyl dodecanoate) (El), Etil octanoato (Eo), Furfural (F), 1-hexanol (H), 3-hexen-1-ol (Hol), acetato de isoamilo (Ia), Limoneno (Li), 2-fenilacetato (Pac), alcohol de feniletilo (Pal).**

4.4.5 ANÁLISIS SENSORIAL

La evaluación sensorial se realizó mediante PCA biplot como se muestra en la Figura 15 y 16. La inoculación con NSYS produjo una influencia compleja en el perfil aromático del Pisco dependiendo del tipo de cepa y su concentración en la inoculación. En cuanto al Pisco Italia, en

la Figura 15, el promedio de los 11 tratamientos (10 inoculaciones y 1 control), mostró un predominio de atributos cítricos (Ci), florales (Fl), frutales (Fr), hierbas (He), frutos secos (Nu), anís (An), alcohol (Al) y almibar (Sy). Siguieron, en menor medida, los atributos verduras cocidas (Cv), mantequilla (Bu), especias (Sp) y aceitoso (Oi).

En cuanto al efecto del tipo de coinoculación, los tratamientos con mono-inoculación mostraron diferencias en el perfil sensorial comparado con el control (sin inoculación) (Figura 15), Por ejemplo, el Pisco I100M0P0N, con *Metschnikowia pulcherrima*, estuvo muy relacionado con el atributo cítrico y menos relacionado con los descriptores vegetales cocidos y aceitoso. Además, el tratamiento I0M0P100N, con *Naganishia vaughanmartinae*, estuvo muy relacionado con el atributo mantequilla y muy poco relacionado con aceitoso, frutos secos y especias. Finalmente, el tratamiento I0M100P0N, con *Pichia terricola*, produjo Piscos muy relacionados con los atributos floral, miel, frutos secos, especias y aceitoso, pero con menores descriptores de hierbas, anís, mantequilla y verdura cocida. Los tratamientos con co-inoculación de varias cepas (mezcla binaria y terciaria), no mostraron diferencias respecto al control (Figura 15), excepto el tratamiento I50M0P50N que estuvo muy relacionado con muchos atributos característicos del Pisco de la variedad Italia (hierbas, cítricos y florales). Además, los atributos mantequilla, anís y vegetales cocidos están fuertemente relacionados con el tratamiento I66M16P16N, pero tienen una relación contraria con los atributos especias y aceitoso. El tratamiento I33M33P33N, a iguales porcentajes de inoculación, al compararlo con la muestra control, fue el único que mostró un bajo puntaje del atributo vegetal cocido, un carácter sensorial indeseable en el Pisco, pero también tienden a tener un bajo puntaje de los atributos anisado y cítrico. Estos resultados demuestran el papel potencial de estas tres cepas NSYS en la calidad sensorial del Pisco de uvas Italia.

En el caso de los Piscos de la variedad de uva Negra Criolla con los diferentes tratamientos de levadura el PCA (figura 16) muestra que el perfil aromático no mostró un predominio específico de los atributos sensoriales dependiendo del tratamiento. Como era de esperar, las puntuaciones medias son inferiores a las del Pisco Italia en los atributos floral, frutal y anisado. Las coinoculaciones mono mostraron diferentes perfiles sensoriales en comparación con el control. Por ejemplo, la muestra N0V0C100A, con *Aureobasidium pullulans*, estuvo muy relacionada con los atributos mantequilla y aceituna, pero fue inferior en todos los demás atributos. En el

caso de N0V100C0A y N100V0C0A, con *Vishniacozyma carnescens* y *Vishniacozyma heimaeyensis* respectivamente, se identificó una correlación significativa entre el Pisco y las notas de anisado, frutos secos y especias. Sin embargo, se encontró una relación mínima con notas de floral, mantequilla y vegetales cocidos. Las co-fermentaciones con dos y tres especies de NSYS tienden a tener un perfil aromático variable en comparación con la muestra de control. Por ejemplo, se observó una mayor presencia de los atributos floral y vegetal cocido en los tratamientos N16V16C66A, N66V16C16A y N33V33C33A. En cuanto al descriptor 'aceituna', este se vinculó principalmente con los tratamientos N50V50C0A y N0V50C50A. Asimismo, los atributos de hierbas, miel y fruta tuvieron una asociación más destacada con el tratamiento N16V66C16A.

De acuerdo a estos resultados, el uso de un inóculo mixto impacta el perfil sensorial del Pisco, lo que podría estar vinculado a las diferencias de compuestos volátiles. El aroma frutal y floral se asocia principalmente a la presencia de terpenos, alcohol feniletilo y ésteres etílicos (Shi et al. 2019b). Esto podría explicar la mayor intensidad de estos atributos en Pisco Italia donde como se mostró anteriormente (tabla 11) se identificó alta concentración de linalol, etil pelargonato, citronerol, nerol, geraniol y α -terpineol, compuestos que no fueron detectados en Pisco Negra Criolla. Sin embargo, el tratamiento específico de coinoculación puede mejorar o reducir cada compuesto aromático. Por ejemplo, en el caso del Pisco Italia, la mono inoculación (I0M100P0N) resultó en un incremento en los niveles de linalol y α -terpineol, como se detalla en la Tabla 11. Sin embargo, al aplicar una tri coinoculación (I33M33P33N), estos compuestos se encontraron en menores cantidades en las muestras, tal como se indica en la misma tabla 11. Este efecto se replicó también en los atributos frutales y florales. En las muestras control de Pisco Italia y Negra Criolla, se notaron atributos positivos que podrían estar relacionados con la presencia de ciertos ésteres etílicos, específicamente el decanoato de etilo y el laurato de etilo. Estos ésteres se encontraron en concentraciones más altas en las muestras control en comparación con aquellas sometidas a tratamientos de co-inoculación. Estos compuestos se han relacionado previamente con descriptores dulces, florales, frutales y aceitoso (Ma et al. 2017; Shi et al. 2019b). En cuanto al atributo hierbas, que es un atributo no deseable en Pisco, ha sido previamente vinculado a 1-hexanol y 3-hexen-1-ol (Ma et al., 2017; Shi et al., 2019b), relación que se observó en Pisco Italia con el tratamiento I100M0P0N e I0M100P0N.

En el caso del Pisco Negra Criolla, se observó una similitud en este atributo en todas las muestras, tanto en aquellas con tratamientos como en las que no los tenían. Esto se alinea con los niveles comparables de 1-hexanol y 3-hexen-1-ol encontrados en todas las muestras, como se detalla en la Tabla 12. Los atributos aceituna y de frutos secos podrían estar relacionados con algunos compuestos como el laurato de etilo, el decanoato de etilo y el alcohol bencílico (Ma et al. 2017; Shi et al. 2019b). No obstante, no existe una relación clara entre el contenido de estos compuestos en los Piscos y los atributos aceituna y de frutos secos.

Considerando el análisis sensorial y composicional, fue posible verificar la relevancia de utilizar diferentes inóculos de levadura en la producción de Pisco. En Pisco Italia, los tratamientos de co-inoculación tienden a tener mayor contenido de terpenos (principalmente linalol, nerol, geraniol, citronerol y α -terpineol) y feniletil alcohol, compuestos asociados a atributos florales, frutales, cítricos y rosa, donde destacan los tratamientos de mono coinoculación I0M100P0N, I100M0P0N e I50M0P50N. En el caso del Pisco Negra Criolla, los tratamientos de coinoculación tienden a producir un mayor contenido de feniletilos (alcohol bencílico, acetato de feniletilo y alcohol feniletílico) y acetato de etilo (acetato de isoamilo), compuestos ligados a los atributos almendrado, floral, rosas, frutal, plátano y dulce, pero no existe un tratamiento específico predominante, sino que dependerá del compuesto o grupo de compuestos objetivo. En cambio, si se busca desarrollar un perfil aromático dominado por ésteres, especialmente decanoato de etilo, octanoato de etilo, hexanoato de etilo, laurato de etilo y acetato de isoamilo, y se desea resaltar atributos como afrutados, florales, dulces, manzana verde, plátano fresco y pera, optar por la producción de Piscos mediante mono inoculación resultaría más efectiva, particularmente para las variedades Italia o Negra Criolla.

Conforme a los resultados, el uso de un inóculo mixto permitió la producción de más ésteres (que aportan el dulce sabor y olor a frutas y flores) y alcoholes superiores (que aportan el sabor y olor a coco y miel y olor a rosas). Además, reduce la cantidad de aldehídos (relacionados con la resaca) y en el contenido de ácido acético que aumenta la acidez (sensación de ardor) (Amorim et al. 2016). El sabor y aroma del Pisco son afrutados y florales, principalmente debido a la presencia de terpenos, ésteres y aldehídos, entre otros, utilizadas en la elaboración del vino y también se producen durante los procesos de fermentación y destilación. Estos sabores y el aroma del Pisco dependen en gran medida de las variedades de uva utilizadas y de las variaciones en los equipos utilizados en los procesos de producción. Es bien sabido que las uvas

aromáticas contienen altas concentraciones de terpenos, aunque los perfiles de terpenos pueden variar de una variedad a otra y también pueden depender de la exposición al sol y las condiciones de cosecha (Gschaedler Mathis et al. 2017). Las mediciones sensoriales precisan tanto del olor (ortonasal) como del aroma (percepción olfativa retronasal) consumen tiempo y recursos. Un procedimiento mejorado de degustación olfativa basado en la comparación de los perfiles de olor y aroma de los aguardientes de Pisco y con el objetivo de predecir el aroma a partir del perfil de olor, acortando así el tiempo de evaluación. La evaluación de la contribución sensorial de cada etapa de producción post-fermentativa de los destilados de la uva Moscatel mediante el uso de marcadores químicos. Los marcadores químicos que eran característicos de la fracción cabeza eran etil hexanoato, etil octanoato y etil decanoato. Los marcadores químicos del cuerpo (corazón) incluían linalol, etil hexanoato, etil octanoato, etil decanoato, 2-feniletanol, lactato de etilo y ácido decanoico. El descriptor mantequilla es por la presencia de diacetilo, el descriptor heno por nerolidol, el descriptor hierba principalmente por 3-hexen-1-ol, los descriptores pera y banana por acetatos de 2- y 3-metilbutilo, el descriptor rosa por acetato de 2-feniletilo y el descriptor lima (citrico) por linalool. Se encontró que la presencia de zonas olfativas descritas por atributos, como afrutado (incluso vegetal), floral y herbal, dependía del tiempo de maduración (Tsakiris et al. 2014).

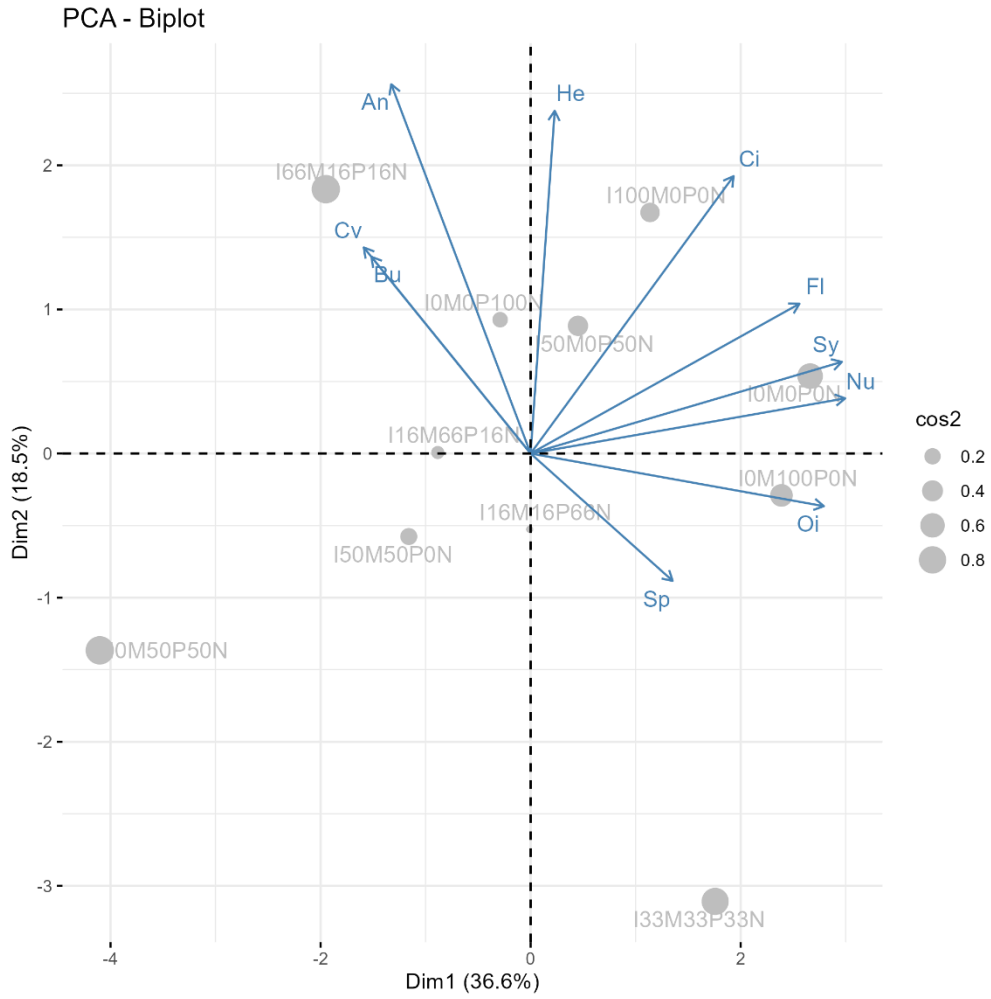


Figura 15. **Biplot de PCA de valores sensoriales Pisco Italia**

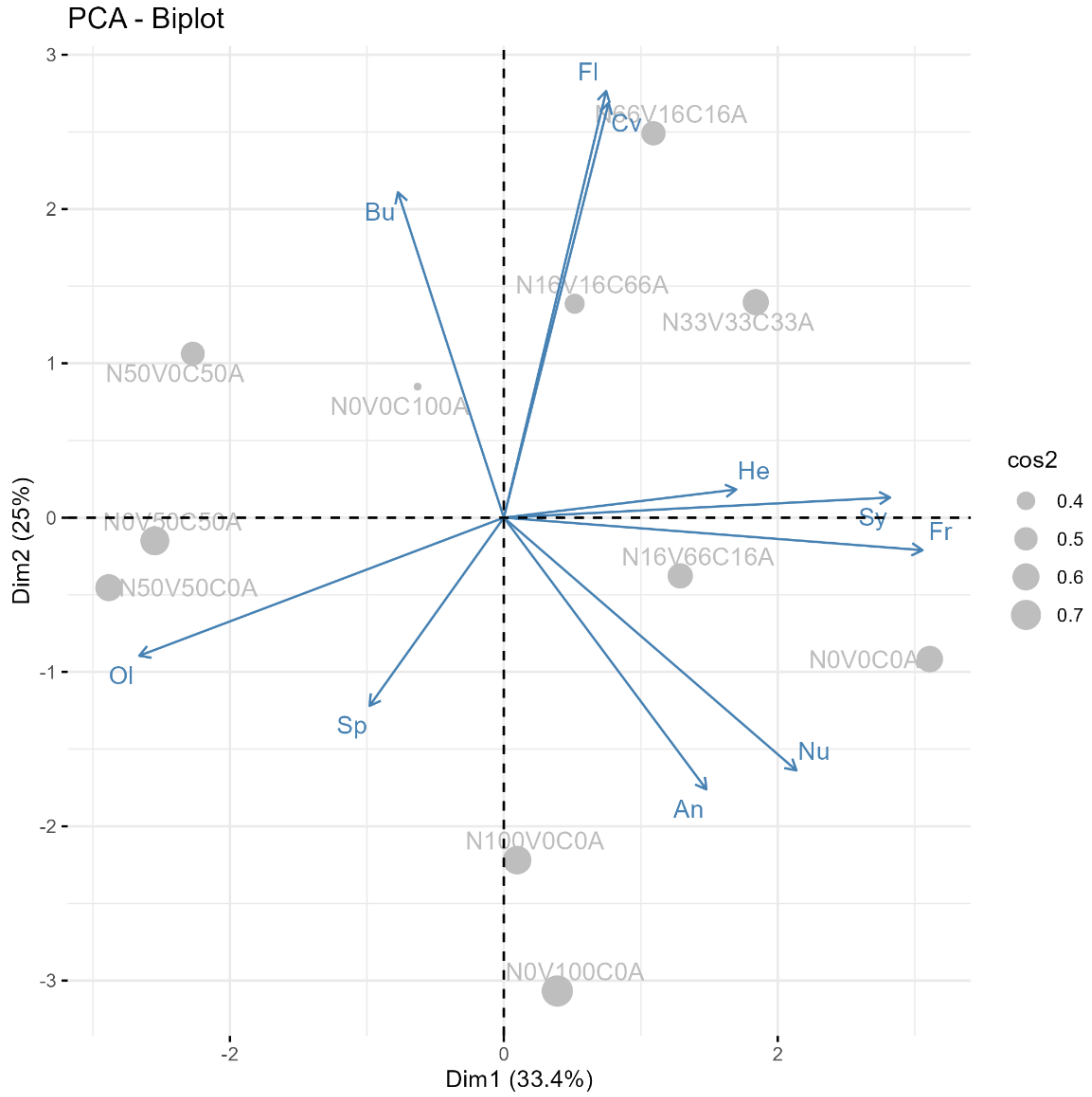


Figura 16. Biplot de PCA de valores sensoriales Pisco Negra Criolla

V. CONCLUSIONES

- 5.1. Las NSYS predominantes aisladas de la piel de la uva Italia *Metschnikowia pulcherrima*; *Pichia terrícola*; *Naganishia vaughanmartiniae*; mientras que las NSYS predominantes aisladas de la piel de la uva Negra Criolla *Vishniacozyma heimaeyensis*; *Vishniacozyma carnescens*; *Aureobasidium pullulans*. Además, las NSYS mostraron diferencias en la caracterización de su fenotipo, incluyendo la fermentación de carbohidratos, la actividad poligalacturonasa, la tolerancia al etanol, la producción de sulfito y el consumo de nitrógeno.
- 5.2. El estudio de GC-MS ha revelado que el perfil aromático Pisco variedad Italia, se caracteriza por sus altas concentraciones de terpenos y algunos ésteres etílicos, con atributos sensoriales a notas cítricas, notas florales y miel. En cambio, el Pisco Variedad Negra Criolla, altas concentraciones de alcohol de feniletilo y 1-hexanol, con ausencias de compuestos terpenicos, con atributos sensoriales a frutos secos.
- 5.3. La utilización estratégica de co-inoculaciones con NSYS, tales como *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia terricola* y *Naganishia vaughanmartiniae*, juega un papel crucial en el desarrollo del perfil aromático del Pisco. Estos procesos no solo modifican las concentraciones de compuestos aromáticos importantes, sino que también moldean los perfiles sensoriales de distintas variedades de Pisco. Las mono-inoculaciones resaltan características específicas de cada variedad, como los aromas florales y frutales en Pisco Italia, mientras que las co-inoculaciones crean aromas más ricos y complejos, enriqueciendo matices como mantequilla en Pisco Negra Criolla. Incluso pequeñas variaciones en los niveles de compuestos aromáticos por co-inoculación pueden influir en la percepción sensorial, evidenciando la relación entre la diversidad de levaduras y los perfiles sensoriales en la elaboración del Pisco. Estos hallazgos subrayan el potencial de seleccionar mezclas de levaduras para mejorar el aroma y sabor del Pisco, marcando una ruta innovadora en la enología.

VI. RECOMENDACIONES

Para continuar con la investigación de esta tesis doctoral se recomienda:

- 6.1. Establecer y analizar una extensa colección de levaduras no *Saccharomyces* de 4 regiones con Denominación de Origen (Lima, Ica, Arequipa y Tacna) de Perú, para descubrir nuevas cepas nativas con rasgos enológicos potencialmente positivos.
- 6.2. Explorar el potencial de la biodiversidad de levaduras autóctonas y realizar pruebas de detección de cepas productoras de β -glucosidasa, actividad xilosidasa, proteolítica y xilanolítica, que han sido asociadas a la composición aromática de los vinos.
- 6.3. Identificar, seleccionar y aislar levaduras nativas procedentes de las variedades Torontel, Moscatel, Albilla, Quebranta, Mollar y Uvina (Lima, Ica, Arequipa, Tacna y Moquegua) implicadas en el perfil aromático del Pisco.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessandria, V; Giacosa, S; Campolongo, S; Rolle, L; Rantsiou, K; Coccolin, L. 2013. Yeast population diversity on grapes during on-vine withering and their dynamics in natural and inoculated fermentations in the production of icewines. *Food Research International* 54(1):139-147. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.018>.

Amorim, JC; Schwan, RF; Duarte, WF. 2016. Sugar cane spirit (cachaça): Effects of mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. *Food Research International* 85:76-83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.014>.

Anderson, MJ; Crist, TO; Chase, JM; Vellend, M; Inouye, BD; Freestone, AL; Sanders, NJ; Cornell, HV; Comita, LS; Davies, KF; Harrison, SP; Kraft, NJB; Stegen, JC; Swenson, NG. 2011. Navigating the multiple meanings of β diversity: a roadmap for the practicing ecologist: Roadmap for beta diversity. *Ecology Letters* 14(1):19-28. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01552.x>.

Andorrà, I; Berradre, M; Mas, A; Esteve-Zarzoso, B; Guillamón, JM. 2012. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT* 49(1):8-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.008>.

Andorrà, I; Berradre, M; Rozès, N; Mas, A; Guillamón, JM; Esteve-Zarzoso, B. 2010. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *European Food Research and Technology* 231(2):215-224. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1272-0>.

Antón-Díaz, MJ; Suárez Valles, B; Mangas-Alonso, JJ; Fernández-García, O; Picinelli-Lobo, A. 2016. Impact of different techniques involving contact with lees on the volatile composition of cider. *Food Chemistry* 190:1116-1122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.018>.

Aplin, JJ; White, KP; Edwards, CG. 2019. Growth and metabolism of non-Saccharomyces yeasts isolated from Washington state vineyards in media and high sugar grape musts. *Food Microbiology* 77:158-165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.004>.

Bagheri, B; Bauer, FF; Setati, ME. 2016. The Diversity and Dynamics of Indigenous Yeast Communities in Grape Must from Vineyards Employing Different Agronomic Practices and their Influence on Wine Fermentation (en línea). *South African Journal of Enology and Viticulture* 36(2). DOI: <https://doi.org/10.21548/36-2-957>.

- Barata, A; Gonzalez, S; Malfeito-Ferreira, M; Querol, A; Loureiro, V. 2008. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research* 8(7):1008-1017. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00399.x>.
- Barata, A; Malfeito-Ferreira, M; Loureiro, V. 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153(3):243-259. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>.
- Barbosa, C; Lage, P; Esteves, M; Chambel, L; Mendes-Faia, A; Mendes-Ferreira, A. 2018. Molecular and Phenotypic Characterization of *Metschnikowia pulcherrima* Strains from Douro Wine Region. *Fermentation* 4(1):8. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation4010008>.
- Belda, I; Conchillo, LB; Ruiz, J; Navascués, E; Marquina, D; Santos, A. 2016. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 223:1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.003>.
- Beltran, G; Rozès, N; Mas, A; Guillamón, JM. 2007. Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(6):809-815. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9302-6>.
- Berg, J; Tom-Petersen, A; Nybroe, O. 2005. Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Letters in Applied Microbiology* 40(2):146-151. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01650.x>.
- Berradre, M; Mazzarri, CA; Mesa, L; Arraiz, N; Prieto, C; Ortega, J; Sulbarán, B; de Rodríguez, GO; Fernández, V; Martínez, J. 2012. Dinámica poblacional de levaduras durante la fermentación espontánea de uva blanca variedad Malvasía. *Rev. Fac. Agron.* .
- Bettenfeld, P; Cadena i Canals, J; Jacquens, L; Fernandez, O; Fontaine, F; van Schaik, E; Courty, P-E; Trouvelot, S. 2022. The microbiota of the grapevine holobiont: A key component of plant health. *Journal of Advanced Research* 40:1-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.008>.
- Bezus, B; De Ovalle, S; González-Pombo, P; Cavalitto, S; Cavello, I. 2023. Production and characterization of a novel cold-active β -glucosidase and its influence on aromatic precursors of Muscat wine. *Food Bioscience* 53:102572. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102572>.
- Bijlani, S; Parker, C; Singh, NK; Sierra, MA; Foux, J; Wang, CCC; Mason, CE; Venkateswaran, K. 2022. Genomic Characterization of the Titan-like Cell Producing *Naganishia tulchinskyi*, the First Novel Eukaryote Isolated from the International Space Station. *Journal of Fungi* 8(2):165. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof8020165>.
- Binati, RL; Lemos Junior, WJF; Luzzini, G; Slaghenaufi, D; Ugliano, M; Torriani, S. 2020. Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 318(December 2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108470>.

Bisson, LF. 1999. Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 50(1):107-119. DOI: <https://doi.org/10.5344/ajev.1999.50.1.107>.

Bokulich, NA; Collins, TS; Masarweh, C; Allen, G; Heymann, H; Ebeler, SE; Mills, DA. 2016. Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics. *mBio* 7(3): e00631-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00631-16>.

Borren, E; Tian, B. 2020. The Important Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to the Aroma Complexity of Wine: A Review. *Foods* 10(1):13. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10010013>.

Bovo, B; Carlot, M; Fontana, F; Lombardi, A; Soligo, S; Giacomini, A; Corich, V. 2015. Outlining a selection procedure for *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape marc to improve fermentation process and distillate quality. *Food Microbiology* 46:573-581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.001>.

Bovo, B; Lombardi, A; Lomolino, G; Lante, A; Giacomini, A. 2014. Exploración del uso de la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* y el aislado natural *Saccharomyces ludwigii* para la fermentación del orujo de uva para mejorar las propiedades sensoriales de las bebidas espirituosas.

Butzke, CE; Evans, TJ; Ebeler, SE. 1998. Detection of Cork Taint in Wine Using Automated Solid-Phase MicroExtraction in Combination with GC/MS-SIM (en línea). s.l., American Chemical Society, vol.714, (ACS Symposium Series, no. 714). p. 208-216 DOI: <https://doi.org/10.1021/bk-1998-0714.ch015>.

Cacho, J; Moncayo, L; Palma, JC; Ferreira, V; Culleré, L. 2012. Characterization of the aromatic profile of the Italia variety of Peruvian Pisco by gas chromatography-olfactometry and gas chromatography coupled with flame ionization and mass spectrometry detection systems. *Food Research International* 49(1):117-125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.065>.

Cacho, J; Moncayo, L; Palma, JC; Ferreira, V; Culleré, L. 2013. The impact of grape variety on the aromatic chemical composition of non-aromatic Peruvian Pisco. *Food Research International* 54(1):373-381. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.019>.

Campo, E; Cacho, J; Ferreira, V. 2007. Solid phase extraction, multidimensional gas chromatography mass spectrometry determination of four novel aroma powerful ethyl esters. *Journal of Chromatography A* 1140(1-2):180-188. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.036>.

Canonico, L; Agarbati, A; Galli, E; Comitini, F; Ciani, M. 2023. *Metschnikowia pulcherrima* as biocontrol agent and wine aroma enhancer in combination with a native *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT* 181:114758. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114758>.

Capece, A; Romaniello, R; Siesto, G; Pietrafesa, R; Massari, C; Poeta, C; Romano, P. 2010. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation

of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 144(1):187-192. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.009>.

Capece, A; Romaniello, R; Siesto, G; Romano, P. 2012. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian “heroic vine-growing area”. *Food Microbiology* 31(2):159-166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.010>.

Capozzi, V; Garofalo, C; Chiriatti, MA; Grieco, F; Spano, G. 2015. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research* 181:75-83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>.

Carr, T; Meilgaard, M; Vance, G. 2007. *Sensory evaluation techniques*. 4 ed. Florida, Estados Unidos, CRC Press. 464 p.

Carneiro, JR; Ferreira, JA; Guido, LF; Almeida, PJ; Rodrigues, JA; Barros, AA. 2006. Determination of β -damascenone in alcoholic beverages by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. *Food Chemistry* 99(1):51-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.024>.

Carpene, M; Fraga-Corral, M; Otero, P; Nogueira, RA; Garcia-Oliveira, P; Prieto, MA; Simal-Gandara, J. 2020. Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile. *Foods* 10(1):51. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10010051>.

Casas-Godoy, L; Arellano-Plaza, M; Kirchmayr, M; Barrera-Martínez, I; Gschaedler-Mathis, A. 2021. Preservation of non- *Saccharomyces* yeasts: Current technologies and challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20(4):3464-3503. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12760>.

Castrillo, D; Blanco, P. 2023. Characterization of Indigenous Non-Saccharomyces Yeast Strains with Potential Use in Winemaking. *Frontiers in Bioscience-Elite* 15(1):1. DOI: <https://doi.org/10.31083/j.fbe1501001>.

Chambers, PJ; Pretorius, IS. 2010. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO reports* 11(12):914-920. DOI: <https://doi.org/10.1038/embor.2010.179>.

Chen, K; Liu, C; Wang, Y; Wang, Z; Li, F; Ma, L; Li, J. 2021. Predominance of indigenous non-Saccharomyces yeasts in the traditional fermentation of greengage wine and their significant contribution to the evolution of terpenes and ethyl esters. *Food Research International* 143:110253. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110253>.

Chen, Y; Jiang, J; Song, Y; Zang, X; Wang, G; Pei, Y; Song, Y; Qin, Y; Liu, Y. 2022. Yeast Diversity during Spontaneous Fermentations and Oenological Characterisation of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* for Potential as Wine Starter Cultures. *Microorganisms* 10(7):1455. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071455>.

Chen, Y; Zhang, W; Yi, H; Wang, B; Xiao, J; Zhou, X; Jiankun, X; Jiang, L; Shi, X. 2020. Microbial community composition and its role in volatile compound formation during the

spontaneous fermentation of ice wine made from Vidal grapes. *Process Biochemistry* 92(August 2019):365-377. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.01.027>.

Ciani, M; Beco, L; Comitini, F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108(2):239-245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012>.

Ciani, M; Capece, A; Comitini, F; Canonico, L; Siesto, G; Romano, P. 2016. Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation (en línea). *Frontiers in Microbiology* 7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>.

Ciani, M; Comitini, F; Mannazzu, I; Domizio, P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non- *Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10(2):123-133. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>.

Ciani, M; Mannazzu, I; Marinangeli, P; Clementi, F; Martini, A. 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 85(2):159-164. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020284.05802.d7>.

Clavijo, A; Calderón, IL; Paneque, P. 2010. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.010>.

Clemente-Jimenez, JM; Mingorance-Cazorla, L; Martínez-Rodríguez, S; Heras-Vázquez, FJL; Rodríguez-Vico, F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21(2):149-155. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00063-7).

Cocolin, L; Heisey, A; Mills, DA. 2001. Direct Identification of the Indigenous Yeasts in Commercial Wine Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 52(1):49-53. DOI: <https://doi.org/10.5344/ajev.2001.52.1.49>.

Comitini, F; Agarbati, A; Canonico, L; Ciani, M. 2021. Yeast Interactions and Molecular Mechanisms in Wine Fermentation: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences* 22(14):7754. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>.

Comitini, F; Capece, A; Ciani, M; Romano, P. 2017. New insights on the use of wine yeasts. *Current Opinion in Food Science* 13:44-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.005>.

Cordero-Bueso, G; Arroyo, T; Serrano, A; Tello, J; Aporta, I; Vélez, MD; Valero, E. 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040>.

Cordero-Bueso, G; Rodríguez, ME; Garrido, C; Cantoral, JM. 2017. Rapid and not culture-dependent assay based on multiplex PCR-SSR analysis for monitoring inoculated yeast strains

in industrial wine fermentations. *Archives of Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1287-4>.

Cortés, S; Fernández, E. 2011. Differentiation of Spanish Alcoholic Drinks, *Orujo*, Obtained from Red and White Grape Pomace Distillation: Volatile Composition. *International Journal of Food Properties* 14(6):1349-1357. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942911003654025>.

Cortés, S; Salgado, JM; Rodríguez, N; Domínguez, JM. 2010. The storage of grape marc: Limiting factor in the quality of the distillate. *Food Control* 21(11):1545-1549. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.029>.

Dahabieh, M; Swanson, J; Kinti, E; Husnik, J. 2015. Hydrogen sul de production by yeast during alcoholic fermentation: mechanisms and mitigation.

De Ovalle, S; Cavello, I; Brena, BM; Cavalitto, S; González-Pombo, P. 2018. Production and characterization of a β -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. *LWT* 87:515-522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.026>.

Delač Salopek, D; Horvat, I; Hranilović, A; Plavša, T; Radeka, S; Pasković, I; Lukić, I. 2022. Diversity of Volatile Aroma Compound Composition Produced by Non-Saccharomyces Yeasts in the Early Phase of Grape Must Fermentation. *Foods* 11(19):3088. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11193088>.

Di Monaco, R; Su, C; Masi, P; Cavella, S. 2014. Temporal Dominance of Sensations: A review. *Trends in Food Science & Technology* 38(2):104-112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.04.007>.

Domizio, P; Romani, C; Lencioni, L; Comitini, F; Gobbi, M; Mannazzu, I; Ciani, M. 2011. Outlining a future for non-Saccharomyces yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 147(3):170-180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>.

Donalies, UEB; Stahl, U. 2002. Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of MET14 and SSU1. *Yeast* 19(6):475-484. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.849>.

Dooley, L; Threlfall, RT; Meullenet, JF. 2012. Optimization of blended wine quality through maximization of consumer liking. *Food Quality and Preference* 24(1):40-47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2011.08.010>.

Egli, CM; Edinger, WD; Mittrakul, CM; Henick-Kling, T. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology* 85(5):779-789. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x>.

Englezos, V; Jolly, NP; Di Gianvito, P; Rantsiou, K; Cocolin, L. 2022. Microbial interactions in winemaking: Ecological aspects and effect on wine quality. *Trends in Food Science & Technology* 127:99-113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.015>.

Epifanio, SIE. 2005. Edita: Universidad de La Rioja Servicio de Publicaciones. s.l., s.e. 237 p.

Etschmann MM, Bluemke W, Sell D, Schrader J. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002 Jun;59(1):1-8. doi: 10.1007/s00253-002-0992-x. Epub 2002 Apr 20. PMID: 12073125 Etschmann., M; W., B; D., S; J., S. 2002.

Falqué, E; Fernández, E; Dubourdieu, D. 2001. Differentiation of white wines by their aromatic index. *Talanta* 54(2):271-281. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00641-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00641-X).

Fernandez-San Millan, A; Farran, I; Larraya, L; Ancin, M; Arregui, LM; Veramendi, J. 2020. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development. *Microbiological Research* 237:126480. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126480>.

Ferrara, G; Panizo, MM; Mazzone, M; Pequeneze, MD; Reviakina, V. 2014. Estudio comparativo entre los sistemas automatizados Vitek YBC® y Microscan Walk Away RYID® con los métodos fenotípicos convencionales para la identificación de levaduras de interés clínico. *Investigación Clínica* 55.

Filho, WV. 2018. Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia (en línea). Disponible en https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=4ytdDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA25&dq=Bebidas+alcoólicas:+ciência+e+tecnologia&ots=duQW-_e1wm&sig=aEdxdaHIAQHNAy2I-hA0k2uitMI.

Fleet, GH. 2003. Wine microbiology and biotechnology (en línea). Disponible en https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=vd_0mtnc10QC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Fleet+1993&ots=IInlqx Buv0&sig=17aMNZBTsU94pPOwBe5U1OqQZNw&redir_esc=y#v=onepage&q=Fleet+1993&f=false%0A.

Fleet, GH. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9).

Fleet, GH. 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>.

Fleet, GH; Prakitchaiwattana, C; Beh, AL; Heard, G. 2002. The yeast ecology of wine grapes. *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts* :1-17.

Francesca, N; Canale, DE; Settanni, L; Moschetti, G. 2012. Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds: Yeasts carried by birds. *Environmental Microbiology Reports* 4(1):105-112. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00310.x>.

Francesca, N; Carvalho, C; Sannino, C; Guerreiro, MA; Almeida, PM; Settanni, L; Massa, B; Sampaio, JP; Moschetti, G. 2014. Yeasts vectored by migratory birds collected in the

Mediterranean island of Ustica and description of *Phaffomyces usticensis* f.a. sp. nov., a new species related to the cactus ecoclade. *FEMS Yeast Research* 14(6):910-921. DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12179>.

Gao, F; Chen, J; Xiao, J; Cheng, W; Zheng, X; Wang, B; Shi, X. 2019. Microbial community composition on grape surface controlled by geographical factors of different wine regions in Xinjiang, China. *Food Research International* 122:348-360. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.029>.

Gardes, M; Bruns, TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2):113-118. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>.

Garrido, A; Linares, T; Cárdenas, L. (2008). Estudio de la composición del Pisco de diferentes variedades de uvas pisqueras desde el mosto hasta el producto (parte ii-el Pisco) (en línea). 11. s.l., s.e. 58-60 p. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4722>.

Garrity, G; Berner, D; Kreig, N; Staley, J. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (en línea). 2nd ed. New York: Springer, s.e. Disponible en https://catoute.unileon.es/discovery/fulldisplay?vid=34BUC_ULE:VU1&search_scope=Cours eReserves&tab=cursos&docid=alma991008013699705772&lang=es&context=L&adaptor=Local Search Engine&query=course_code,contains,0206016,AND&mode=advanced&offset=0.

Gayevskiy, V; Goddard, MR. 2012. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *ISME Journal*. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.195>.

Ge, Q; Guo, C; Zhangb, J; Gou, C; Yue, T. 2022. Contribución de las levaduras no *Saccharomyces* a la producción de compuestos aromáticos activos, composición fenólica y perfil sensorial en el vino de hielo chino Vidal. 30.

Gobbi, A; Acedo, A; Imam, N; Santini, RG; Ortiz-Álvarez, R; Ellegaard-Jensen, L; Belda, I; Hansen, LH. 2022. A global microbiome survey of vineyard soils highlights the microbial dimension of viticultural terroirs. *Communications Biology* 5(1):241. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03202-5>.

Gobbi, M; Comitini, F; Domizio, P; Romani, C; Lencioni, L; Mannazzu, I; Ciani, M. 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology* 33(2):271-281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>.

Gobert, A; Tourdot-Maréchal, R; Morge, C; Sparrow, C; Liu, Y; Quintanilla-Casas, B; Vichi, S; Alexandre, H. 2017. Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Frontiers in Microbiology* 8:2175. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>.

Gobert, A; Tourdot-Maréchal, R; Sparrow, C; Morge, C; Alexandre, H. 2019. Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food Microbiology* 83:71-85. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.008>.

Golomb, BL; Morales, V; Jung, A; Yau, B; Boundy-Mills, KL; Marco, ML. 2013. Effects of pectinolytic yeast on the microbial composition and spoilage of olive fermentations. *Food Microbiology* 33(1):97-106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.004>.

González-Alonso, I; Walker, ME; Vallejo-Pascual, M-E; Naharro-Carrasco, G; Jiranek, V. 2021. Capturing yeast associated with grapes and spontaneous fermentations of the Negro Saurí minority variety from an experimental vineyard near León. *Scientific Reports* 11(1):3748. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83123-1>.

González-Barreiro, C; Rial-Otero, R; Cancho-Grande, B; Simal-Gándara, J. 2015. Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(2):202-218. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.650336>.

Goold, HD; Kroukamp, H; Williams, TC; Paulsen, IT; Varela, C; Pretorius, IS. 2017. Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial Biotechnology* 10(2):264-278. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12488>.

Graf, FMR; Weber, HE; Buchhaupt, M. 2022. Investigation of non- *Saccharomyces* yeasts with intracellular β -glycosidase activity for wine aroma modification. *Journal of Food Science* 87(11):4868-4877. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16355>.

Granados-Sánchez, D; López-Ríos, GF; Hernández-García, MÁ; Sánchez-González, A. 2004. ECOLOGÍA DE LAS PLANTAS EPÍFITAS. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*.

Gschaedler Mathis, AC; Acevedo, F; Aroca, G. 2017. Tequila and Pisco (en línea). s.l., Elsevier. p. 469-486 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00017-0>.

Gutiérrez-Gamboa, G; Zheng, W; Martínez de Toda, F. 2021. Current viticultural techniques to mitigate the effects of global warming on grape and wine quality: A comprehensive review. *Food Research International* 139:109946. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109946>.

Guzzon, R; Gugole, S; Zanzotti, R; Malacarne, M; Larcher, R; von Wallbrunn, C; Mescalchin, E. 2016. Evaluation of the oenological suitability of grapes grown using biodynamic agriculture: The case of a bad vintage. *Journal of Applied Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13004>.

Harrell, C. (2009). Pisco por la razón o la fuerza El debate entre Perú y Chile sobre la denominación de origen del Pisco, y sus implicaciones (en línea). s.l., s.e. Disponible en http://digitalcollections.sit.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1712&context=isp_collection.

Hernandez, JD; Trujillo, YY; DURAN Osorio, DS. 2011. Phenolic potential determination and yeasts identification with significant leavens in Isabella grape (*vitis labrusca*) from Villa del

Rosario (Norte de Santander) FOR WINE MAKING. *Vitae* 18(1):17-25. DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.8773>.

Herraiz, T. 1999. Ethyl 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-b-carboline-3-carboxylate: a novel b-carboline found in alcoholic beverages. *Food Chemistry*.

Hidalgo, Y; Hatta, B; Palma, JC. 2016. Influencia del nivel de fermentación del vino base sobre algunos compuestos volátiles del Pisco peruano de uva italia. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 82(2):128-141. DOI: <https://doi.org/10.37761/rsqp.v82i2.47>.

Hong, M; Li, J; Chen, Y. 2019. Characterization of tolerance and multi-enzyme activities in non- *Saccharomyces* yeasts isolated from Vidal blanc icewine fermentation (en línea). *Journal of Food Biochemistry* 43(11). DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13027>.

Hu, L; Liu, R; Wang, X; Zhang, X. 2020. The Sensory Quality Improvement of Citrus Wine through Co-Fermentations with Selected Non-*Saccharomyces* Yeast Strains and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms* 8(3):323. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030323>.

Hu, L; Wang, J; Ji, X; Liu, R; Chen, F; Zhang, X. 2018. Selection of non-*Saccharomyces* yeasts for orange wine fermentation based on their enological traits and volatile compounds formation. *Journal of Food Science and Technology* 55(10):4001-4012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3325-5>.

Huertas Vallejos, L. 2004. Historia de la producción de vinos y Piscos en el Perú (en línea). scielo.conicyt.cl. Disponible en https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-23762004000200004&script=sci_arttext&tlng=en.

Huson, DH; Auch, AF; Qi, J; Schuster, SC. 2007. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research* 17(3):377-386. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.5969107>.

INDECOPI. 2011. Reglamento de la denominación de Origen Pisco (en línea). s.l., s.e. Disponible en https://www.indecopi.gob.pe/documents/20195/200722/6+Reglamento_DO-PISCO.pdf/a2259836-69e6-4c8c-b403-f8c3c38f7039%0A.

Iso, B. 2004. Sensory analysis - Methodology - Duo-trio test 10399. Geneva, Switzerland, s.e.

James, A; Yao, T; Ke, H; Wang, Y. 2023. Microbiota for production of wine with enhanced functional components. *Food Science and Human Wellness* 12(5):1481-1492. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.02.008>.

Jolly, NP; Varela, C; Pretorius, IS. 2014. Not your ordinary yeast: non- *Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14(2):215-237. DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>.

Jones-Moore, HR; Jelley, RE; Marangon, M; Fedrizzi, B. 2022. The interactions of wine polysaccharides with aroma compounds, tannins, and proteins, and their importance to winemaking. *Food Hydrocolloids* 123:107150. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107150>.

Jost, L. 2007. PARTITIONING DIVERSITY INTO INDEPENDENT ALPHA AND BETA COMPONENTS. *Ecology* 88(10):2427-2439. DOI: <https://doi.org/10.1890/06-1736.1>.

Jung, H; Lee, S-J; Lim, JH; Kim, BK; Park, KJ. 2014. Chemical and sensory profiles of makgeolli, Korean commercial rice wine, from descriptive, chemical, and volatile compound analyses. *Food Chemistry* 152:624-632. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.127>.

Karabegović, I; Malićanin, M; Danilović, B; Stanojević, J; Stamenković Stojanović, S; Nikolić, N; Lazić, M. 2021. Potential of non-Saccharomyces yeast for improving the aroma and sensory profile of Prokupac red wine. *OENO One* 55(2):181-195. DOI: <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.2.3859>.

Keller, M. 2010. Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: A climate change primer for viticulturists. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16(SUPPL. 1):56-69. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00077.x>.

Kim, DH; Hong, YA; Park, HD. 2008. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology Letters* . DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9726-1>.

King, A; Richard Dickinson, J. 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16(6):499-506. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)16:6<499:AID-YEA548>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<499:AID-YEA548>3.0.CO;2-E).

Lacoste, P; Yuri, JA; Aranda, M; Castro, A; Quinteros, K; Solar, M; Soto, N; Gaete, J; Rivas, J. 2010. Variedades de uva en Chile y Argentina (1550-1850): Genealogía del ttorrontés. *Mundo agrario* 10(20):00-00.

Lai, YT; Hsieh, CW; Lo, YC; Liou, BK; Lin, HW; Hou, CY; Cheng, KC. 2022. Isolation and identification of aroma-producing non-Saccharomyces yeast strains and the enological characteristic comparison in wine making. *Lwt* 154:112653. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112653>.

Lappa, IK; Kachrimanidou, V; Pateraki, C; Koulougliotis, D; Eriotou, E; Kopsahelis, N. 2020. Indigenous yeasts: emerging trends and challenges in winemaking. *Current Opinion in Food Science* 32:133-143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.04.004>.

Lawless, HT; Heymann, H. 2010. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices* (en línea). New York, NY, Springer New York, (Food Science Text Series). DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6488-5>.

Lesschaeve, I; Noble, AC. 2022. *Sensory analysis of wine* (en línea). s.l., Elsevier. p. 243-277 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102067-8.00010-5>.

Li, A-H; Yuan, F-X; Groenewald, M; Bensch, K; Yurkov, AM; Li, K; Han, P-J; Guo, L-D; Aime, MC; Sampaio, JP; Jindamorakot, S; Turchetti, B; Inacio, J; Fungsin, B; Wang, Q-M; Bai, F-Y. 2020. Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: Proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species. *Studies in Mycology* 96:17-140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.01.002>.

Li, G; Zhong, Q; Wang, D; Zhang, X; Gao, H; Shen, S. 2015. Determination and formation of Ethyl Carbamate in Chinese spirits. *Food Control* 56:169-176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.029>.

Liang, L; Ma, Y; Jiang, Z; Sam, FE; Peng, S; Li, M; Wang, J. 2023. Dynamic analysis of microbial communities and flavor properties in Merlot wines produced from inoculation and spontaneous fermentation. *Food Research International* 164:112379. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112379>.

Lillo, MPY; Agosin, E; Belancic, A; Latrille, E. 2005. Chemical Markers for Tracking the Sensory Contribution of Production Stages in Muscat Wine Distillates. *Journal of Food Science* 70(7): 432-441. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11488.x>.

Lin, MM-H; Boss, PK; Walker, ME; Sumby, KM; Grbin, PR; Jiranek, V. 2020. Evaluation of indigenous non-Saccharomyces yeasts isolated from a South Australian vineyard for their potential as wine starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 312:108373. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108373>.

López Alfaro, I. 2004. Detección y control por técnicas de la biología molecular de bacterias lácticas autóctonas responsables de la fermentación maloláctica en vinos D.O.Ca Rioja. PhD Thesis. s.l., s.e.

Lorenzini, M; Zapparoli, G. 2019. Yeast-like fungi and yeasts in withered grape carposphere: Characterization of *Aureobasidium pullulans* population and species diversity. *International Journal of Food Microbiology* 289:223-230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.023>.

Loureiro, V. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86(1-2):23-50. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0).

Lukić, I; Banović, M; Peršurić, Đ; Radeka, S; Sladonja, B. 2006. Determination of volatile compounds in grape distillates by solid-phase extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1101(1-2):238-244. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.057>.

Ma, D; Yan, X; Wang, Q; Zhang, Y; Tao, Y. 2017. Performance of selected *P. fermentans* and its extracellular enzyme in co-inoculation with *S. cerevisiae* for wine aroma enhancement. *LWT* 86:361-370. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.018>.

Magurran, AE. 2021. Measuring biological diversity. *Current Biology* 31(19): R1174-R1177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.049>.

Magyar, I; Nyitrai-Sárdy, D; Leskó, A; Pomázi, A; Kállay, M. 2014. Anaerobic organic acid metabolism of *Candida zemplinina* in comparison with *Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 178:1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.002>.

Marcon, AR; Schwarz, LV; Dutra, SV; Moura, S; Agostini, F; Delamare, APL; Echeverrigaray, S. 2018. Contribution of a Brazilian *Torulaspora delbrueckii* isolate and a commercial *Saccharomyces cerevisiae* to the aroma profile and sensory characteristics of Moscato Branco wines: White Moscato wines made from different yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 24(4):461-468. DOI: <https://doi.org/10.1111/ajgw.12347>.

Martínez-Avila, O; Sánchez, A; Font, X; Barrena, R. 2020. 2-phenylethanol (rose aroma) production potential of an isolated *Pichia kudriavzevii* through solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 93:94-103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.023>.

Martini, A. 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research* 4(3):165-176. DOI: <https://doi.org/10.1080/09571269308717966>.

Martins, V; Costa, L; Soares, R; Ayogu, P; Teixeira, A; Gerós, H. 2022. A catalogue of cultivable yeasts from the microbiota of grape berries cv. Vinhão and Loureiro. *OENO One* 56(3):247-260. DOI: <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.3.5462>.

Maturano, YP; Assof, M; Fabani, MP; Nally, MC; Jofré, V; Rodríguez Assaf, LA; Toro, ME; Castellanos De Figueroa, LI; Vazquez, F. 2015. Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie van Leeuwenhoek* 108(5):1239-1256. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0578-0>.

Medinsky, MA; Dorman, DC. 1995. Recent developments in methanol toxicity. *Toxicology Letters* 82-83:707-711. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03515-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03515-X).

Merín, MG; Martín, MC; Rantsiou, K; Cocolin, L; De Ambrosini, VIM. 2015. Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(3):815-823. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140160>.

Merín, MG; Mendoza, LM; Farías, ME; Morata De Ambrosini, VI. 2011. Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. *International Journal of Food Microbiology* 147(2):144-148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.004>.

Merín, MG; Morata De Ambrosini, VI. 2018. Kinetic and metabolic behaviour of the pectinolytic strain *Aureobasidium pullulans* GM-R-22 during pre-fermentative cold maceration and its effect on red wine quality. *International Journal of Food Microbiology* 285:18-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.003>.

Milanović, V; Comitini, F; Ciani, M. 2013. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.019>.

Moreira, N; Mendes, F; Hogg, T; Vasconcelos, I. 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 103(3):285-294. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.029>.

Mortimer, R; Polsinelli, M. 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80036-9).

Mukhopadhyay, S; Majumdar, GC; Goswami, TK; Mishra, HN. 2013. Fuzzy logic (similarity analysis) approach for sensory evaluation of chhana podo. *LWT - Food Science and Technology* 53(1):204-210. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.013>.

Nadai, C; Vendramini, C; Carlot, M; Andrighetto, C; Giacomini, A; Corich, V. 2019. Dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Vine Bark in Vineyard: Influence of Plant Age and Strain Presence during Grape must Spontaneous Fermentations. *Fermentation* 5(3):62. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation5030062>.

Nascimento, RF; Marques, JC; Lima Neto, BS; De Keukeleire, D; Franco, DW. 1997. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A* 782(1):13-23. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00425-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00425-1).

Navarrete-Bolaños, JL. 2012. Improving traditional fermented beverages: How to evolve from spontaneous to directed fermentation: Guidelines to design efficient directed fermentations based on spontaneous fermentations. *Engineering in Life Sciences* 12(4):410-418. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201100128>.

Neira, DAP. 2011. Cambios composicionales de la baya durante el proceso de maduración y su importancia en la calidad de la uva y el vino.

Nieto-Sarabia, VL; Ballinas-Cesatti, CB; Melgar-Lalanne, G; Cristiani-Urbina, E; Morales-Barrera, L. 2022. Isolation, identification, and kinetic and thermodynamic characterization of a *Pichia kudriavzevii* yeast strain capable of fermentation. *Food and Bioproducts Processing* 131:109-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.10.013>.

Nisiotou, AA; Rantsiou, K; Iliopoulos, V; Cocolin, L; Nychas, G-JE. 2011. Bacterial species associated with sound and Botrytis-infected grapes from a Greek vineyard. *International Journal of Food Microbiology* 145(2-3):432-436. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.017>.

Oliva, J; Girón, F; Cayuela, JM; Mulero, J; Zafrilla, P; Cámara, MÁ. 2020. Effect of fungicides on the yeast population during spontaneous fermentation in the vinification of monastrell grapes. *Lwt* 131(May). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109816>.

Onetto, CA; Borneman, AR; Schmidt, SA. 2020. Investigating the effects of *Aureobasidium pullulans* on grape juice composition and fermentation. *Food Microbiology* 90:103451. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103451>.

Osorio, D; Pérez-Correa, R; Belancic, A; Agosin, E. 2004. Rigorous dynamic modeling and simulation of wine distillations. *Food Control* 15(7):515-521. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.08.003>.

Özdoğan, G; Lin, X; Sun, D-W. 2021. Rapid and noninvasive sensory analyses of food products by hyperspectral imaging: Recent application developments. *Trends in Food Science & Technology* 111:151-165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.044>.

Padilla, B; Gil, JV; Manzanares, P. 2016. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity (en línea). *Frontiers in Microbiology* 7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>.

Paiola, A; Assandri, G; Brambilla, M; Zottini, M; Pedrini, P; Nascimbene, J. 2020. Exploring the potential of vineyards for biodiversity conservation and delivery of biodiversity-mediated ecosystem services: A global-scale systematic review. *Science of The Total Environment* 706:135839. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135839>.

Panosyan, AG; Mamikonyan, GV; Torosyan, M; Gabrielyan, ES; Mkhitarian, SA; Tirakyan, MR; Ovanesyan, A. 2001. Determination of the Composition of Volatiles in Cognac (Brandy) by Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry. 56(10).

Paup, VD; Barton, TL; Edwards, CG; Lange, I; Lange, BM; Lee, J; Ross, CF. 2022. Improving the chemical and sensory characteristics of red and white wines with pectinase-producing non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science* 87(12):5402-5417. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16371>.

Peña-Gallego, A; Hernández-Orte, P; Cacho, J; Ferreira, V. 2012. S-Cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review. *Food Chemistry* 131(1):1-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.079>.

Perpetuini, G; Rossetti, AP; Battistelli, N; Zulli, C; Cichelli, A; Arfelli, G; Tofalo, R. 2022. Impact of vineyard management on grape fungal community and Montepulciano d'Abruzzo wine quality. *Food Research International* 158:111577. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111577>.

Pina, C; Santos, C; Couto, JA; Hogg, T. 2004. Ethanol tolerance of five non-Saccharomyces wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiology* 21(4):439-447. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.009>.

Prakitchaiwattana, C; Fleet, G; Heard, G. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4(8):865-877. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.05.004>.

Pretorius, IS. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16(8):675-729. DOI: <https://doi.org/10.1002/1097-0061>.

Pretorius; Van der Westhuizen, T.J.; Augustyn, O. P. H. 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*.

Querol, A; Barrio, E; Ramón, D. 1992. A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 15(3):439-446. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5).

Rabitti, NS; Cattaneo, C; Appiani, M; Proserpio, C; Laureati, M. 2022. Describing the Sensory Complexity of Italian Wines: Application of the Rate-All-That-Apply (RATA) Method. *Foods* 11(16). DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11162417>.

Rainieri, S; Pretorius, IS. 2000. Selection and improvement of wine yeasts.

Ramírez, M; López-Piñeiro, A; Velázquez, R; Muñoz, A; Regodón, JA. 2020. Analysing the vineyard soil as a natural reservoir for wine yeasts. *Food Research International* 129:108845. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108845>.

Rodrigues, F; Ludovico, P; Leão, C. 2006. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism (en línea). In *Péter, G; Rosa, C (eds.)*. Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag, (The Yeast Handbook). p. 101-121 DOI: https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_6.

Romero, P; Navarro, JM; Ordaz, PB. 2022. Towards a sustainable viticulture: The combination of deficit irrigation strategies and agroecological practices in Mediterranean vineyards. A review and update. *Agricultural Water Management* 259:107216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107216>.

Rosslenbroich, H-J; Stuebler, D. 2000. Botrytis cinerea — history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19(8-10):557-561. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00072-7).

Sabate, J; Cano, J; Esteve-Zarzoso, B; Guillamón, JM. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research* 157(4):267-274. DOI: <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00163>.

Saerens, SMG; Delvaux, FR; Verstrepen, KJ; Thevelein, JM. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*: Production and biological function of volatile esters in yeast. *Microbial Biotechnology* 3(2):165-177. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>.

Santos, C; Fraga, ME; Kozakiewicz, Z; Lima, N. 2010. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology* 161(2):168-175. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.007>.

Scansani, S; Van Wyk, N; Nader, KB; Beisert, B; Brezina, S; Fritsch, S; Semmler, H; Pasch, L; Pretorius, IS; Von Wallbrunn, C; Schnell, S; Rauhut, D. 2022. The film-forming *Pichia* spp. in a winemaker's toolbox: A simple isolation procedure and their performance in a mixed-culture fermentation of *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer must. *International Journal of Food Microbiology* 365:109549. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109549>.

Schmidt, B; Hildebrandt, A. 2017. Next-generation sequencing: big data meets high performance computing. *Drug Discovery Today* 22(4):712-717. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.014>.

Schuller, D; Alves, H; Dequin, S; Casal, M. 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.003>.

Shi, WK; Wang, J; Chen, FS; Zhang, XY. 2019. Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Lwt* 116(February):108477. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108477>.

Shi, X; Chen, Y; Xiao, J; Li, D; Wang, B. 2020. Effects of harvest dates on microbial communities of ice grape skins from Xinjiang of China. *Process Biochemistry* 98:202-210. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.002>.

Šipiczki, M; Ciani, M; Csoma, H. 2005. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* DBVPG 3827. *Folia Microbiologica* 50(6):494-498. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02931436>.

Stefanini, I; Dapporto, L; Legras, J-L; Calabretta, A; Di Paola, M; De Filippo, C; Viola, R; Capretti, P; Polsinelli, M; Turillazzi, S; Cavalieri, D. 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(33):13398-13403. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1208362109>.

Sturm, ME; Arroyo-López, FN; Garrido-Fernández, A; Querol, A; Mercado, LA; Ramirez, ML; Combina, M. 2014. Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a dummy variable. *International Journal of Food Microbiology* 170:83-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.019>.

Styger, G; Prior, B; Bauer, FF. 2011. Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38(9):1145-1159. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>.

Suárez-Lepe, JA; Morata, A. 2012. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science and Technology* 23(1):39-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.005>.

Sullivan, JJ; Hollingworth, TA; Wekell, MM; Newton, RT; Larose, JE. 1986. Determination of Sulfite in Food by Flow Injection Analysis. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 69(3):542-546. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/69.3.542>.

Sun, Y; Liu, Y. 2014. Investigating of yeast species in wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism method. *Food Microbiology* 38:201-207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.001>.

Szambelan, K; Nowak, J; Szwengiel, A; Jeleń, H. 2020. Quantitative and qualitative analysis of volatile compounds in sorghum distillates obtained under various hydrolysis and fermentation conditions. *Industrial Crops and Products* 155:112782. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112782>.

Tofalo, R; Schirone, M; Telera, GC; Manetta, AC; Corsetti, A; Suzzi, G. 2011. Influence of organic viticulture on non-Saccharomyces wine yeast populations. *Annals of Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0102-8>.

Tournas, V; Koch, HA; Bandler, R. 2001. *Bacteriological Analytical Manual Chapter 18 Yeasts, Molds and Mycotoxins*.

Torrico, DD; Mehta, A; Borssato, AB. 2023. New methods to assess sensory responses: a brief review of innovative techniques in sensory evaluation. *Current Opinion in Food Science* 49:100978. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100978>.

Trigo-Córdoba, E; Bouzas-Cid, Y; Orriols-Fernández, I; Díaz-Losada, E; Mirás-Avalos, JM. 2015. Influence of cover crop treatments on the performance of a vineyard in a humid region. *Spanish Journal of Agricultural Research* 13(4): e0907. DOI: <https://doi.org/10.5424/sjar/2015134-8265>.

Tsakiris, A; Kallithraka, S; Kourkoutas, Y. 2014. Grape brandy production, composition and sensory evaluation: Grape brandy production, composition and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(3):404-414. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6377>.

Úbeda, J; Maldonado Gil, M; Chiva, R; Guillamón, JM; Briones, A. 2014. Biodiversity of non-Saccharomyces yeasts in distilleries of the La Mancha region (Spain). *FEMS Yeast Research* 14(4):663-673. DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12152>.

Vásquez, JA; Ramirez Castrillón, M; Monsalve F, ZI. 2016. Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530>.

Vaudano, E; Quintero, G; Costantini, A; Pulcini, L; Pessione, E; Garcia-Moruno, E. 2019. Yeast distribution in Grignolino grapes growing in a new vineyard in Piedmont and the technological characterization of indigenous Saccharomyces spp. strains. *International Journal of Food Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.016>.

Viana, F; Gil, J; Genoves, S; Valles, S; Manzanares, P. 2008. Rational selection of non-Saccharomyces wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25(6):778-785. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.015>.

Vicente, J; Ruiz, J; Tomasi, S; De Celis, M; Ruiz-de-Villa, C; Gombau, J; Rozès, N; Zamora, F; Santos, A; Marquina, D; Belda, I. 2023. Impact of rare yeasts in Saccharomyces cerevisiae

wine fermentation performance: Population prevalence and growth phenotype of *Cyberlindnera fabianii*, *Kazachstania unispora*, and *Naganishia globosa*. *Food Microbiology* 110:104189. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104189>.

Vilanova, M; Cortés, S; Santiago, JL; Martínez, C; Fernández, E. 2008. Contribution of some grape-derived aromatic compounds to the primary aroma in red wines from cv. Caiño Tinto, cv. Caiño Bravo and cv. Caiño Longo grapes. *The Journal of Agricultural Science* 146(3):325-332. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859607007022>.

Vilela, A. 2020. Modulating Wine Pleasantness Throughout Wine-Yeast Co-Inoculation or Sequential Inoculation. *Fermentation* 6(1):22. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation6010022>.

Wang, R; Sun, J; Lassabliere, B; Yu, B; Liu, SQ. 2020. Fermentation characteristics of four non-*Saccharomyces* yeasts in green tea slurry. *Food Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103609>.

Wang, X; Schlatter, DC; Glawe, DA; Edwards, CG; Weller, DM; Paulitz, TC; Abatzoglou, JT; Okubara, PA. 2021. Native yeast and non-yeast fungal communities of Cabernet Sauvignon berries from two Washington State vineyards, and persistence in spontaneous fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 350:109225. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109225>.

Watanabe, D; Hashimoto, W. (2021). Accelerated Alcoholic Fermentation of Intact Grapes by *Saccharomyces Cerevisiae* in Symbiosis with Microbial Community Inhabiting Grape-skin (en línea). s.l., In Review. (preprint) DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-916454/v1>.

Wei, Y; Wu, Y; Yan, Y; Zou, W; Xue, J; Ma, W; Wang, W; Tian, G; Wang, L. 2018. High-throughput sequencing of microbial community diversity in soil, grapes, leaves, grape juice and wine of grapevine from China. *PLOS ONE* 13(3): e0193097. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193097>.

Williams, C; Buica, A. 2020. Comparison of an Offline SPE–GC–MS and Online HS–SPME–GC–MS Method for the Analysis of Volatile Terpenoids in Wine. *Molecules* 25(3):657. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25030657>.

Windholtz, S; Redon, P; Lacampagne, S; Farris, L; Lytra, G; Cameleyre, M; Barbe, J-C; Coulon, J; Thibon, C; Masneuf-Pomarède, I. 2021. Non-*Saccharomyces* yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide. *LWT* 149:111781. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111781>.

Xu, W; Jian, Z; Kong, X. 2021. RNA-seq-based transcriptomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous and inoculated fermentations of organic and conventional grapes. *LWT* 143:111183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111183>.

Yalage Don, SM; Schmidtke, LM; Gambetta, JM; Steel, CC. 2021. Volatile organic compounds produced by *Aureobasidium pullulans* induce electrolyte loss and oxidative stress in *Botrytis*

cinerea and *Alternaria alternata*. *Research in Microbiology* 172(1):103788. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.10.003>.

Yin, X; Li, J; Shin, H; Du, G; Liu, L; Chen, J. 2015. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects. *Biotechnology Advances* 33(6):830-841. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.006>.

Yuan, X; Zhou, J; Zhang, B; Shen, C; Yu, L; Gong, C; Xu, Y; Tang, K. 2023. Identification, quantitation and organoleptic contributions of furan compounds in brandy. *Food Chemistry* 412:135543. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135543>.

Zhang, P; Zhang, R; Sirisena, S; Gan, R; Fang, Z. 2021. Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiology* 100:103859. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103859>.

Zhang, S; Chen, X; Zhong, Q; Huang, Z; Bai, Z. 2017. Relations among epiphytic microbial communities from soil, leaves and grapes of the grapevine. *Frontiers in Life Science* 10(1):73-83. DOI: <https://doi.org/10.1080/21553769.2017.1365776>.

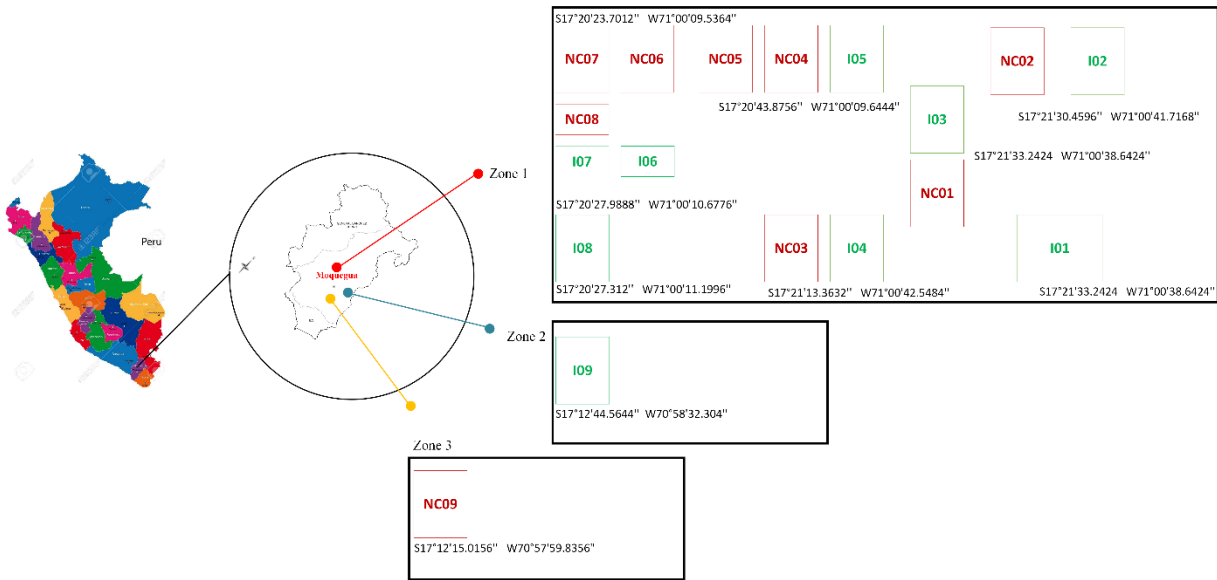
Zhao; Jiming Li; Yan Xu; Wenlai Fan; Wenguang Jiang. 2009. Characterization of Aroma Compounds of Four Brandies by Aroma Extract Dilution Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 60(3):269. DOI: <https://doi.org/10.5344/ajev.2009.60.3.269>.

Zott, K; Claisse, O; Lucas, P; Coulon, J; Lonvaud-Funel, A; Masneuf-Pomarede, I. 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.01.006>.

Zott, K; Thibon, C; Bely, M; Lonvaud-Funel, A; Dubourdieu, D; Masneuf-Pomarede, I. 2011. The grape must non-Saccharomyces microbial community: Impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology* 151(2):210-215. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026>.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Zonas situadas en el valle de Moquegua con denominación de origen



ANEXO 2. Patrones para la calibración de compuestos volátiles

Compuestos volátiles	CAS	Pureza
1-hexanol	111-27-3	98%, GC
2-feniletanol	60-12-8	≥99% GC
2-octanol (PI)	4128-31-8	97.8%, gc
2-fenilacetato	103-45-7	≥99%, gc
3-hexen-1-ol	928-96-1	≥98%FCC, FG
4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone (PI)	123-42-2	99%, GC
Alfa terpineol	10482-56-1	≥98%, GC
Alcohol de bencilo	100-51-6	≥99%, GC
Citroneol	106-22-9	90-95%, GC
Damascona (PI)	23696-85-7	1.1-1.4wt. % (190 proof ethanol), FG
Etil acetato	141-78-6	≥99%, FCC, FG
Butanoato de etilo	105-54-4	99%, GC
Etil cinnamato	103-36-6	≥98%, FCC, FG
Etil decanoato	110-38-3	≥98%, gc
Etil heptanoato	106-30-9	≥96%, GC
Etil laurato	106-33-2	≥98%, GC
Etil octanoato	106-32-1	≥98%FCC, FG
Etil pelargonato	123-29-5	≥90%, GC
Ethyl valerato	539-82-2	≥98%, FG
Furfural	98-01-1	≥99%, GC
Geraniol	106-24-1	≥97%, FCC, FG
Guaiacol	90-05-1	≥99%, FG
Etil hexanoato	123-66-0	≥98%FCC, FG
Isoamyl acetato	123-92-2	natural, ≥97%, FCC, FG
Limoneno	5989-54-8	≥95%, FG
Linalool	78-70-6	≥97%, FCC, FG
Nerol	106-25-2	≥90%, GC

CAS: (Chemical Abstracts Service)