

APLICACIÓN DE LA LEVADURA *HANSENIASPORA VINEAE* EN CULTIVOS MIXTOS CON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN LA VINIFICACIÓN

Karina MEDINA¹, Laura FERRERI¹, Laura FARIÑA¹, Eduardo BOIDO¹, Eduardo DELLACASSA², Carina GAGGERO³, Francisco M. CARRAU¹

¹ Sección Enología, Facultad de Química, Universidad de la República

² Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de la República.

³ Dpto Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

RESUMEN

Las levaduras juegan un papel fundamental en la transformación del jugo de uva en vino resaltando principalmente la expresión de los aromas de las variedades utilizadas y aportando aromas de fermentación que pueden enriquecer y resaltar el vino obtenido en concentración y complejidad sensorial. Este trabajo propone la aplicación de nuevas cepas no-Saccharomyces (no-Sac) nativas, aisladas en Uruguay, como pretratamiento de uvas tintas previo a la inoculación de una cepa comercial, con el objetivo de enriquecer con mayor complejidad aromática vinos de alta gama.

Con este objetivo, se realizaron aislamientos de cepas nativas de diferentes uvas y mostos tintos. Como método de selección se evaluó la capacidad fermentativa y el aporte aromático de cada cepa en medios de bajo nitrógeno (menos de 150mgN/L). El resultado de esta selección fue la elección de 4 cepas no-Sac que presentaban además de buenas condiciones de vinificación, ausencia de defectos aromáticos pero con un aporte destacable sobre las características sensoriales. Estas cepas fueron evaluadas en cultivos mixtos con una cepa comercial de Saccharomyces (L254) para simular las condiciones de fermentación a nivel de bodega. Las fermentaciones fueron analizadas por GC-MS para caracterizar las cepas utilizadas en cultivos mixtos en comparación con la cepa Saccharomyces pura. Finalmente se seleccionó una cepa no-Sac (02/5A) como la más propicia para realizar un escalado a nivel industrial que fue clasificada como *Hanseniaspora vineae* por análisis del ADN ribosomal en las regiones D1/D2. El secado a nivel piloto de la cepa y su aplicación a nivel de bodega fueron considerados óptimos en cuanto a su viabilidad celular al momento de la inoculación. La aplicación de levaduras de este tipo asegura el desarrollo de fermentaciones con mayor biodiversidad sin riesgos de la aparición de vinos con defectos, uno de los objetivos de la Enología de Mínima Intervención (EMI).

Palabras Clave: *Hanseniaspora Vineae*, Cultivos Mixtos, Fermentación, Aromas.

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El aroma de un vino es una mezcla de gran complejidad debida a que su origen es el resultado de una larga secuencia biológica, bioquímica y tecnológica, y al elevado número de componentes volátiles que están involucrados (más de 500) en concentraciones que varían desde algunos ng/L hasta centenas de µg/L, y en algunos casos hasta mg/L según datos analizados en los últimos años (Boido et al., 2003; Carrau, 2003; Versini et al., 1999).

Debido a la importancia que tienen los aromas en los vinos, en este trabajo se trató de investigar cuál es el efecto de la acción de la flora indígena presente en el fruto sobre los aromas varietales del vino. Paradójicamente existe una gran



biodiversidad de cepas de levaduras nativas presentes en las uvas y en la bodega, mientras que a nivel industrial existe una muy limitada cantidad de cepas de levaduras comerciales para su aplicación por el Enólogo (Carrau 2005). En este momento se considera que esta situación es una debilidad de la Enología, dado que uniformiza o limita la diversidad de vinos con identidad propia al utilizarse las mismas cepas comerciales en diferentes regiones del mundo (Medina et al., 2007; Medina et al., 2005). Por otra parte, esta situación también ocurre como consecuencia de que para el Enólogo es más fácil trabajar con la inoculación de levaduras comerciales que intentar dominar la fermentación espontánea a nivel industrial.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cultivos mixtos entre cepas no-Sac y *Saccharomyces*, adicionadas secuencialmente, sobre los aromas y la mejora de la calidad del producto final. Se plantea dar una visión sobre el gran potencial que existe en la flora nativa presente en los viñedos, y como con métodos de selección racionales se logra obtener cepas compatibles con las cepas comerciales de *Saccharomyces*. Se discute el potencial de la multiplicación comercial de estas cepas, la obtención de las primeras levaduras secas de uso industrial con alta viabilidad en esta especie no-*Saccharomyces*, *Hanseniaspora vineae*, lo que permitirá acceder al enólogo a nuevas levaduras para incrementar la complejidad aromática de los vinos de alta gama.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de cepas No-Sac

Los aislamientos de levaduras se realizaron a partir de mostos de Tannat de la vendimia 2006, donde se evaluó el grado alcohólico potencial, acidez total y pH de acuerdo a las técnicas de Zoecklein (1995). Las fermentaciones espontáneas se llevaron a cabo a 25 oC, con una agitación diaria. Cada 24 horas se realizaron determinaciones de densidad y temperatura como forma de control y de seguimiento de la fermentación alcohólica.

Los aislamientos microbiológicos se realizaron durante la fermentación como una forma de aislar las cepas existentes en todas las etapas y poder elegir aquellas cepas no-Sac que se encontraban presentes desde el inicio y que eran capaces de soportar el grado alcohólico alcanzado hacia el final de la fermentación. Las muestras se sembraron en un medio de cultivo diferencial WLN, Wallestein Laboratory Nutrient Agar, realizando diluciones seriadas y siembra en superficie. Posteriormente según la morfología y color de las colonias obtenidas se eligieron las posibles cepas nativas No-Sac. La caracterización se realizó por morfología y doble siembra en medio de cultivo Agar Lisina. Los repiques obtenidos fueron conservados en medio de cultivo de mantenimiento YPD (Extracto de levadura 1%, peptona 1%, dextrosa 2% y agar 2%) en heladera.

Microvinificaciones

Con todas las cepas aisladas en la etapa anterior se realizaron pruebas de fermentación a escala de laboratorio en jugo de uva, para observar su capacidad fermentativa y características sensoriales.

Para realizar estas pruebas de fermentación se utilizó jugo de uva blanco Trebbiano cosecha 2005 (alcohol potencial, 11°; azúcares totales, 200 g/L; acidez total, 3.25 g/L H₂SO₄; pH, 3.6 y FAN, 113 mg/L), filtrado con membrana de 0.45 micras. Primeramente se realizó un pie de cuba utilizando erlenmeyers de 50 mL y 20 mL de jugo inoculado con la cepa a estudiar, manteniendo una temperatura de 20°C durante 24 horas con una agitación de 100 rpm.

La fermentación alcohólica se realizó por duplicado en erlenmeyers de 125 mL. Se utilizó para cada ensayo 50 mL de jugo y se inoculó con una concentración de 1x10⁶ células/mL. Los erlenmeyers se taparon en una primera etapa con algodón y papel de aluminio, y posteriormente cuando la fermentación avanzaba se utilizaron válvulas de Müller con H₂SO₄ que actúa como "captador" del agua de evaporación. La fermentación se llevó a cabo a una temperatura controlada de



20°C y su seguimiento se realizó controlando la liberación de CO₂ mediante la pérdida de peso. La fermentación se consideró finalizada cuando la pérdida de peso alcanzó un valor constante. Hacia el final de la fermentación se realizó un control de pureza como forma de corroborar que no hubo ningún tipo de contaminación, para lo cual las muestras correspondientes a cada una de las fermentaciones se sembraron en el medio de cultivo diferencial WLN.

Microvinificaciones mixtas

Una vez seleccionadas las cepas no-Sac según su capacidad fermentativa y características sensoriales se realizaron fermentaciones mixtas entre las levaduras no-Sac seleccionadas en la etapa anterior y una levadura de vino comercial *Saccharomyces* (Lalvin 254). El procedimiento utilizado para estas microvinificaciones fue similar al descrito anteriormente. La fermentación se realizó por duplicado en Erlenmeyers de 125 mL. Se utilizó para cada ensayo 50 mL de jugo y se inoculó inicialmente una concentración de 1x10⁵ células/mL no-Sac. Luego de transcurridas 48 horas de iniciada la fermentación se inoculó la cepa *Saccharomyces* con una concentración de 1x10⁵ células/mL y los Erlenmeyers se taparon con válvulas de Müller. La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 20°C. Una vez finalizada la fermentación se realizó un control de pureza en placas de WLN y una evaluación sensorial de las muestras ensayadas.

Tipificación molecular

Primeramente se realizó una tipificación molecular amplificando las dos regiones ribosomales variables ITS (internal transcribed spacers) y el gen correspondiente al 5.8S rRNA que está ubicado entre los dos ITS, (Esteve-Zarzoso et al. 1999). Los productos de PCR obtenidos (de unos 760 bp) se digirieron con las enzimas de restricción HhaI, DdeI, Hae III y HinfI y los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos para cada enzima se comparan con los obtenidos para las cepas de referencia. Este método constituye un RFLP de regiones variables ITS.

A continuación se amplificó la región variable D1/D2 del DNA ribosomal 26S, (Kurtzman y Robnett, 1998). Se secuenciaron ambas hebras del producto de PCR, de unos 600 bp. Finalmente se compararon las secuencias obtenidas con las existentes en Genbank.

Análisis de Aromas por GC-MS

Luego de finalizadas las *microvinificaciones mixtas* se realizó una evaluación de los aromas libres obtenidos en las mismas. Para ello se realizó una extracción de los compuestos volátiles, mediante la utilización de técnicas de extracción en fase sólida, mediante el uso cartuchos ISOLUTE[®] ENV+. La identificación de los compuestos aromáticos se realizó mediante GC-MS con un gascromatógrafo Shimadzu GC-17 acoplado con un detector de espectrometría de masa Shimadzu QP 5050. La identificación se realizó mediante bibliotecas de espectros de referencia (Adams, 1995; McLafferty and Stauffer, 1991) y librería propia realizada con estándares y datos reportados en la literatura. La cuantificación de compuestos aromáticos se realizó por medio de HRGC, en un cromatógrafo Shimadzu GC14B, equipado con detector de ionización de llama (FID) y software de procesamiento de datos Shimadzu EZ-Chrom.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 43 cepas aisladas, fueron seleccionadas en base a su capacidad fermentativa y evaluación sensorial preliminar un total de 4 cepas no-Sac. Las mismas que fueron identificadas como 02/5A, 02/19A, 02/25A y M26.

Los resultados obtenidos en las fermentaciones mixtas realizadas a escala de laboratorio con las cepas mencionadas anteriormente se muestran en la Figura 1 que también incluye el control realizado con la cepa L254 de *Saccharomyces* inoculada por separado.

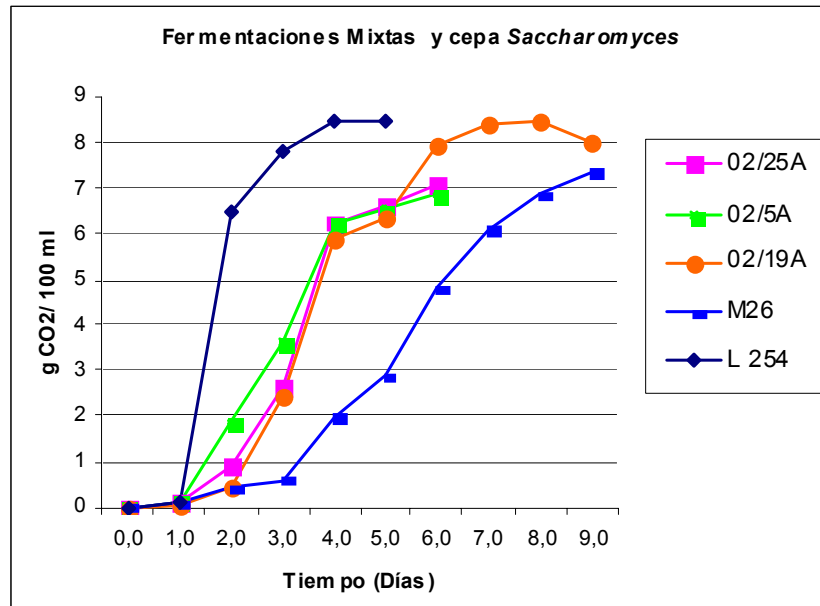


Figura 1: Capacidad fermentativa obtenida en las microvinificaciones mixtas entre L254 *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en comparación con el cultivo puro de L254 de *Saccharomyces*.

Para el caso de las fermentaciones mixtas realizadas con las cepas no-*Sac* 02/25A, 02/5A y 02/19A se obtuvo una buena capacidad fermentativa ya que se logró un buen desprendimiento de CO₂ luego del segundo día de fermentación. La velocidad de las mismas para todos los casos de cultivos mixtos fue menor. Esta situación se presenta como una ventaja para la elaboración de vinos de alta gama donde lo que se busca es una velocidad moderada para evitar las pérdidas de aromas y evitar el consumo energético excesivo para control de temperatura. Con todas las cepas se obtuvo vinos secos sin presentarse ningún problema de parada de fermentación. En el análisis sensorial descriptivo, Tabla 1, se observa que para todas las fermentaciones mixtas realizadas se logra un mayor aporte aromático si se compara con la fermentación llevada a cabo solo con la cepa *Saccharomyces*. Fundamentalmente se encontraron notas a frutos rojos, frutos tropicales y frutas secas. Solo en el caso de la cepa M26 apareció una leve nota de reducción que puede explicarse en un cultivo mixto por los bajos niveles de nitrógeno asimilable utilizados en los ensayos.

Fermentaciones mixtas			
Cepa no-Sac	Descripción sensorial	Defectos (si /no)	Ranking de preferencia sensorial
02/5A	levadura, frutado rojo intenso y frutas pasas agradables, mucha almendra	No	1
02/19A	Verde, café, tabaco intenso	No	3
02/25A	Avellana, fruto seco intenso, nuez, almendra	No	2
M26	Frutado, pomelo, manzana verde, algo de SH2	No	4
Fermentación con cepa <i>Saccharomyces</i>			
L254	Frutado, miel	No	

Tabla 1: Descripción sensorial de las fermentaciones mixtas realizadas y de la fermentación llevada a cabo solo por *Saccharomyces*.



Tipificación Molecular

Mediante tipificación molecular amplificando las dos regiones ribosomales variables ITS y la amplificación de regiones variables D1/D2 del DNA ribosomal 26S fue posible identificar a las cepas ensayadas. Las mismas fueron identificadas como:

02/5A, *Hanseniaspora vineae*; 02/19A, *Hanseniaspora vineae*; 02/25A, *Hanseniaspora vineae* y M26, *Metschnikowia pulcherrima*.

Análisis de aromas

Se evaluaron por GC-MS los aromas libres formados durante las microvinificaciones mixtas y la fermentación llevada a cabo sólo por la levadura *Saccharomyces*.

Para el caso de la fermentación mixta llevada a cabo con la cepa que resulto de mayor interés, 02/5A, se observan variaciones interesantes en la producción de algunos compuestos que pueden explicar las diferencias sensoriales entre estas fermentaciones y la cepa pura de *Saccharomyces*. Por un lado, la menor concentración de compuestos en los vinos del cultivo mixto como los alcoholes superiores: 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, y 3-metil-1-butanol, estos compuestos normalmente pueden enmascarar los aromas frutados cuando superan determinados niveles de concentración. Mientras que algunos compuestos como el β -feniletanol, lactato de etilo, γ -butirolactona y el decanoato de etilo se encontraron en mayor concentración en el cultivo mixto, estos compuestos aportan notas florales, más frutales y a caramelo.

Levadura seca de *H. Vineae* y vinificación a nivel de bodega

Normalmente el secado de las levaduras no-Sac es difícil, siendo un factor importante para el potencial comercial de una cepa. Los ensayos de secado realizados por la empresa Lallemand dieron resultados exitosos para esta cepa y en la posterior viabilidad en la rehidratación por métodos convencionales. A nivel de bodega se pudo reactivar medio kilo de levadura seca de esta cepa y se aplicó en uvas Cabernet Sauvignon durante la cosecha 2007 por 72 horas a 15°C, inoculando luego de este periodo la cepa L254. El vino obtenido finalizó perfectamente la fermentación y no presentó ningún tipo de defectos en cuanto a los niveles de acidez volátil 0.33 (g H₂SO₄/L), acidez total 3.6 (g H₂SO₄/L) y alcohol 12.3 (% vol.)

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos a escala de laboratorio, se comprueba el efecto positivo de las fermentaciones mixtas con levaduras No-Sac y *Saccharomyces* frente a las fermentaciones convencionales llevadas a cabo sólo con levaduras *Saccharomyces*. Se obtuvo con estas microvinificaciones mixtas mayor aceptación sensorial y mayor complejidad aromática que los vinos del cultivo puro. En todos los casos estudiados se obtuvieron vinos más frutados e intensos con los cultivos mixtos. La menor producción de alcoholes superiores en los cultivos mixtos puede explicar esta situación.

En base a estos resultados se eligió seleccionar la cepa 02/5A. Esta cepa fue clasificada como *Hanseniaspora vineae* por análisis del ADN ribosomal en las regiones D1/D2.

La cepa *H.vineae* 02/5A fue probada a nivel de bodega y en forma de levadura seca con un desempeño similar a las cepas comerciales en cuanto a viabilidad celular y capacidad de rehidratación. Los vinos obtenidos demuestran que este tipo de levaduras no-Sac son aplicables a nivel industrial sin arriesgar la calidad del vino o la contaminación por bacterias perjudiciales, y serán una herramienta útil en un futuro muy próximo para el Enólogo. Para nuestro conocimiento el uso de *H.vineae* es la primera aplicación de una cepa apiculada a nivel de bodega y en presentación de forma comercial en la Enología.



La aplicación de levaduras de este tipo asegura el desarrollo de fermentaciones con mayor biodiversidad sin riesgos de la aparición de vinos con defectos, uno de los objetivos de la Enología de Mínima Intervención (EMI).

Recibido: Diciembre 2007

Aceptado: Enero 2008

NDLR: Trabajo presentado en el "XI Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología", 26 al 30 de Noviembre de 2007, Mendoza, Argentina.
Si desea contactarse con alguno de sus autores, comuníquese a enologia@revistaenologia.com

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, R.P. (1995). "Identification of essential oils by gas chromatography/mass spectroscopy". Allured Publ. Corp., Illinois.
- BOIDO, E., LLORET, A., MEDINA, K., FARIÑA, L., CARRAU, F., VERSINI, G., and DELLACASSA, E. (2003). "Aroma composition of *Vitis vinifera* cv. Tannat: the typical red wine from Uruguay". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:5408-5413.
- CARRAU, F.M. (2003). "Characterization of yeast in relation to the ability to utilize nitrogen - Studies of aroma compounds". *Food Science and Technology*. Universidad de la Republica Uruguay. 312.
- CARRAU, F.M. (2005). "Levaduras nativas para Enología de Mínima Intervención. Biodiversidad, Selección y Caracterización". *Agrociencia*. 9:387-399.
- ESTEVE-ZARZOSO B., BELLOCH C., URUBURU F. and QUEROL A. (1999). Identification of yeasts by RFLP análisis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 329-337.
- KURTZMAN CP and ROBNETT CJ. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- MCLAFFERTY, F.W. and STAUFFER, D.B. (1991). *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. Wiley and Sons, New York.
- MEDINA, K., GONZALEZ, J., CARRAU, M., FARIÑA, L., CAPRA, A., PEREZ, G., GAMBARO, A., BOIDO, E., DELLACASSA, E. and CARRAU, F. (2005). "Aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* para obtener mayor complejidad en vinos tintos de alta gama". X Congreso Latino-Americano de Viticultura e Enología. Bento Gonçalves, Brasil. .
- MEDINA, K., FARIÑA, L., CAPRA, A., PEREZ, G., FERRERI, L., CONIBERTI, A., JUBANY, S., BOIDO, E., DISEGNA, E., GAGGERO, C., DELLACASSA, E., HENSCHKE, P. and CARRAU, F.M. (2007). "Impacto del uso de levaduras nativas seleccionadas en la Enología de Mínima Intervención". *Enología*. 1:45-48.
- VERSINI, G., CARLIN, S., NICOLINI, G., DELLACASSA, E. and CARRAU, F. (1999). "Updating of varietal aroma components in wines". In: Argentina, A.E. (Ed.), VII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. La Vitivinicultura del Hemisferio Sur. Mendoza, Argentina. 325-349.
- ZOECKLEIN, B. (1995). *Wine analysis and production*. Chapman & Hall, New York.