

EXALTACIÓN DE LAS PROPIEDADES AROMÁTICAS DEL MOSTO MEDIANTE EL USO DE ESPECIES DE LEVADURA NO-SACCHAROMYCES Y SACCHAROMYCES

PERRINE LANGUET¹

EVELYNE AGUERA²

ALAIN SAMSON²

A. ORTIZ-JULIEN¹

ANTONIO TOMÁS PALACIOS GARCÍA¹

JEAN MICHELL SALMON³

RESUMEN

En los últimos 20 años, el uso extendido de levaduras seleccionadas ha aumentado la fiabilidad de la fermentación y ha mejorado la calidad general de los vinos. Gracias a la variedad de cepas de levadura comercialmente disponibles, el enólogo tiene acceso hoy en día a una amplia selección de herramientas para el control de la fermentación alcohólica. Sin embargo, a pesar de las innumerables soluciones ofrecidas a los profesionales, se utiliza generalmente en bodega sólo el género *Saccharomyces*.

De hecho, el efecto sobre el perfil sensorial de la fermentación con especies no-*Saccharomyces* ha sido subestimado al no ser bien conocidas. Estas cepas de levadura han demostrado ser muy interesantes para corregir ciertos defectos analíticos del vino, pero sobre todo para intensificar y mejorar sus propiedades sensoriales. En particular, las especies *Torulaspora delbrueckii* y *Candida stellata* han sido estudiadas en detalle por sus aportaciones sensoriales durante la fermentación alcohólica.

Con el objetivo de tomar en consideración estos avances científicos y de poner a disposición de los enólogos, en un mercado vitícola cada vez más tecnológico, las herramientas apropiadas para un planteamiento innovador de la vinificación, se han desarrollado diversos enfoques experimentales. Según estos, en el enfoque experimental, el factor clave de la complejidad aromática de los vinos ha resultado ser la sucesión de poblaciones de levaduras, con alternancia de la dominancia de levaduras “exóticas” y la dominancia de levaduras del género *Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica.

Palabras clave: no-*Saccharomyces*, inoculación secuencial, complejidad aromática y control biológico.

1. LALLEMAND SAS, 19, rue des Briquetiers, BP No. 59, 31702 BLAGNAC CEDEX, Francia, planguet@lallemand.com.

2. INRA, Station expérimentale de Pech-Rouge, 11430 GRUISSAN, Francia.

3. INRA, UMR SPO, Microbiologie et Technologie des Fermentations, 2, place Viala, 34060 MONTPELLIER, Francia.

In the last twenty years, the widespread use of selected yeasts has improved the reliability of fermentation and enhanced the general quality of wines. Today, the wide variety of commercially-available yeast strains gives oenologists access to a broad selection of tools for controlling alcoholic fermentation. However, despite the countless solutions offered to professionals, wineries tend only to use the genus Saccharomyces.

*In fact, the effect of fermentation with non-Saccharomyces species on the sensorial profiles of wines has been underestimated because these species are not well known. These yeast strains have proven to be very useful for correcting certain analytical defects in wines, and especially for intensifying and improving their sensorial properties. In particular, the yeast species *Torulaspora delbrueckii* and *Candida stellata* have been studied in detail due to their sensorial contributions during alcoholic fermentation.*

Different experimental approaches have been developed to take into consideration these scientific developments and provide oenologists with suitable tools for undertaking innovative approaches to vinification in an increasingly technological wine market. Oenologists consider the succession of yeast populations to be a key factor of the aromatic complexity of wines in the experimental approach, with alternating dominance of "exotic" yeasts and Saccharomyces yeasts during alcoholic fermentation.

Keywords: non-Saccharomyces, sequential inoculation, aromatic complexity and biological control.

0. INTRODUCCIÓN

El uso de levaduras seleccionadas se puede ver como una garantía más de control sobre el vino final. Una vez que el enólogo ha reducido la población e influencia de las levaduras y bacterias indígenas, ha podido observar la influencia de usar una u otra levadura sobre las características del vino final. Al principio sólo se buscaba una levadura capaz de terminar la fermentación y producir una cantidad mínima de acidez volátil. Si bien estos aspectos siguen siendo primordiales, las demandas a las nuevas selecciones han sido crecientes: producción limitada de urea, formación mínima de espuma, factor killer, formación de aromas varietales, rendimiento alcohólico, etc...

Taxonómicamente, las levaduras del vino pertenecen al *phylum* Ascomycetos, clase Hemiascomycetos, familia *Saccharomycetae*, con unas 20 especies del género *Saccharomyces* de diferentes orígenes geográficos. La sistemática de las levaduras, de tan conocida que es, parece que debe estar bien definida; no obstante, no hay unanimidad en la clasificación de las especies del género *Saccharomyces* más utilizadas en la vinificación: en ocasiones se pueden encontrar referencias a las variedades *bayanus* o *uvarum* como una subdivisión de la especie *S. cerevisiae*, pero tampoco no es infrecuente que se consideren especies diferentes del mismo género. Esta situación contrasta fuertemente con los conocimientos y la clasificación que tenemos de las variedades del otro organismo implicado en la elaboración del vino: *Vitis vinifera*. Por tanto, vemos que todavía hay que superar algunas dificultades para distinguir entre diversas variedades de *Saccharomyces cerevisiae* presentes en un mosto no estéril. Ésta constituye una de las principales aplicaciones de la genética en la enología actual.

La calidad de los vinos es una consecuencia directa de la evolución de la flora microbiana del mosto durante la fermentación. El mosto funciona como un pe-

queño ecosistema donde, en condiciones naturales, se suceden las poblaciones de microorganismos espontáneos. Las condiciones ambientales evolucionan de forma constante y crean competencias entre los organismos: las levaduras de los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* y *Pichia*, resistentes a altas concentraciones de azúcares, crecen durante los primeros estadios de la fermentación; a medida que se modifica la composición del medio acaban muriendo o dejando paso a las especies resistentes al etanol del género *Saccharomyces*, que completan el proceso como levadura dominante. La evolución de las prácticas enológicas ha conllevado la utilización preferente de cepas seleccionadas. Una única cepa, conocida y controlada, es responsable de la etapa fermentativa de la vinificación. El control es posible gracias a la posición ventajosa que le damos a la cepa seleccionada: se inocula a partir de cultivos ya arrancados, mientras que las cepas endógenas se encuentran en un período de latencia que les impide competir con el pie de cuba.

Debido a que la sucesión de especies a lo largo de la vinificación puede sorprendernos gratamente con una alta complejidad aromática y gustativa, existe un interés bien fundamentado en encontrar la vía para utilizar especies de levaduras diferentes del género *Saccharomyces*, que es el principal objetivo de este trabajo.

En nuestro estudio, el análisis de los componentes aromáticos evidenció que la co-inoculación *Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae* no modificó la complejidad aromática de los vinos al compararlo con el del vino producido con la inoculación de una cepa pura de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*. La única diferencia importante fue la concentración de acetato de isoamilo, que parecía aumentar con la presencia de la levadura "exótica". Los otros ésteres no fueron modificados de forma perceptible comparados con los de la fermentación sólo con *Saccharomyces*.

El perfil aromático que resulta del desarrollo secuencial de *Torulasporea delbrueckii* y después de *Saccharomyces* muestra claramente una intensificación uniforme de las concentraciones de los ésteres: cuatro de los seis ésteres analizados presentan concentraciones superiores respecto a las obtenidas en el vino producido con una fermentación de una cepa pura de *Saccharomyces*; solamente en el caso del acetato de isoamilo, cuya elevada concentración dominaba el perfil aromático del vino testigo (Fig. 4), disminuyó su concentración con la inoculación secuencial.

Los vinos elaborados fueron sometidos al jurado de catadores mediante un análisis sensorial con una prueba de diferenciación y un análisis descriptivo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas, con un umbral del 5%, entre los vinos producidos con inoculación secuencial (realizada con la levadura *Torulasporea delbrueckii* y después con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) y el vino testigo (producido con una cepa pura de *Saccharomyces*). Al jurado se le pidió entonces realizar un análisis descriptivo. Los perfiles sensoriales obtenidos muestran una intensificación de ciertos descriptores, como "floral", "fruta en almíbar" y "galleta de jengibre", ayudados por un dulzor más intenso en el paladar. Notas más comunes, como "manzana", "plátano" o incluso "picante" o "animal" fueron menos presentes.

Por el momento, continuamos con nuestras investigaciones en este, por lo que los enólogos pronto podrán disponer de herramientas innovadoras que les permitan expresar lo mejor del potencial aromático de sus uvas, a la vez de garantizar la fiabilidad de la fermentación alcohólica.

1. OBJETIVOS, MATERIALES Y METODOLOGÍA UTILIZADA

Nuestra meta era verificar la hipótesis siguiente: la inoculación de una cepa de levadura “exótica” y una cepa de levadura *Saccharomyces* debería engendrar directamente una mayor complejidad e intensidad en el perfil sensorial de los vinos. Para validar esta hipótesis, elegimos estudiar la levadura “exótica” de la especie *Torulospora delbrueckii*, conocida por ser una levadura inicialmente presente en ciertos mostos que no presentan ningún defecto organoléptico conocido^{1, 2, 10, 11, 14}. Las diversas inoculaciones fueron realizadas en un mosto de la variedad Macabeo con un grado alcohólico potencial de 12.5 % v/v. La temperatura de fermentación fue 20°C. Las co-inoculaciones examinadas combinaban una cepa de levadura de la especie *Torulospora delbrueckii* con una cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* variedad *bayanus* (Fig. 1).

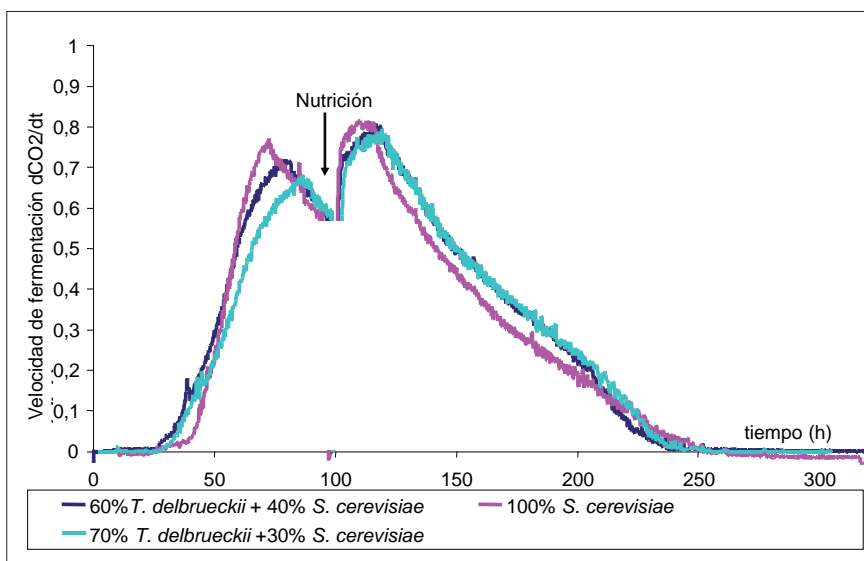


Figura 1. Cinéticas de fermentación en coinoculación.

A densidad de 1060 se adicionó nutrientes específicos de levadura para inhibir el efecto de competencia interespecífica en el caso de coinoculación. En la inoculación secuencial, la adición de nutrientes se dividió en dos momentos diferentes, a densidad 1070 y a densidad 1060.

Se realizaron dos ensayos basados en la coinoculación y la inoculación secuencial de las levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*. En el caso de la coinoculación, ambas levaduras se inocularon en el mismo momento, aunque en diferentes proporciones, 60 y 70 % de *Torulospora delbrueckii*, comparándose los resultados con la misma fermentación realizada en pureza con solo *Saccharomyces*. Mientras que en la inoculación secuencial, primero se adicionó al mosto la levadura no *Saccharomyces* y la *Saccharomyces* se inoculó con una pérdida de 20 puntos de densidad, comparando de nuevo los resultados con la fermentación en pureza de *Saccharomyces*.

2. RESULTADOS DE LA CO-INOCULACIÓN DE SACCHAROMYCES/NO-SACCHAROMYCES

Los análisis estándar del vino están resumidos en la Tabla 1, donde se puede observar una caída significativa de la acidez volátil en los vinos sometidos a coinoculación^{8,9}.

TABLA 1.
ANÁLISIS ESTÁNDAR DE LOS VINOS.

Tipos de inoculaciones	Alcohol (v/v)	pH	AT (g/L H ₂ SO ₄)	AV (g/L H ₂ SO ₄)	SO ₂ Libre (mg/L)	SO ₂ Total (mg/L)	Azúcares residuales (g/L)
<i>T. delbrueckii</i> 70% + <i>S. cerevisiae</i> 30%	12.35	3.45	2.95	0.10	8	51	< 2
<i>T. delbrueckii</i> 60% + <i>S. cerevisiae</i> 40%	12.30	3.47	2.95	0.16	7	51	< 2
<i>S. cerevisiae</i> solo	12.20	3.48	3.10	0.27	15	70	< 2

Una vez acabada la fermentación, se analizaron las concentraciones de los principales ésteres que resultan de la fermentación de las levaduras: acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, butanoato de etilo y acetato de hexilo⁶ en los vinos obtenidos con los dos tipos de inoculación y en el vino producido con sólo *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 2). Para determinar el número de unidades de olor de cada uno de los ésteres, se utilizó el sistema del número de unidades de olor (NUO).

$NOU_{\text{para cada éster}} = \text{Concentración de cada éster} / \text{valor del umbral de percepción de este éster.}$

En nuestro estudio, el análisis de los componentes aromáticos evidenció que la coinoculación *Torulasora delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae* no modificó la

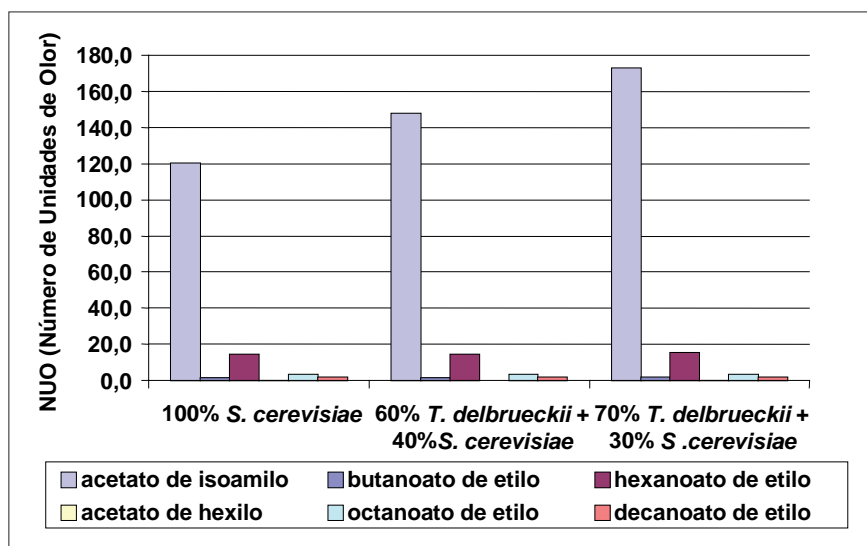


Figura 2. Perfiles del aroma químico de los vinos, obtenidos mediante el análisis de seis ésteres.

complejidad aromática de los vinos al compararlo con el del vino producido con la inoculación de una cepa pura de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*. La única diferencia importante fue la concentración de acetato de isoamilo, que parecía aumentar con la presencia de la levadura “exótica”. Los otros ésteres no fueron modificados de forma perceptible comparados con los de la fermentación sólo con *Saccharomyces*.

Para confirmar el perfil aromático obtenido con el análisis químico, los vinos fueron sometidos a análisis organoléptico por un jurado de catadores entrenados en análisis sensorial. El jurado estuvo deliberadamente compuesto por 20 catadores no profesionales, que son por consiguiente más representativos de consumidores normales de vino.

En todos los casos, el impacto de la nota amílica (acetato de isoamilo) resultó ser extremadamente pronunciado, cubriendo la presencia de otros ésteres, tanto en los vinos producidos con sólo *Saccharomyces cerevisiae* como en los producidos con las cepas exóticas. Por lo tanto, el jurado no pudo detectar diferencias significativas entre los vinos que resultaron de las coinoculaciones y los vinos producidos con la fermentación de una sola cepa pura de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Los primeros resultados demuestran que la inoculación de diferentes especies fue percibida como una manera de aumentar la intensidad de ciertas notas aromáticas que ya eran predominantes, con riesgo de acentuar el desequilibrio y por lo tanto, de debilitar la complejidad aromática de los vinos^{14, 15}. El riesgo en este caso, es el aumento potencial de acetato de isoamilo, que podría desequilibrar el aroma del vino si la concentración alcanzase niveles demasiado altos. Así, la hipótesis que consiste en considerar que la coinoculación con una cepa “exótica” y una cepa de *Saccharomyces* engendra directamente complejidad e intensidad en los perfiles sensoriales de los vinos, no fue confirmada en nuestro estudio, y por lo tanto, parece ser restrictiva con respecto a las sinergias y los antagonismos inherentes a las particularidades metabólicas de cada especie.

Actualmente se está evaluando esta experimentación con un enfoque diferente, que aporta mayores limitaciones en términos de control, pero que sin embargo tiene la posibilidad de dar lugar a vinos más armoniosos e intensos aromáticamente. Este enfoque consiste en reproducir la ecología del ambiente de la fermentación alcohólica fomentando lo siguiente:

- El desarrollo de levaduras exóticas durante el primer tercio de la fermentación, momento crucial para el equilibrio y la intensidad de los aromas en el vino; y a continuación...
- El desarrollo de levaduras *Saccharomyces* para garantizar una fermentación más segura.

Tal inoculación secuencial evita crear competiciones entre las características sensoriales y la cinética de fermentación de cada especie de levadura^{4, 5, 7, 17}.

3. RESULTADOS DE LA INOCULACIÓN SECUENCIAL DE LEVADURAS SACCHAROMYCES/NO-SACCHAROMYCES

Bajo condiciones de fermentación idénticas a las aplicadas en las experimentaciones de coinoculación y usando igualmente un mosto de la variedad Macabeo, con un grado alcohólico potencial de 13.6% vol., reprodujimos la sucesión de poblaciones de levadura exótica y de *Saccharomyces*, como se observó en numerosos

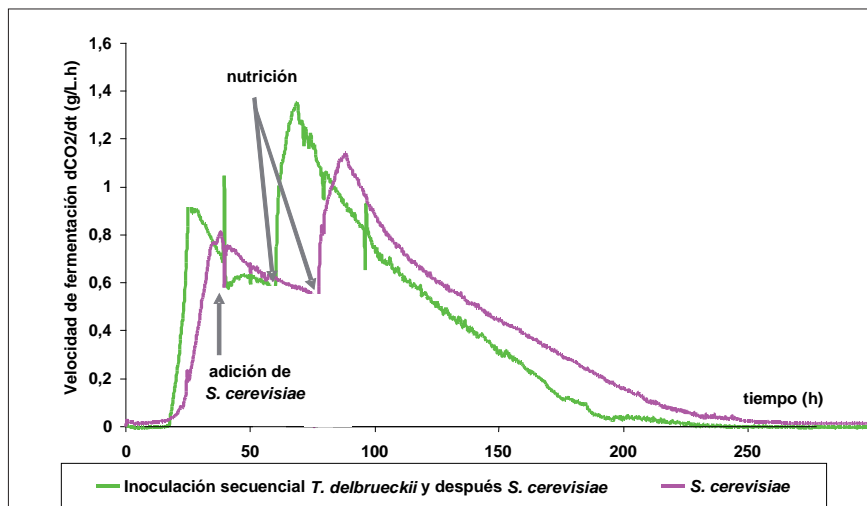


Figura 3. Cinética de fermentación en inoculación secuencial.

TABLA 2.
ANÁLISIS ESTÁNDAR DE LOS VINOS.

Inoculaciones secuenciales	Alcohol (v/v)	pH	AT (g/L H ₂ SO ₄)	AV (g/L H ₂ SO ₄)	SO ₂ Libre (mg/L)	SO ₂ Total (mg/L)	Azúcares Residuales (g/L)
<i>T. delbrueckii</i> y después <i>S. cerevisiae</i>	13.25	3.58	3.05	0.36	8	38	< 2
<i>S. cerevisiae</i> solo	13.45	3.59	3.15	0.43	5	32	< 2

estudios sobre ecología de las levaduras en sistemas fermentativos ^{8,9} (Fig. 3). Los análisis estándar de los vinos producidos están resumidos en la Tabla 2.

Para visualizar mejor el efecto de la inoculación secuencial sobre los ésteres (Fig. 4), la concentración de cada uno de los ésteres presentes en el vino producido con inoculaciones secuenciales fue dividida por la respectiva concentración del éster presente en el vino testigo (Fig. 5).

El perfil aromático que resulta del desarrollo secuencial de *Torulaspora delbrueckii* y después de *Saccharomyces* muestra claramente una intensificación uniforme de las concentraciones de los ésteres: cuatro de los seis ésteres analizados presentan concentraciones superiores respecto a las obtenidas en el vino producido con una fermentación de una cepa pura de *Saccharomyces*; solamente en el caso del acetato de isoamil, cuya elevada concentración dominaba el perfil aromático del vino testigo (Fig. 4), disminuyó su concentración con la inoculación secuencial.

Los vinos elaborados fueron sometidos al jurado de catadores mediante un análisis sensorial con una prueba de diferenciación y un análisis descriptivo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas, con un umbral del 5%, entre los vinos producidos con inoculación secuencial (realizada con la levadura *Torulaspora delbrueckii* y después con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) y el vino testigo (producido con una cepa pura de *Saccharomyces*). Al jurado se le pidió entonces realizar un análisis descriptivo. Los perfiles sensoriales obtenidos muestran una in-

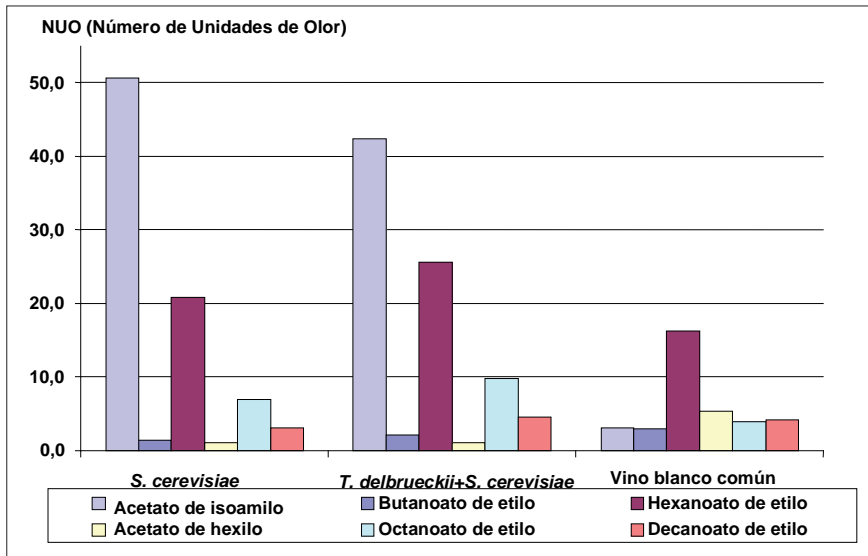


Figura 4. Perfil aromático de los vinos del ensayo en comparación a datos medios de vinos blancos comunes de la variedad Macabeo producidos en la zona.

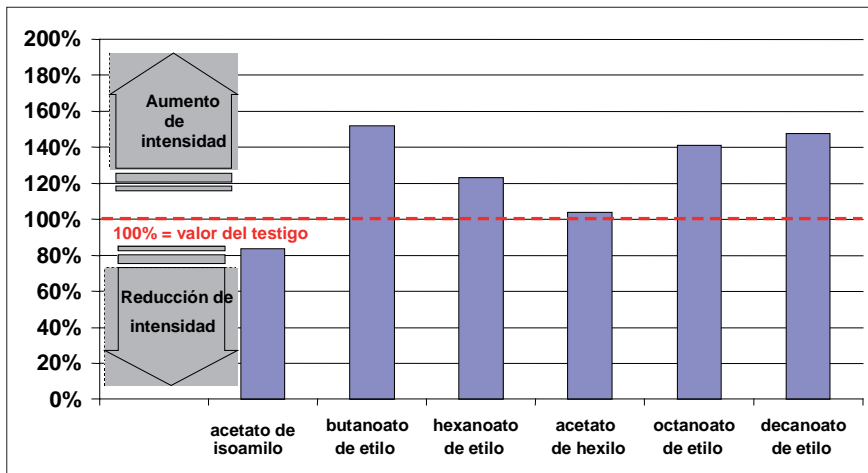
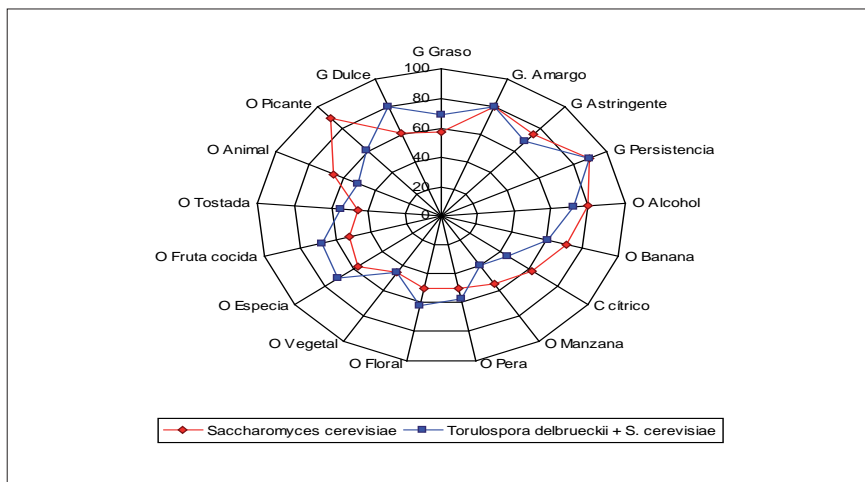


Figura 5: Efecto de la inoculación secuencial sobre la concentración de seis ésteres.

tensificación de ciertos descriptores, como “floral”, “fruta en almíbar” y “galleta de jengibre”, ayudados por un dulzor más intenso en el paladar. Notas más comunes, como “manzana”, “plátano” o incluso “picante” o “animal” (Fig. 6) fueron menos presentes.

4. CONCLUSIONES

En este estudio, los resultados obtenidos demuestran que la sucesión de predominancia de la población de levadura de la especie *Torulaspora delbrueckii* y



O: Olor – G: Gusto

Figura 6. Comparación de perfiles sensoriales.

después de levadura del género *Saccharomyces* permite un aumento homogéneo del nivel de ésteres, compuestos esenciales en los aromas fermentativos de los vinos 4, 5, 7, 14, 15.

Un estudio idéntico al presentado con la cepa *Torulaspora delbrueckii* se realizó con una cepa de levadura de la especie *Candida stellata*. Se obtuvieron resultados idénticos, reforzando nuestra decisión de desarrollar un instrumento innovador que reproduzca la ecología del ambiente fermentativo espontáneo.

Además, para armonizar e intensificar la complejidad aromática de los vinos, sería preferible la opción de una inoculación secuencial con la levadura “exótica” y después la levadura *Saccharomyces*, más que una inoculación interespecífica combinada.

Por el momento, continuamos con nuestras investigaciones en este, por lo que los enólogos pronto podrán disponer de herramientas innovadoras que les permitan expresar lo mejor del potencial aromático de sus uvas, a la vez de garantizar la fiabilidad de la fermentación alcohólica.

5. AGRADECIMIENTOS

Rémi Schneider (ITV-France), por los análisis químicos del aroma.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Ciani, M., and G. Picciotti. 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol. Letters*. 17:1247-1250.
- ² Ciani, M. 1997. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Res. Dev. Microbiol.* 1:317-331.
- ³ Ciani, M., and F. Maccarelli. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:199-203.

- ⁴ Ciani, M., and L. Ferraro. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85:247-254.
- ⁵ Ciani, M., L. Ferraro, and F. Fatichenti. 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl. Env. Microbiol.* Jan. 1996 62:128-132.
- ⁶ Etievant, P. 1991. Wine. In *Volatile compounds in food and beverages*, Maarse, H. (ed). Marcel Dekker Inc., New York, USA. 483-546.
- ⁷ Ferraro, L., F. Fatichenti, and M. Ciani. 2000. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Bioch.* 35(2000):1125-1129.
- ⁸ Fleet, G. H. 1990. Growth of yeast during wine fermentations. *Journal of Wine Research.* 3:211-223.
- ⁹ Heard, G. M., and G. H. Fleet. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environ. Microbiol.* 50:727-728.
- ¹⁰ Martinez, J., F. Toledano, C. Millan, and J.M. Ortega. 1990. Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from "Pedro Ximénez" grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food microbiology.* 7:217-225.
- ¹¹ Mauricio, J. C, S. Guijo, and J. M. Ortega. 1991. Relationship between phospholipids and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42:(4)301-308.
- ¹² Mora, J., J. L. Barbas, and A. Mulet. 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:156-159.
- ¹³ Moreno, J. J., C. Millan, J. M. Ortega, and M. Medina. 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Ind. Microbiol.* 7:181-190.
- ¹⁴ Plata, C., C. Millan, J. C. Mauricio, and J. M. Ortega. 2002. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20:217-224.
- ¹⁵ Rojas, V., J. V. Gil, F. Pinaga, and P. Manzanares. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 86:181-188.
- ¹⁶ Soden, A., I. L. Francis, H. Oakey, and P. Henschke. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of chardonnay wine. *Austr. J. Grape Wine Res.* 6:21-30.
- ¹⁷ Zironi, R., P. Romano, G. Suzzi, F. Battistutta, and G. Comi. 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Letters.* 15:235-238.