

# Selección e implantación de levaduras ecológicas de la DO Utiel –Requena en Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Bobal

L. Polo\*, S. Ferrer, I. Pardo

ENOLAB. Dpto. Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia. C/ Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot-Valencia. Tf: 963544390.  
e-mail: lucia.polo@uv.es

## Resumen

El vino ecológico es un vino que ha extraído lo mejor de la tierra respetando el medio ambiente. Los objetivos de nuestro trabajo se han centrado en la obtención de levaduras autóctonas ecológicas que fuesen capaces de producir vinos más ácidos, menos alcohólicos y más suaves al paladar. Para ello se aislaron de tres variedades de vid cultivadas según procedimientos de agricultura biológica y de los respectivos procesos de vinificación, llevados a cabo en condiciones ecológicas. Se caracterizaron a nivel molecular, fisiológico, enzimático, metabólico y tecnológico. Se seleccionaron tres cepas, una para cada variedad de uva y se llevaron a cabo experimentos para conocer su comportamiento en volúmenes de 50 L vinificados en bodega.

**Palabras clave:** vino ecológico, *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras, selección, cultivos iniciadores.

## 1. Introducción

Los enólogos que trabajan con procedimientos de agricultura biológica y que producen vinos ecológicos, consideran que así se producen vinos más auténticos, saludables y personales. Las diferencias más relevantes entre la vinificación de un vino ecológico y de otro convencional son las dosis permitidas de anhídrido sulfuroso, la prohibición del empleo de productos enológicos mejorantes y la limitación de uso de otros aditivos. Se permite la siembra de levaduras y bacterias comerciales pero no la de microorganismos transgénicos [1]. En los últimos años varios autores han realizado estudios sobre la influencia de la agricultura biológica en la biodiversidad de levaduras presente en uvas y en la fermentación y sobre la influencia de levaduras ecológicas en el perfil sensorial de los vinos [2, 3]. Los objetivos de nuestro trabajo se han centrado en la obtención de cepas de levaduras autóctonas que fuesen capaces de producir vinos más ácidos con menor contenido alcohólico y mayor suavidad. Esta es una de las primeras aportaciones en las que se aborda la tarea de seleccionar levaduras ecológicas para la producción de vinos ecológicos.

## 2. Material y Métodos

### 2.1 Aislamiento de levaduras para selección

Se aislaron levaduras de mostos y vinos de tres variedades de uva: Bobal, Cabernet Sauvignon y Tempranillo cultivadas siguiendo los protocolos de agricultura biológica. Las uvas se trasladaron, estrujaron y vinificaron en condiciones asépticas en el laboratorio ENOLAB, en volúmenes de 1 L (microvinificación). La toma de muestras se realizó en mosto recién estrujado, a mitad y al final de la fermentación alcohólica (FA). Las muestras se sembraron en placas de YPD y se incubaron en estufa a 28°C durante 4-5 días. Se aislaron aquellas levaduras que presentaban una morfología colonial y celular propia de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 2.2 Caracterización molecular

Las colonias aisladas de las microvinificaciones se identificaron mediante análisis de Total Intergenic Transcribed Spacers (ITS) [4] y se caracterizaron molecularmente a nivel de cepa mediante análisis del DNA mitocondrial digerido con *HinfI* [5]. Para la identificación se realizó un análisis de similitud de los perfiles ITS

entre las cepas aisladas y los de levaduras de referencia. Para la tipificación a nivel de cepa se compararon los perfiles de digestión del DNA mitocondrial de los aislados. Ambos tipos de perfiles se introdujeron en un programa informático BioNumerics versión 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) utilizando el método de agrupamiento de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) y usando, para el análisis de los ITS el coeficiente similitud de Dice y para el análisis de los perfiles de digestión del DNA mitocondrial el coeficiente de Pearson's Product-Moment Coefficient.

### 2.3 Caracterización metabólica y enzimática

La caracterización metabólica de las cepas se realizó por análisis de productos finales mediante HPLC [6] del fermentado obtenido a partir de mosto Airén estéril, inoculado a una concentración de  $2 \times 10^6$  ufc/mL e incubado a 28°C durante 9 días. La actividad  $\beta$ -glucosidasa se estudió según describen Arévalo Villena *et al.* [7]. Se estudió la producción de ácido sulfhídrico [8]. Otros aspectos considerados fueron la producción de glicerol, etanol y ácido acético, así como la síntesis/degradación de ácidos málico, láctico, succínico y cítrico, por HPLC [6]. La producción de urea se realizó mediante el Kit enzimático de Megazyme (K-URAMR).

### 2.4 Caracterización tecnológica

La respuesta de las cepas a distintas condiciones tecnológicas se realizó en mosto obtenido por dilución adecuada de mosto concentrado de la variedad Airén, excepto el Test de Helm que se realizó según González *et al.* (1996) [9]. Para observar la tolerancia a la presión osmótica se diluyó el mosto concentrado hasta conseguir concentraciones de azúcares de 200, 225, 250 mg /L; la tolerancia al etanol se estudió añadiéndole al mosto etanol absoluto hasta conseguir 0, 5, 8, 10 y 12 % (v/v) [10]; la resistencia al metabisulfito potásico se ensayó añadiéndole al mosto 0, 60, 100 y 160 mg/L de metabisulfito potásico. Para analizar estos comportamientos las cepas se crecieron previamente en YPD y se inocularon en los mostos a una concentración de  $2 \times 10^6$  ufc/mL en volúmenes de 300  $\mu$ l distribuidos en microplaca; el crecimiento se monitorizó por medida de la absorbancia a 600 nm en FLUOscan OPTIMA (Labtech). La resistencia al etanol se evaluó midiendo la capacidad de supervivencia de la levadura en vino sintético adicionado de etanol hasta obtener concentraciones finales de 8, 10, 12 y 14% (v/v). Las levaduras previamente crecidas en YPD, se inocularon a una concentración de  $2 \times 10^8$  ufc/mL. La viabilidad de las levaduras se evaluó mediante recuento de viables en placas de YPD tras 4, 24 y 48 horas. El poder acidificante y la capacidad de agotar azúcares se evaluó por cuantificación de ácidos y azúcares tras la fermentación del mosto [6]. Para estimar la velocidad de fermentación y los metabolitos generados durante la FA., cada levadura se inoculó a  $10^6$  ufc/mL en 300  $\mu$ l y 10 mL de mosto Airén estéril enriquecido con 0.3 g/L de corteza de levadura (MCC), respectivamente. Los volúmenes se incubaron sin agitación 8 días a 28°C. La velocidad de fermentación se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm de los cultivos en microplaca mediante FLUOscan OPTIMA. Los metabolitos producidos tras la FA se cuantificaron [6].

### 2.5 Estudio de implantación

Las cepas seleccionadas de cada una de las variedades (Bobal, Cabernet Sauvignon y Tempranillo) y una cepa comercial se inocularon en mosto de cada variedad a una concentración de las  $2 \times 10^6$  ufc/mL. Un mosto permaneció sin inocular. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Se realizó el seguimiento de la FA mediante análisis con el equipo WineScan (FOSS) de la propia bodega. Se tomaron muestras a mitad y final de la FA para conocer el grado de implantación de las cepas de levadura. Las muestras se sembraron en las condiciones descritas en el apartado 2.1 y se analizaron por análisis del DNA mitocondrial, como se describe en el apartado 2.2.

## 2.6 Análisis organoléptico

El análisis sensorial de los vinos terminados y embotellados se realizó por cuatro enólogos expertos.

## 3. Resultados y Conclusiones

### 3.1 Caracterización molecular

Se aislaron 132 cepas. Tras observación microscópica se seleccionaron 90 aislados que coincidían con la morfología microscópica de *S. cerevisiae*. De estos 90 aislados 64 se identificaron como *S. cerevisiae* por sus perfiles ITS. Tras análisis de los perfiles del DNA mitocondrial, a un nivel de corte del 29% se revelaron 24 clusters que representan 24 cepas diferentes.

### 3.2 Selección de cepas por análisis físico-químicos y tecnológicos

Algunos de los test realizados no fueron discriminantes: resistencia a la presión osmótica (todas eran capaces de crecer a 250 mg/L), producción de urea (todas producían urea), actividad  $\beta$ -glucosidasa (ninguna exhibió esa capacidad). Se escogieron aquellas cepas que producían menor concentración de etanol, mayor cantidad de ácidos no volátiles y de glicerol, menor concentración de ácido acético y sulfhídrico, mejor resistencia y tolerancia al etanol y metabisulfito potásico y mejor cinética de crecimiento para cada una de las variedades. Estas cepas fueron, para la variedad de Tempranillo la cepa 55A, para la variedad Bobal la cepa 80A y para la variedad Cabernet la 110Ap.

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en los criterios de selección que se sometieron las 24 cepas de *S. cerevisiae*. El color negro significa mal comportamiento, el gris buen comportamiento y el blanco intermedio. 1- Presión osmótica; 2- Resistencia etanol; 3- Tolerancia etanol; 4- Resistencia SO<sub>2</sub>; 5- Poder floculante; 6- Producción S<sub>2</sub>H; 7- Producción urea; 8- Activ.  $\beta$ -glucosidasa; 9- Cinética de crecimiento; 10- Producción glicerol; 11- Producción etanol; 12- Agotamiento de azúcares; 13- Poder acidificante; 13.1- Mállico; 13.2- Láctico; 13.3- Succínico; 13.4- Cítrico; 14- Producción ácido acético. n.d no detectada

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				14
													13.1	13.2	13.3	13.4	
CEPAS																	
B2							n.d										
FTH							n.d										
73Cp							n.d										
3A							n.d										
55A							n.d										
110Ap							n.d										
116A							n.d										
82A							n.d										
9A							n.d										
64A							n.d										
80A							n.d										
83A							n.d										
FW							n.d										
113A							n.d										
73Ag							n.d										
73B							n.d										
38C							n.d										
81A							n.d										
XR							n.d										
C1							n.d										
17A							n.d										
29C							n.d										
77B							n.d										
114A							n.d										

### 3.3 Implantación

La vinificación en 50 L en bodega permitió conocer el grado de implantación de la cepa. En el caso de Tempranillo, se impone a un 100% tanto la cepa comercial como la cepa seleccionada para este vino, la 55A. En el caso de Cabernet, la cepa que muestra una implantación más temprana es la comercial, aunque hacia el final de la FA disminuye su proporción, mientras que la cepa 55A es mayoritaria a mitad de FA y aumenta su proporción conforme progresa la FA. Sin embargo, la cepa seleccionada para este vino, la 110Ap, ha

mostrado menor y más tardía capacidad de implantación que la 55A. En el caso de Bobal, no se observa implantación de la cepa comercial, mientras que la cepa seleccionada para este vino (80A), no logró imponerse a las levaduras autóctonas, alcanzando solo un 50% de representación a mitad de FA. En este caso, la cepa que mostró un mejor comportamiento fue la 55A, que alcanzó un 70% de implantación al final de la FA. De los resultados obtenidos se deduce que la cepa 55A, de entre las tres seleccionadas, es la que presenta mayor capacidad e implantación en los tres tipos de vinos.

### 3.4 Resultados físico-químicos de los vinos inoculados

En la variedad Cabernet la cepa 110Ap produce menos glicerol y etanol que la cepa comercial, disminuye la acidez total y deja más azúcares residuales. En el caso de la variedad Bobal, las cepas autóctonas y la comercial agotan todos los azúcares dando lugar a una graduación alcohólica similar, e inferior a la del vino control; las cepas 80A y 55A producen menos glicerol que la comercial, mientras que la primera da lugar a una menor acidez total. En el caso del vino Tempranillo, la cepa 55A produce más alcohol y menos glicerol que la comercial pero más que el control; sin embargo la acidez obtenida es similar a la cepa comercial. Todas las cepas agotan prácticamente todos los azúcares.

Tabla 2. Resultados del análisis por HPLC de las muestras de vino de cada variedad de uva fermentado con cada cepa

CABERNET	AZÚCARES RESIDUALES	SUMA ÁCIDOS	GLICEROL	ETANOL
CONTROL	0,93	7,58	10,74	16,40
COMERCIAL	0,62	7,97	12,37	15,76
55A	0,28	9,32	10,36	15,71
110Ap	0,89	7,63	10,08	15,62
<b>BOBAL</b>				
CONTROL	0,05	9,23	8,72	12,68
COMERCIAL	0,19	7,51	8,09	11,84
55A	0,21	7,54	8,04	11,76
80A	0,17	6,99	7,67	11,73
<b>TEMPRANILLO</b>				
CONTROL	0,09	10,80	8,38	13,17
COMERCIAL	0,07	9,40	9,63	13,36
55A	0,08	9,39	9,40	13,41

### 3.5 Resultados de los análisis organolépticos de los vinos embotellados

En la variedad de Tempranillo la cepa que obtuvo mayor puntuación fue la 55A, en el caso de la variedad de Cabernet la cepa mayor puntuada fue la 110A y en la variedad Bobal la mejor cepa fue la 80A.

### 3.6 Conclusión

El comportamiento físico-químico y organoléptico de las cepas seleccionadas es semejante pero el grado de implantación de la cepa 55A es superior, por ello se ha escogido para realizar ensayos industriales.

## 5. Bibliografía

- [1] Anónimo. Gobierno de la Rioja. <http://www.larioja.org/npRioja/default/defaultpage.jsp?idtab=438920>
- [2] Cordero-Bueso, G.; Arroyo, T.; Serrano, A.; Tello, J.; Vélez, M. D.; Valero, E. I. 2011. *J. Appl. Microbiol.*, 145, 132-139.
- [3] Callejón, R. M.; Clavijo, A.; Ortigueira, P.; Troncoso, A. M.; Paneque, P.; Morales, M. L. 2010. *Anal. Chim.*, 660, 68-75.
- [4] Guillamón, J. M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J.; & Querol, A. 1998. *Arch. Microbiol.*, 169, 387-392.
- [5] Querol, A.; Barrio, E.; & Ramon, D. 1992. *System. Appl. Microbiol.*, 15, 439-446.
- [6] Frayne R. F. 1986. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 281-287.
- [7] Arévalo Villena, M.; Ubeda Iranzo, J. F.; Cordero Otero, R. R.; Briones Perez, A. I. 2005. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 558-564.
- [8] Caridi, A.; Cufari, A.; Ramondino, D. 2002. *J Gen Appl Microbiol.*, 48, 261-2678.
- [9] González, M. G.; Fernández S. y Sierra J. A. 1996. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54(1), 29-31.
- [10] Carrasco, P.; Querol, A.; del Olmo, M. 2001. *Arch. Microbiol.*, 175, 450-457.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CENIT-2008 1002. La parte industrial del mismo se realizó en la bodega Sierra Norte.