

XXXV World Congress of Vine and Wine – OIV
18-22 June 2012 – Izmir, Turkey

EMPLEO DE FERMENTACIONES SECUENCIALES CON LEVADURAS NO-*Saccharomyces* Y APLICACIÓN DE BLOQUEADORES METABÓLICOS PARA REDUCIR EL GRADO ALCOHÓLICO EN VINOS

R. VEJARANO, I. LOIRA, A. MORATA, C. GONZÁLEZ, J. A. SUÁREZ-LEPE

Departamento de Tecnología de Alimentos - E.T.S.I. Agrónomos
Universidad Politécnica de Madrid - Ciudad Universitaria, S/N, 28040 Madrid
Email: antonio.morata@upm.es

Sección: II – Enología

RESUMEN

La combinación secuencial de especies no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* durante la fermentación y la adición de bloqueadores metabólicos como el furfural, *o*-vainillina, glicolaldehído y *p*-benzoquinona pueden resultar unas técnicas de vinificación interesantes para reducir el grado alcohólico del vino. El grado alcohólico se determinó por HPLC-IR y los azúcares residuales mediante tests enzimáticos. Las cepas de levadura 7013 (*Torulaspora delbrueckii*) y 938 (*Schizosaccharomyces pombe*) destacaron por su capacidad para reducir significativamente el grado alcohólico (reducción media del 2.1 % v/v) dando lugar a un vino seco (azúcares < 1.5 g l⁻¹) en fermentación secuencial con la 7VA (*Saccharomyces cerevisiae*). La *o*-vainillina permitió una disminución en el contenido de etanol del 0.54 % v/v a dosis de 50 mg l⁻¹, mientras que el efecto bloqueador del glicolaldehído fue más efectivo a la dosis de 200 mg l⁻¹ con una reducción del 0.95 % v/v. Finalmente con la *p*-benzoquinona se logró una reducción en el grado alcohólico de hasta 0.85 % v/v.

Palabras clave: no-*Saccharomyces*, fermentación secuencial, bloqueadores metabólicos, grado alcohólico

INTRODUCCIÓN

En condiciones enológicas, las levaduras no-*Saccharomyces* muestran aptitudes fermentativas muy desfavorables debido a su baja tasa de multiplicación y a sus necesidades específicas de micronutrientes y oxígeno (Mauricio *et al.*, 1991; Hansen *et al.*, 2001). Sin embargo, la combinación secuencial durante el proceso fermentativo de especies no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* puede resultar una técnica de vinificación interesante no sólo desde el punto de vista de mejorar la calidad sensorial (Zironi *et al.*, 1993; Plata *et al.*, 2002; Languet *et al.*, 2005; Céline *et al.*, 2010), sino también como mecanismo para reducir el grado alcohólico del vino. Esta técnica se basa en el consumo de azúcares durante las etapas iniciales de la fermentación por parte del género no-*Saccharomyces* de forma que cuando se adicione la levadura *Saccharomyces*, el grado alcohólico potencial en el medio sea inferior.

Por otro lado, los bloqueadores metabólicos son compuestos químicos que añadidos exógenamente actúan sobre el metabolismo de la levadura provocando una desviación en el

consumo de azúcares y reduciendo el grado alcohólico final (Larsson *et al*, 2000; Modig *et al*, 2002; Ábalos *et al*, 2011; Jayakody *et al*, 2011).

El objetivo de este trabajo es lograr la combinación óptima de cepas no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* que inoculadas de manera secuencial permitan producir vinos complejos y de baja graduación, así como identificar el bloqueador metabólico más eficiente y optimizar las condiciones fermentativas que permitan reducir el grado alcohólico final del vino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Utilización de bloqueadores metabólicos

Se realizaron tres ensayos con bloqueadores metabólicos, uno de ellos a partir de medio sintético con un grado alcohólico potencial de 15 % v/v (255 g l⁻¹ de glucosa, 3 g l⁻¹ de peptona y 3 g l⁻¹ de extracto de levadura) y los otros ensayos a partir de mosto de *V. vinífera* L. cv. Tempranillo con grados alcohólicos potenciales de 12 y 14 % v/v. Todos con un pH de 3.5 corregido con ácido *o*-fosfórico. Las levaduras utilizadas fueron la 7VA (EnotecUPM, España) y la AWRI796 (Maurivin, Australia). Los bloqueadores metabólicos empleados fueron furfural, *o*-vainillina, glicolaldehído y *p*-benzoquinona.

Fermentaciones secuenciales

El ensayo de fermentación secuencial se realizó a 23 °C a partir de un mosto de *V. vinífera* L. cv. Tempranillo con un grado alcohólico potencial de 11.5 y 14 % v/v, corregido el pH a 3.5 con ácido *o*-fosfórico. Las especies no-*Saccharomyces* evaluadas fueron *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia membranefaciens*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata* y *Candida valida*. Como levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* se empleó la cepa 7VA (EnotecUPM, España), añadida al mosto tras una semana de fermentación con las levaduras no-*Saccharomyces*. Como cepas control de la especie *Saccharomyces cerevisiae* se emplearon las cepas AWRI796 (Maurivin, Australia), 7VA y TP2A16 (EnotecUPM, España) en fermentación pura.

En ambos estudios el grado alcohólico se determinó por cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción (HPLC-IR) y los azúcares residuales fueron analizados mediante test enzimático (Biosystems S.L., España).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 22 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* ensayadas, destacaron las cepas de levadura 7013 (*Torulaspota delbrueckii*), 938 (*Schizosaccharomyces pombe*), 980 (*Saccharomycodes ludwigii*), 981 (*Saccharomycodes ludwigii*), 1059 (*Kloeckera apiculata*) y 1334 (*Candida valida*) por su capacidad para reducir significativamente el grado alcohólico dando lugar a un vino seco (azúcares < 1.5 g l⁻¹) en fermentación secuencial con la cepa *Saccharomyces* 7VA (Figura 1).

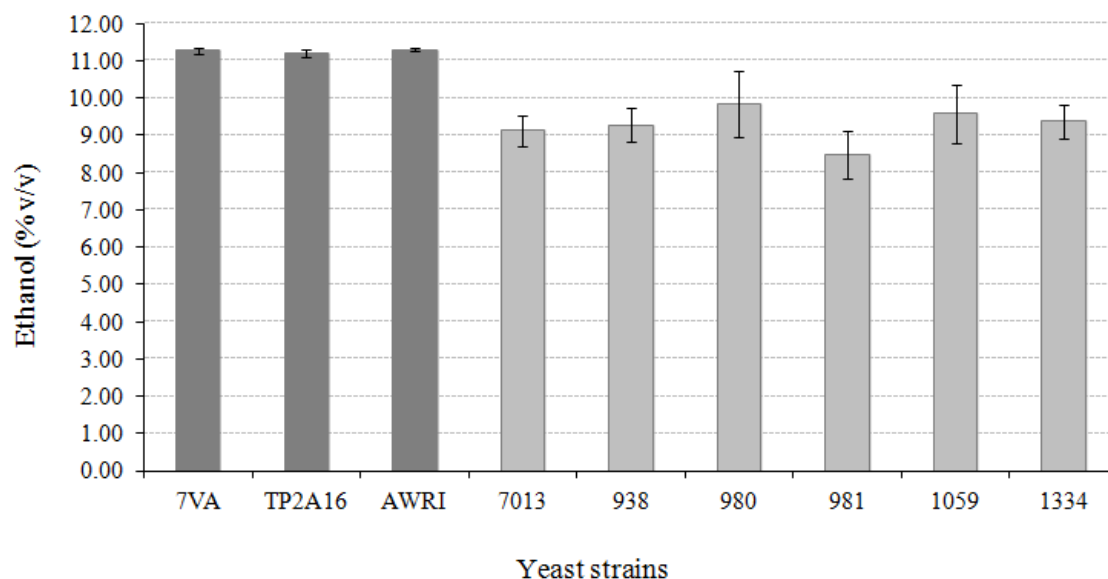


Figura 1. Grado alcohólico (% v/v) producido por las levaduras en fermentación secuencial a 23 °C y 11,5 % PAC.

La máxima reducción del grado alcohólico se alcanzó con la combinación de cepas *Saccharomyces ludwigii* (981) y *Saccharomyces cerevisiae* con un valor de 2.8 % v/v inferior con relación al grado alcohólico obtenido en las fermentaciones puras con las cepas control. Sin embargo, el aporte al perfil sensorial del vino que puede hacer esta especie no es el más interesante, debido a su producción de diacetilo (Suárez e Íñigo, 2003).

Por el contrario, la especie *Torulaspora delbrueckii* (7013) destaca en la bibliografía por la pureza de su perfil fermentativo (Ciani y Picciotti, 1995; Martinez *et al.*, 1990; Mauricio *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1991) y por su capacidad para corregir algunos defectos de los vinos como la acidez volátil (Languet *et al.*, 2005; Bely *et al.*, 2008). En nuestro estudio demuestra una buena aptitud para ser empleada durante las primeras etapas de la fermentación con el objetivo principal de atenuar el mosto (reducción del 2.2 % v/v).

La Tabla 1 muestra el efecto inhibitorio de la *o*-vainillina, que a una concentración de 20 mg l⁻¹ consigue reducir en un 0.34 y 0.25 % v/v la producción de etanol con las levaduras 7VA y AWRI796 respectivamente con respecto al control. Una dosis superior (50 mg l⁻¹), no parece ejercer el mismo efecto en ambas levaduras, pues en la levadura AWRI796 se reduce el grado alcohólico en un 0.54 % v/v, mientras que en la levadura 7VA la reducción es menor que a la dosis de 20 mg l⁻¹. Una dosis de 200 mg l⁻¹ de *o*-vainillina (datos no mostrados) inhibió totalmente el crecimiento celular y la producción de etanol en ambas levaduras, como ha sido reportado en trabajos previos (Larsson *et al.*, 2000).

Con respecto al glicolaldehído, el mayor efecto fue observado en la levadura AWRI796, en la cual a la dosis más alta, 200 mg l⁻¹, se consiguió reducir el grado alcohólico en un 0.95 % v/v, mientras que con la levadura 7VA tan sólo se logró reducir en un 0.30 % v/v.

Tabla 1. Contenido de etanol y azúcares residuales a diferentes concentraciones de *o*-vainillina y glicolaldehído adicionados al inicio de las fermentaciones con las levaduras 7VA y AWRI 796.

LEVADURA		BLOQUEADOR (mg l ⁻¹)	ETANOL (%v/v)	GLUCOSA (g l ⁻¹)	FRUCTOSA (g l ⁻¹)	REDUCCIÓN % v/v
<i>o</i> -Vainillina	7VA	0	14.52 ± 0.22 ^a	2.40 ± 1.46 ^a	0.00 ± 0.00	-
		20	14.18 ± 0.23 ^a	3.18 ± 1.60 ^{ab}	0.00 ± 0.00	0.34
		50	14.28 ± 0.06 ^a	4.71 ± 0.77 ^b	0.00 ± 0.00	0.24
(medio modelo 15.0 % v/v PAC)	AWRI796	0	13.27 ± 0.16 ^c	13.72 ± 1.48 ^c	0.12 ± 0.21 ^c	-
		20	13.02 ± 0.23 ^{cd}	13.50 ± 1.82 ^c	1.22 ± 1.94 ^c	0.25
		50	12.73 ± 0.23 ^d	11.55 ± 1.49 ^c	0.09 ± 0.19 ^c	0.54
Glicolaldehído	7VA	0	13.46 ± 0.13 ^a	0.26 ± 0.52 ^a	4.87 ± 2.64 ^a	-
		100	13.43 ± 0.39 ^a	0.89 ± 1.77 ^a	5.08 ± 4.70 ^a	0.03
		200	13.16 ± 0.35 ^a	1.14 ± 1.36 ^a	6.11 ± 4.64 ^a	0.30
(mosto 14.0 % v/v PAC)	AWRI796	0	13.88 ± 0.48 ^c	0.21 ± 0.42 ^c	5.78 ± 4.81 ^c	-
		100	13.60 ± 0.38 ^{cd}	0.00 ± 0.00 ^c	6.46 ± 3.79 ^c	0.28
		200	12.93 ± 0.37 ^d	0.27 ± 0.55 ^c	3.92 ± 4.84 ^c	0.95

Los promedios a diferentes concentraciones del bloqueador para cada levadura, con la misma letra, no son significativamente diferentes.

Con la *p*-benzoquinona (Tabla 2) el mayor efecto se observó a un grado alcohólico potencial de 12 % v/v, donde se logró una reducción de 0.85 % v/v a una dosis de 20 mg l⁻¹. Mientras que a un grado alcohólico potencial del 14 % v/v el efecto inhibitorio de esta molécula tan sólo reduce la producción de alcohol en un 0.37 % v/v. Mayores concentraciones no ejercen un efecto considerable en el grado alcohólico final.

Tabla 2. Efecto de la concentración azucarada del mosto en el contenido de etanol y azúcares residuales a diferentes concentraciones de *p*-benzoquinona adicionada al inicio de las fermentaciones con la levadura 7VA.

LEVADURA	PAC *	<i>p</i> -BENZOQUINONA (mg l ⁻¹)	ETANOL (%v/v)	AZÚCARES (g l ⁻¹) **	REDUCCIÓN % v/v
7VA	(mosto 12.0 % v/v)	0	10.94 ± 0.84 ^a	0.11 ± 0.05 ^a	-
		20	10.09 ± 0.16 ^a	0.48 ± 0.24 ^b	0.85
		100	9.90 ± 0.38 ^a	0.11 ± 0.04 ^a	1.04
	(mosto 14.0 % v/v)	0	13.40 ± 0.21 ^c	1.20 ± 0.12 ^c	-
		20	13.03 ± 0.20 ^c	1.76 ± 1.65 ^c	0.37
		100	13.32 ± 0.21 ^c	2.08 ± 1.55 ^c	0.08

* Grado alcohólico potencial.

** Azúcares totales.

Los promedios a diferentes concentraciones del bloqueador, con la misma letra, no son significativamente diferentes.

CONCLUSIONES

Tanto la fermentación secuencial con levaduras no-Saccharomyces como el empleo de bloqueadores metabólicos, son técnicas de vinificación potencialmente aptas para reducir el grado alcohólico del vino, pero que necesitan seguir siendo estudiadas y optimizadas para lograr resultados más extrapolables.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el MICINN (Proyecto AGL2008-05603-C02-01). Los autores agradecen a S. Somolinos and J. A. Sánchez (Dpto. Tecnología de Alimentos, ETSI Agrónomos, UPM) por su excelente asistencia técnica.

REFERENCIAS

- Ábalos, D., Vejarano, R., Morata, A., Gonzalez, C., Suarez-Lepe, J. A. 2011. The use of furfural as a metabolic inhibitor for reducing the alcohol content of model wines. *Eur. Food Res. Technol.* 232: 663-669.
- Bely, M., P. Stoeckle, I. Masneuf-Pomared y D. Dubourdieu. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122:312-320.
- Céline Raynal, Forbes Wardrop, Olivier Pillet, Perrine Languet, José Maria Heras, Ann Dumont y Anne Ortiz-Julien. 2010. Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-*Saccharomyces* y de una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una herramienta innovadora para el enólogo. Observatorio Español del Mercado del Vino (OEMV). Madrid, 16 p.
- Ciani, M. y G. Picciotti. 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotech. Letters* 17:1247-1250.
- Hansen, E. H., P. Nissen, P. Sommer, J. C. Nielsen y N. Ameborg. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Applied Microbiology* 91:541-547.
- Jayakody, L. N., Hayashi, N. & Kitagaki, H. (2011). Identification of glycolaldehyde as the key inhibitor of bioethanol fermentation by yeast and genome-wide analysis of its toxicity. *Biotechnology Letters*, 33, 285–292.
- Languet, P., A. Ortiz-Julien, E. Aguera, A. Samson et J. M. Salmon. 2005. Valorisation aromatique des moûts par l'utilisation séquentielle de levure d'espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. *Revue des OEnologues* 117:31-33.
- Larsson, S.; Quintana-Sáinz, A.; Reimann, A.; Nilvebrant, N.-O.; Jönsson, L. 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84–86, 617 – 632.
- Martinez, J., F. Toledano, C. Millán y J. M. Ortega. 1990. Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from Pedro Ximenez grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food microbiology* 7:217-225.
- Mauricio, J. C, S. Guijo y 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.
- Modig T., G. Liden, M. J. Taherzadeh. 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and piruvate dehydrogenase. *Biochem. Journal.*, 363, 769-776.
- Moreno, J. J., C. Millán, J. M. Ortega y M. Medina. 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Ind. Microbiol.* 7(3):181-190.
- Plata, C., C. Millán, 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.

Suárez, J.A. y Ínigo, B. (2003). Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación. Tercera edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. P 281-288.

Zironi, R., P. Romano, G. Suzzi, F. Battistutta y 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.