

Nuevos avances en el conocimiento de los Preparados de Levaduras Secas Inactivas y sus aplicaciones industriales

Inmaculada Andújar-Ortiz, M. Ángeles del Pozo-Bayón, Juan José Rodríguez-Bencomo, Pedro J. Martínez-Álvarez, M. Victoria Moreno-Arribas*

*Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM). Nicolás Cabrera, 9. Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid, Spain
Email: victoria.moreno@csic.es*

ABSTRACT

Inactive Dry Yeast (IDY) preparations are usually used in the winemaking industry to enhance the fermentative processes and the sensory characteristics of wines. Due to the lack of scientific studies dealing with their effects in wine, this work presents an integrate information of the data obtained in our laboratory about commercial IDY preparations. These studies have mainly focused on the effect of the addition of IDYs in the release of soluble compounds and in the volatile compounds in model wines. Additionally, it has been determine the effect of IDY addition on the sensory characteristics of industrially manufactured rosé wines. Finally, due to the importance of malolactic fermentation in winemaking, the role of specific components of IDY on the growth of lactic acid bacteria has been determined. To sum up, the results presented in this work provide a better understanding of the action mode of IDY preparations, their main differences depending on the type of IDY, and the effect of their addition in wine quality.

RESUMEN

Los preparados de levaduras secas inactivas (LSI) se emplean en la industria enológica para mejorar los procesos fermentativos y las características sensoriales de los vinos. Debido a la falta de estudios científicos sobre estos preparados de LSI, en este trabajo se presentan los resultados más relevantes obtenidos en nuestro laboratorio sobre el efecto de su adición en los vinos. Los estudios realizados se han centrado en el efecto de la adición de preparados de LSI en la liberación de compuestos solubles y en el aroma en medios vínicos, así como el efecto sobre las características sensoriales de vinos rosados elaborados a escala industrial. Por último, y debido a la importancia de la fermentación maloláctica en la elaboración de los vinos, se ha estudiado el papel de componentes específicos de los preparados de LSI en el crecimiento de las bacterias lácticas. En conjunto, los resultados presentados aportan información sobre el modo de acción de estos preparados, las principales diferencias entre ellos, y sus efectos en la calidad de los vinos elaborados.

INTRODUCCIÓN

El empleo de preparados de levaduras secas inactivas (LSI) se ha generalizado en la industria enológica con el fin de mejorar los procesos fermentativos y las características sensoriales de los vinos (Pozo-Bayón et al., 2009a). Estos preparados se obtienen por crecimiento de la levadura vínica *Saccharomyces cerevisiae* en un medio rico en azúcares, y posterior inactivación y secado para obtener el producto en forma de polvo. Su composición puede incluir una fracción soluble procedente del citoplasma de la levadura (péptidos, aminoácidos, proteínas) y una fracción insoluble compuesta principalmente por las paredes celulares. Dependiendo de su composición, estos preparados de LSI están indicados para distintas aplicaciones. A modo de ejemplo, los preparados de LSI recomendados para evitar la oxidación de los vinos incluyen en su composición glutatión (GSH), un tripéptido de origen

no proteico, con propiedades antioxidantes. Sin embargo, aunque el empleo de los preparados de LSI está muy extendido en la industria enológica, existen pocos estudios científicos sobre sus efectos en el vino. En el presente trabajo se presentan los resultados más relevantes obtenidos en nuestro laboratorio sobre la caracterización de preparados de LSI comerciales, así como sus efectos en el desarrollo de bacterias lácticas y en las características organolépticas de los vinos. El objetivo final es proporcionar información sobre los efectos de estos preparados de LSI para una mejor aplicación durante la elaboración del vino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparados de LSI empleados

Se han empleado siete preparados de LSI procedentes de dos casas comerciales distintas, cuyas principales características se presentan en la Tabla 1.

Tab. 1. Preparados comerciales de LSI utilizados en este trabajo, aplicación, proveedores, composición y vino para el que están indicados

Preparado	Aplicación	P ^a	Composición ^b	Vino ^{b,c}
LSI1	Mejorante de calidad organoléptica	1	Levaduras inactivas seleccionadas por su contenido en polisacáridos + enzimas pectolíticas	T
LSI2	Mejorante de la calidad organoléptica	1	Levaduras inactivas seleccionada por su alto contenido en glutatión + pectinasa + β -glicosidasa	B/R
LSI3	Mejorante de la calidad organoléptica	1	Levaduras inactivas con alto contenido en polisacáridos	T
LSI4	Mejorante de la calidad organoléptica	1	Levadura inactiva específica con alto contenido en glutatión	B/R
LSI5	Activador de la fermentación	2	Levaduras autolisadas	B/T
LSI6	Mejorante de la calidad organoléptica	2	Levaduras autolisadas seleccionada por su capacidad de liberar polisacáridos y glutatión	B/T
LSI7	Mejorante de la calidad organoléptica	2	Levaduras autolisadas enriquecidas en glutatión	B/R

^a: proveedor; ^b: según las especificaciones del fabricante; ^c: Tipo de vino: B, vino blanco; R: vino rosado; T: vino tinto

Análisis de la composición volátil por HS-SPME-GC-MS

La muestra se depositó en un vial de SPME, y se tapó herméticamente. El vial se colocó dentro de un baño termostático, y la extracción se realizó exponiendo una fibra PDMS/Carboxen de 85 μ m de espesor de fase (Supelco, Bellefonte, PA, USA) en el espacio de cabeza del vial. Tras el tiempo de extracción, los compuestos volátiles se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

Obtención de extractos de preparados de LSI con solventes presurizados (PLE)

La extracción con solventes presurizados (PLE) de los preparados de LSI se llevó a cabo empleando un extractor ASE (ASE 200, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Las condiciones de la extracción están descritas en Andujar-Ortiz y colaboradores (Andujar-Ortiz et al. 2010). Los extractos obtenidos se llevaron a sequedad por liofilización o evaporación.

Determinación de la actividad de extractos de LSI sobre el crecimiento de las bacterias lácticas

Para la determinación de la actividad de los extractos obtenidos por PLE, se reconstituyeron en medio de cultivo a distintas concentraciones. Posteriormente, se ensayó su actividad frente a 3 especies bacterianas (*Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus pentosaceus*). Para ello, los extractos y los medios de cultivo control se prepararon en placas multipocillo y se inocularon con las bacterias (Andujar-Ortiz et al., 2010). Tras un tiempo de incubación se midió la densidad óptica de los pocillos a 520 nm, y se calculó la actividad de los extractos según la fórmula: $\% \text{ actividad} = (D.O._{\text{extracto}} - D.O._{\text{control}}) / D.O._{\text{control}} \times 100$; donde $D.O._{\text{extracto}}$ es la densidad óptica del extracto, y $D.O._{\text{control}}$ la densidad óptica del control. De esta manera, valores positivos de este ratio indican estimulación del crecimiento bacteriano, y negativos inhibición.

Composición química de extractos de LSI

La composición química de los extractos de LSI (obtenidos por PLE) se determinó en los extractos disueltos en su solvente original a la concentración de 10 mg/mL. Las determinaciones realizadas fueron: monosacáridos libres y procedentes de polisacáridos, aminoácidos libres, ácidos grasos y la composición volátil empleando los protocolos descritos en Andujar-Ortiz y colaboradores (Andujar-Ortiz et al., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de preparados de LSI según su capacidad para liberar compuestos solubles

Los medios vínicos se suplementaron con 6 preparados de LSI a una dosis de 0,4 g/L, y se mantuvieron en incubación (37 °C). A los distintos tiempos de muestreo (2 y 9 días) se separó el preparado de LSI mediante centrifugación, y en los sobrenadantes se determinaron las concentraciones de compuestos nitrogenados (aminoácidos libres, péptidos, proteínas, compuestos nitrogenados de alto peso molecular) y polisacáridos. Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 1). Como se puede observar, se distinguieron claramente 3 grupos de medios vínicos según el preparado de LSI añadido. El primer grupo, con valor negativo de la CP1 y positivo para la CP2 se correspondió con los medios vínicos suplementados con los preparados LSI1 y LSI3, formulados para vinos tintos. Éstos se caracterizaron por presentar las concentraciones más altas de tirosina, metionina, fenilalanina, isoleucina y leucina. El segundo grupo de medios vínicos con valores positivos para la CP1 y negativos para CP2 incluyó los preparados LSI2 y LSI4, indicados para vinos blancos y rosados, y que mostraron una mayor concentración de nitrógeno de aminoácidos, ácido glutámico, ornitina y glutamina. Por último, el tercer grupo incluyó los medios vínicos suplementados con los preparados LSI5 y LSI6, que presentaron una mayor concentración de glutamina. Por último, cabe destacar que el tiempo de contacto del preparado con el medio vínic (2 y 9 días) apenas afectó a la composición de dichos medios, por lo que cabe suponer que la liberación de compuestos solubles por los preparados de LSI tiene lugar inmediatamente tras su puesta en contacto con el medio vínic.

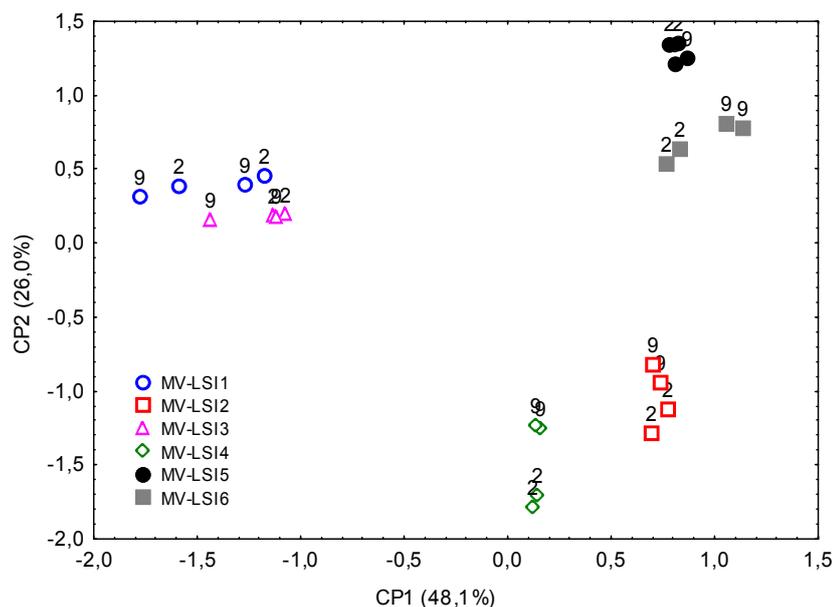


Fig. 1. Gráfico de los medios vínicos (MV) suplementados con preparaciones comerciales de LSI (0,4 g/L) tras 2 y 9 días de contacto, definido por las dos primeras componentes principales

Efecto de los preparados de LSI sobre la volatilidad de los compuestos del aroma de los vinos

Para determinar el efecto de los preparados de LSI sobre la volatilidad de los compuestos del aroma de los vinos, se prepararon medios vínicos dopados con 7 compuestos del aroma de los vinos, con y sin adición de preparado de LSI1 y a dos dosis distintas (0,4 y 0,8 g/L). Los medios vínicos se mantuvieron en incubación (37 °C), determinando a los distintos tiempos de muestreo (2, 6, 9 y 13 días) la cantidad de compuestos volátiles en el espacio de cabeza mediante HS-SPME (condiciones descritas por Pozo-Bayón et al. 2009b). Tras el análisis de los datos, se determinaron los ratios de volatilidad, calculados como el $\frac{\text{Área absoluta}_{\text{MV-LSI}}}{\text{Área absoluta}_{\text{MV-Cont}}}$, de manera que ratios menores a 1 indican un efecto de retención de los compuestos volátiles, mientras que ratios superiores a 1 indican un incremento de la cantidad de compuestos volátiles liberados al espacio de cabeza (efecto "salting-out").

La Tabla 2 muestra los ratios de volatilidad obtenidos para cada compuesto a las dos dosis ensayadas y a los distintos tiempos. Se observa claramente el efecto del tiempo de contacto del preparado con el medio vínico en algunos compuestos volátiles, como butanoato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y 1-hexanol. Concretamente, los tiempos de contacto más cortos (2 y 6 días) estuvieron relacionados con un efecto "salting-out" mientras que a tiempos de contacto más largos (9 y 13 días) se produjeron efectos de retención de compuestos del aroma por el preparado de LSI. A diferencia del tiempo de contacto, la dosis de preparado de LSI adicionada a los medios vínicos influyó en menor medida en la volatilidad de los compuestos del aroma.

Tab. 2. Ratios de volatilidad (Media±desviación estándar) obtenidos para cada compuesto del aroma en medios vínicos suplementados con el preparado LSI1 tras tiempos de contacto diferentes (n=3)^a

Compuestos del aroma	Dosis LSI (g/L)	Tiempo (días)			
		2	6	9	13
Butanoato de etilo	0,4	a1,06 b±0,01	b 1,11 b±0,01	a0,92a±0,05	b0,95a±0,05
	0,8	a1,05b±0,05	a1,04b±0,04	a0,90ab±0,09	a0,76a±0,12
Acetato de isoamilo	0,4	a1,09 b±0,03	a1,18 b±0,02	a1,00ab±0,12	a0,86a±0,10
	0,8	a1,01ab±0,07	a1,13b±0,06	a0,94ab±0,10	a0,73a±0,12
Hexanoato de etilo	0,4	a1,21 b±0,08	b1,52 c±0,13	a0,96ab±0,13	b0,80 a±0,04
	0,8	a1,27b±0,22	a1,14b±0,08	a0,89ab±0,11	a0,61 a±0,07
1-Hexanol	0,4	a1,06 b±0,02	a0,95ab±0,06	a0,87 a±0,03	a0,89a±0,06
	0,8	a1,03a±0,21	a0,92a±0,04	a0,84a±0,09	a0,86a±0,10
Linalol	0,4	a1,04b±0,06	a0,92ab±0,08	a0,92ab±0,06	a0,77a±0,14
	0,8	a1,00a±0,18	a0,90a±0,05	a0,91a±0,12	a0,86a±0,13
Acetato de feniletilo	0,4	a1,02a±0,07	a1,03a±0,12	a0,99a±0,16	a0,89a±0,10
	0,8	a1,19a±0,25	a0,92a±0,13	a0,88a±0,08	a0,81 a±0,06
β-Ionona	0,4	a0,93a±0,06	a0,88a±0,10	a0,79a±0,13	a0,73 a±0,09
	0,8	a0,98a±0,25	a0,77a±0,09	a0,66a±0,12	a0,69 a±0,11

^a Letras a la derecha indican diferencias significativas entre valores a distintos tiempos de contacto. Letras a la izquierda indican diferencias significativas entre valores a diferentes concentraciones del preparado LSI1 (p<0,05). Los ratios en negrita indican que son diferentes de 1 (p<0,05)

Perfil volátil de preparados de LSI y liberación de compuestos volátiles a medios vínicos

Se determinó el perfil volátil del preparado LSI1 con el fin de conocer la potencial liberación de compuestos odorantes por preparados de LSI a medios vínicos. Para ello, se realizó la extracción (PLE) empleando hexano como solvente, a temperatura de 150 °C y una presión de 1500 psi (Pozo Bayón et al., 2009c). Los extractos obtenidos se inyectaron en un GC-MS a concentración de 10 mg de extracto seco/mL hexano. La Tab. 3 presenta los compuestos volátiles identificados y sus áreas normalizadas. En total se identificaron un total de 35 compuestos volátiles, entre los que cabe destacar productos de la reacción de Maillard, como las pirazinas, que presentan bajos umbrales de percepción. Sin embargo, su presencia en los extractos podía deberse a su formación debido a las altas temperaturas en que tiene lugar la extracción PLE (150 °C), por lo que adicionalmente se determinó la composición volátil del preparado directamente en el polvo mediante HS-SPME a 40 °C (Pozo-Bayón et al., 2009c). Los resultados obtenidos por HS-SPME, incluidos en la Tabla 3, mostraron la presencia de los productos de la reacción de Maillard, y por tanto, confirmaron que estos compuestos están originalmente en los preparados, probablemente debido a las altas temperaturas a que son sometidos durante las etapas de secado.

En este estudio se observó que el preparado de LSI a la dosis empleada en vinificación libera pirazinas a los medios vínicos (Pozo-Bayón et al., 2009c). Sin embargo, se necesitan más trabajos científicos que determinen la concentración de las pirazinas liberadas así como la posible modificación de las características sensoriales de los vinos.

Tab. 3. Compuestos volátiles identificados en los extractos de LSI obtenidos por PLE empleando hexano, y directamente en el polvo de preparado mediante la técnica HS-SPME

TR	Compuestos	IRexp ^a	IRlit ^b	% ^c Hexano 150°C	HS-SPME
1,73	Etanol				x
1,82	2-propanona	500	476		x
2,08	2-metilpropanal	552	552		x
2,32	2-butanona	600	597		x
2,9	3-metilbutanal	644	678		x
3,06	2-metilbutanal	657	682		x
5,1	1H-pirrol	746	771		x
7,55	Metilpirazina	810	828		x
8,68	2-methyl-1H-pirrol	825			x
8,99	Alcohol furfúrico	829	852		
11,25	2,5-dimetilpirazina	908	913	0,91 ± 0,02	x
13,64	Dimetiltrisulfido	963	974	0,11 ± 0,03	
15,07	2-etil-6-metilpirazina	997		0,17 ± 0,01	
15,16	2-etil-5-metilpirazina	998	993	0,24 ± 0,01	x
15,22	2,3,5-trimetilpirazina	1000	1000	1,41 ± 0,07	x
17,67	2-acetilpirrol	1060	1060	0,15 ± 0,01	x
18,14	2-pirrolidona	1072	1076	4,97 ± 0,32	x
18,6	2-etil-3,5-dimetilpirazina	1082	1083	2,91 ± 0,21	x
19,13	Isopropilmetoxipirazina	1096	1097	0,39 ± 0,03	x
21,3	2,3-dietil-6-metilpirazina	1153	1158	0,15 ± 0,01	x
21,46	3,5-dietil-2-metilpirazina	1157	1160	0,41 ± 0,01	x
23,79	Benzotiazol	1220	1221	0,23 ± 0,03	
27,10	2,5-dimetil-3-isopentilpirazina	1314	1315	0,96 ± 0,04	x
44,09	Éster metílico del ácido 9-hexadecenoico	1904	1892		
44,6	Éster metílico del ácido hexadecanoico	1925	1926		
45,25	Ácido 9-hexadecenoico (ácido palmitoleico)	1951	1948	46,67 ± 1,24	x
45,64	Ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	1967	1967	13,52 ± 0,55	x
45,79	Éster etílico del ácido 9-hexadecenoico	1973	1977	4,73 ± 0,48	
46,2	Éster etílico del ácido hexadecanoico	1989	1993	0,67 ± 0,02	
46,47	Eicosano	2000			
48,99	Éster metílico del ácido 9-octadecenoico	2094	2103		
50,39	Ácido 9-octadecenoico (Z) (ácido oleico)	2142	2143	16,54 ± 0,15	
50,99	Ácido octadecanoico (ácido esteárico)	2163	2164	2,21 ± 0,26	
51,09	Éster etílico del ácido 9-octadecenoico (Z)	2166	2179	2,66 ± 0,74	
51,9	Éster etílico del ácido octadecanoico (Z)	2194	2193		

^a Índices de retención lineal calculados experimentalmente con una mezcla de alcanos (C5-C30); ^b Índices de retención lineal publicadas en la base de datos NIST <http://www.webbook.nist.gov/chemistry>; ^c Áreas de pico normalizadas= (Área compuesto volátil / Área total de compuestos volátiles) x 100

Efecto de un preparado de LSI rico en glutatión sobre las características sensoriales de vinos rosados elaborados a escala industrial

Para conocer el efecto de un preparado de LSI rico en glutatión sobre las características sensoriales de los vinos, se elaboraron dos tipos de vinos rosados de Garnacha, un vino al que se adicionó el preparado LSI7 a dosis de 20 g/HL y un control sin adición de preparado de LSI, en una bodega de la D.O. Navarra (España). Una vez elaborados los vinos, se realizó el análisis sensorial con un panel formado por 12 catadores mediante pruebas triangulares a lo largo de la vida útil del vino (1, 2, 3, y 9 meses). Los resultados no mostraron diferencias en los vinos hasta los 9 meses de su vida útil. En ese momento, se realizó un análisis descriptivo de ambos vinos, comprobándose que el vino con el preparado rico en glutatión presentaba mayor intensidad aromática a notas afrutadas como “fresa” y “plátano”, y menor intensidad a “levadura” (Fig. 2). Puesto que las notas afrutadas se asocian con los vinos jóvenes, se puede concluir que el aroma de los vinos elaborados con el preparado de LSI evolucionó más lentamente que el de los vinos control a lo largo de su vida útil. Estas diferencias podrían deberse, al menos en parte, a un efecto antioxidante del glutatión cedido por el preparado LSI7 (Tabla 1).

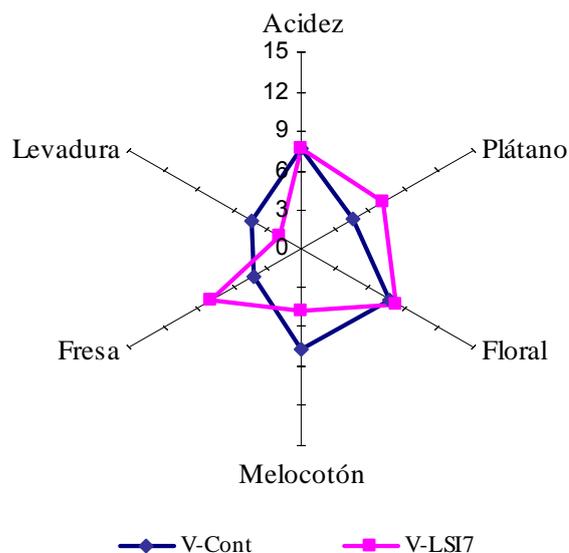


Fig. 2. Perfiles aromáticos de vinos rosados de Garnacha control (V-Cont) y elaborados con el preparado LSI7 rico en glutatión (V-LSI7)

Papel de componentes específicos de los preparados de LSI en el crecimiento de las bacterias lácticas del vino

En este estudio se realizaron extracciones PLE con distintos solventes (agua, etanol y hexano), que permitieron obtener extractos de preparados de LSI con distinta composición. La actividad de los extractos se ensayó frente a tres especies bacterianas (*L. hilgardii*, *P. pentosaceus* y *O. oeni*) para conocer el efecto de los extractos en su crecimiento. Los resultados mostraron importantes diferencias en las actividades dependiendo del tipo de solvente empleado; mientras que los extractos obtenidos con hexano en general inhibieron el crecimiento de las bacterias lácticas (mostraron actividades con valor negativo), los obtenidos con agua lo estimularon (actividades con valor positivo), y los obtenidos con etanol mostraron un comportamiento intermedio. Además, el preparado de LSI empleado determinó en gran medida la actividad de los extractos. A modo de ejemplo, la Fig. 3 muestra la actividad de los extractos obtenidos con agua (a) y etanol (b) de distintos preparados de LSI sobre el crecimiento de *O. oeni*.

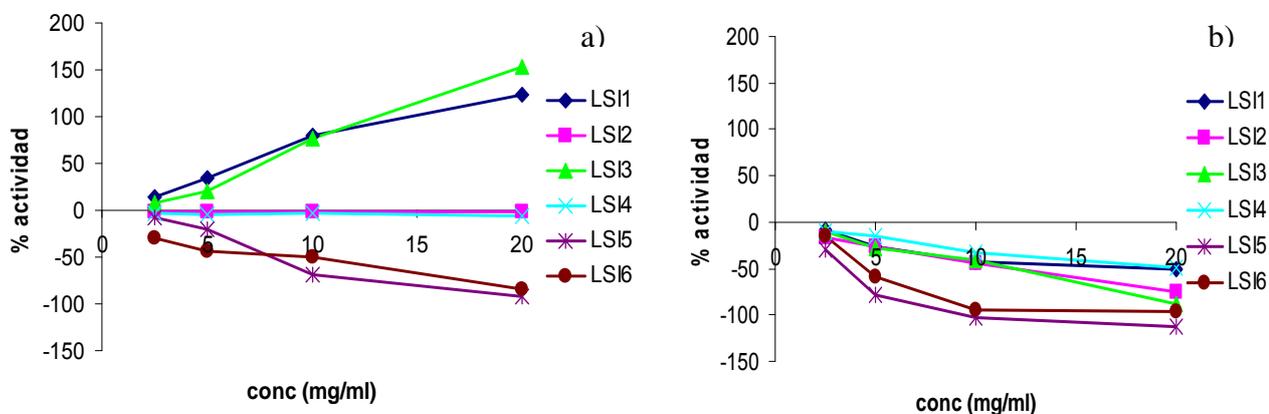


Fig. 3. Actividad (%) de los extractos de preparados de LSI sobre el crecimiento de *O. oeni* obtenidos a) empleando agua como solvente; b) empleando etanol como solvente. Valores positivos indican estimulación y negativos inhibición.

Con el fin de elucidar el papel de los componentes de preparados de LSI involucrados en la estimulación y/o inhibición del crecimiento de las bacterias lácticas, se procedió a la caracterización química de los extractos de preparados con actividades más diferentes (i.e. LSI1 y LSI5). Los resultados obtenidos sugieren que los monosacáridos libres y aminoácidos libres presentes en los preparados de LSI pueden ser los responsables de la estimulación del crecimiento bacteriano, mientras que los ácidos grasos de cadena corta y compuestos de la reacción de Maillard podrían estar relacionados con la inhibición del crecimiento bacteriano (Andújar-Ortiz et al., 2010).

CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo muestran la capacidad de los preparados de LSI para modificar la composición volátil y no volátil de los vinos. Asimismo, se ha mostrado que la composición de los preparados de LSI determina en gran medida su efecto en el crecimiento de las bacterias lácticas del vino. En este sentido, los efectos observados dependen del tipo de preparado de LSI, lo que indica que existen importantes diferencias en las condiciones de fabricación de estos productos enológicos (cepa de levadura, medio de cultivo, etc). Por último, el estudio realizado en vinos elaborados a escala industrial, ha permitido confirmar que la adición de un preparado de LSI rico en glutatión modifica las características sensoriales de los vinos.

BIBLIOGRAFÍA

- Andújar-Ortiz I., Pozo-Bayón MA., García-Ruiz A., Moreno-Arribas MV., 2010. Role of specific components from commercial inactive dry yeast winemaking preparations on the growth of wine lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8392-8399.
- Pozo-Bayón MA., Andújar-Ortiz I., Moreno-Arribas MV., 2009a. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Research International*, 42, 754-761.
- Pozo-Bayón MA., Andújar-Ortiz I., Alcaide-Hidalgo JM., Martín-Álvarez PJ., Moreno-Arribas MV., 2009b. Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for enological use based on their ability to release soluble compounds and their behaviour towards aroma compounds in model wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10784-10792.
- Pozo-Bayón MA., Andújar-Ortiz I., Moreno-Arribas MV., 2009c. Volatile profile and potential of inactive dry yeast based winemaking additives to modify the volatile composition of wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1665-1673.