

GUÍA SOBRE LA UTILIZACIÓN DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES EN LA ELABORACIÓN DE VINO



Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología

AUTORES

Pilar Blanco Camba (EVEGA-Galicia)

*Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia (EVEGA-INGACAL)
Ponte San Clodio, 32427, Leiro, OURENSE. Tfno: 988488033.
E-mail: pilar.blanco.camba@xunta.es*

Belén Puertas García (IFAPA-Andalucía)

*Centro Rancho de la Merced. Junta de Andalucía. Carretera de Trebujena, Km. 3.2. 11.471
Jerez de la Frontera. Tfno: 671560352.
E-mail: mariab.puertas@juntadeandalucia.es*

Ernesto Franco Aladren (Gobierno de Aragón)

*Unidad de Tecnología Vegetal. Gobierno de Aragón. Av. de Movera 50194 ZARAGOZA.
Tfno: 976586500.
E-mail: efranco@aragon.es*

Pedro Miguel Izquierdo Cañas (IVICAM-Castilla-La Mancha)

*Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha, Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700
Tomelloso (Ciudad Real). Tfno: 926508060.
E-mail: pmizquierdo@jccm.es*

Silvia Pérez Magariño (ITACYL-Castilla y León)

*Instituto Tecnológico Agrario de la Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura y
Ganadería. Crta. de Burgos Km. 119. Finca Zamadueñas, 47071, VALLADOLID.
Tfno: 983415245.
E-mail: permaqsi@itacyl.es*

Anna Puig Pujol/M^a Carme Masqué Tell (INCAVI-Cataluña)

*Secció d'Investigació Enològica. INCAVI (Institut Català de la Vinya i el Vi). Departament
d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. Plaça Àgora, 2-3 | 08720 |
Vilafranca del Penedès |Tfno: 938900211.
E-mail: apuigpujol@gencat.cat*

Emiliano Zamora de Alba/Manolo Ramírez Fernández (Estación Enológica-Extremadura)

*Estación Enológica, Consejería de Agricultura, Medio Ambiente, Desarrollo Rural y Energía.
Junta de Extremadura. Almendralejo, Badajoz. Tfno: 924017201.
E-mail: emiliano.zamora@adr.juntaex.es
Departamento de Ciencias Biomédicas Área de Microbiología, Edificio Juan Remón Camacho,
Avda. de Elvas s/n. 06071 Badajoz. mramirez@unex.es*

Teresa Arroyo Casado(IMIDRA Madrid)

*IMIDRA. Departamento de Investigación Agroalimentaria. Ctra. A2, Km 38,200. Alcalá de
Henares 28800. Madrid. Tfno: 918879486.
E-mail: teresa.arroyo@madrid.org*

Julián Suberviola Ripa (Departamento DRMAyAL-Navarra)

*Sección de Fomento Vinícola. Departamento de Desarrollo Rural Medio Ambiente y
Administración Local. C/ Valle de Orba 34, 31 390 OLITE, Navarra. Tfno: 948741707.
E-mail: julian.suberviola.ripa@cfnavarra.es*

Manu Lauzirika Alonso (BFA-DFB-País Vasco)

*Barazkigintza eta Landare Zaintzako Ataleko burua B.F.A. Jefe de sección de Hortofruticultura
y Protección vegetal. Diputación Foral de Bizkaia (D.F.B.) Tfno: 944066882.
E-mail: manu.lauzirika@bizkaia.net*

Juana Martínez García (ICVV-CIDA-Rioja)

*Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agroalimentario de La Rioja (CIDA). Instituto
de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja. CSIC. Universidad de La Rioja. Ctra.
Mendavia-Logroño NA-134 Km. 88. 26071 Logroño (La Rioja). Tfno: 941291833.
E-mail: enologia.cida@larioja.org*

ÍNDICE

Consideraciones generales

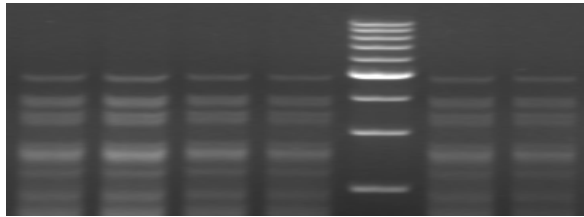
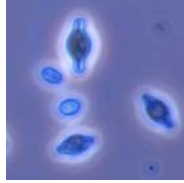
1. Introducción.....	1
2. Evolución de la población de levaduras durante la fermentación.....	1
3. Levaduras comerciales: ventajas e inconvenientes.....	3
4. Potencial de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> para la elaboración de vino.....	5
5. Levaduras comerciales no- <i>Saccharomyces</i>	7
6. Utilización de varias levaduras: protocolos de coinoculación.....	9
7. Bibliografía.....	10

Investigación realizada con levaduras no-*Saccharomyces*

en distintas comunidades

1. Andalucía.....	15
2. Aragón.....	18
3. Castilla-La Mancha.....	21
4. Castilla-León.....	23
5. Cataluña.....	25
6. Extremadura.....	40
7. Galicia.....	47
8. Madrid.....	53
9. Navarra.....	58
10. País Vasco.....	78
11. Rioja.....	80

Conclusiones.....	86
--------------------------	-----------



CONSIDERACIONES GENERALES

1. Introducción

El vino es una bebida compleja que incluye unos 800 compuestos que definen sus características organolépticas (Rapp, 1990). Su composición incluye metabolitos de origen varietal, pre-fermentativo, fermentativo y post-fermentativo. Los compuestos varietales son característicos de la variedad de uva y, a su vez, dependen de factores como el suelo, clima, prácticas de viticultura, estado sanitario, maduración, etc. Los constituyentes pre-fermentativos se forman durante las operaciones de procesado de la uva hasta la fermentación. A continuación, durante el proceso de fermentación alcohólica y maloláctica se originan los compuestos fermentativos por la actividad de los microorganismos ligados a la fermentación. Finalmente, durante la conservación del vino y/o en las etapas de envejecimiento en barrica tienen lugar diversas transformaciones químicas que originan los compuestos post-fermentativos (Bayonove et al., 2000; Lambrechts and Pretorius, 2000).

La fermentación del mosto de uva para la elaboración de vino constituye un complejo proceso microbiológico y bioquímico en el que las levaduras, responsables de la fermentación alcohólica, juegan un papel clave transformando los azúcares del mosto en etanol, dióxido de carbono y un gran número de otros productos secundarios (Fleet y Heard, 1993). Estos compuestos secundarios, aunque minoritarios, son importantes desde el punto de vista sensorial. Entre ellos se incluyen alcoholes superiores, ácidos volátiles, ésteres, compuestos carbonílicos, fenoles volátiles, compuestos que contienen azufre y tioles. Además, cuando es necesario, la fermentación maloláctica, llevada a cabo por las bacterias lácticas, no solo contribuye a la desacidificación del vino sino que produce compuestos que mejoran el perfil sensorial del vino (Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005).

2. Evolución de la población de levaduras durante la fermentación

La diversidad de levaduras presentes en el mosto procede tanto de la microflora existente en las uvas como de la población residente en las instalaciones y equipos de la bodega. Así, las levaduras apiculadas (*Koecchera apiculata* y/o su equivalente sexual *Hanseniaspora uvarum*) son las levaduras predominantes en uva y mosto, seguidas de especies de *Candida* (fundamentalmente *Candida pulcherrima* y/o su equivalente sexual *Metschnikowia pulcherrima*, *C. stellata*), levaduras formadoras de velo como *Pichia* sp (*P. membranifaciens*), *Debaryomyces*, y, en menor medida, *Hansenula* (*H. anomala*),

Kluyveromyces, *Brettanomyces*, *Cryptococcus* y la levadura rosa *Rhodotorula minuta* (Fleet, 1993; Pretorius, 2000; Suárez Lepe e Iñigo Leal, 2004; Jolly et al., 2006)

Curiosamente, la levadura fermentativa *Saccharomyces* aparece con una frecuencia muy baja en uva (Martini, 1993). Por ello, existe una controversia sobre el origen de *S. cerevisiae*; mientras unos creen que la fuente primaria de la misma es el viñedo (Török et al., 1996), otros son partidarios de que está asociada a ambientes como las bodegas y a la mano del hombre (Martini, 1993; Vaughan-Martini y Martini, 1995).

Numerosos estudios realizados sobre la dinámica de la población microbiana en fermentaciones espontáneas han puesto de manifiesto que durante la fermentación tiene lugar una sucesión secuencial de levaduras. Así, al inicio del proceso coexisten distintas especies de levaduras fundamentalmente de los generos *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Candida*, y *Metschnikowia* pero, a medida que avanza la fermentación y aumenta la concentración de etanol 3-4 %, estas levaduras son sustituidas por levaduras del género *Saccharomyces*, más tolerantes al etanol y con mayor poder fermentativo, que acaban dominando la fermentación (Fleet y Heard, 1993; Pretorius, 2000; Jolly et al., 2006). Otras levaduras como *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces* también pueden estar presentes durante la fermentación y/o en el vino y, algunas de estas especies están asociada a posibles defectos en el vino (Pretorius, 2000; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003).

Además, desde la década de los 90, el desarrollo de las técnicas de biología molecular permite la diferenciación a nivel de cepa dentro de la especie *S. cerevisiae*. Esta herramienta ha puesto de manifiesto que, al igual que ocurre a nivel de especies de levadura, también se produce una sucesión secuencial de cepas de *Saccharomyces* durante la fermentación a medida que aumenta la concentración de alcohol (Querol et al. 1994; Egli et al. 1998). Aunque al inicio de la fermentación están presentes varias cepas, su diversidad va disminuyendo a medida que avanza el proceso y, al final, solo una o un número bajo de ellas son las que dominan el proceso. Diversos estudios han demostrado que estas levaduras responsables de la fermentación repercuten de forma notable en las características finales del vino y sus propiedades sensoriales (Egli et al., 1998; Swiegers et al., 2005). Probablemente por ello, en las últimas décadas, se ha extendido la práctica de inocular levaduras comerciales frente a las fermentaciones que tradicionalmente se realizaban de forma espontánea, porque garantizan el control de la fermentación y la obtención de un producto final de calidad, evitando los riesgos de defectos organolépticos y/o paradas fermentativas que pueden ocurrir durante una fermentación espontánea.

3. Levaduras comerciales: ventajas e inconvenientes

Las dos primeras levaduras secas activas (LSA) se comercializaron en 1965 en respuesta a las necesidades de una bodega californiana. Estas dos cepas, Montrachet and Pasteur Champagne y otras (llamadas levaduras secas de de primera generación), se ofertaron por todo el mundo para todo tipo de fines, pero con éxito limitado. Pronto se hizo obvia la necesidad de seleccionar cepas de levaduras adaptadas a regiones determinadas y a variedades de uva concretas (Degre, 1993). Estas nuevas levaduras presentaban propiedades tecnológicas que contribuían a fomentar calidad del vino como la capacidad de fermentación a bajas temperaturas, actividad killer o producción de ciertos compuestos aromáticos, entre otras (Tabla 1) (Degre, 1993; Suárez Lepe e Iñigo Leal, 2004). Estas levaduras se conocen como levaduras vínicas de segunda generación.

Tabla 1. Algunas propiedades tecnológicas para levaduras de uso en Enología

<i>Propiedades deseables</i>	<i>Propiedades indeseables</i>
Alta tolerancia al alcohol	Producción de SO ₂
Ausencia de problemas de acabado (consumo total de azúcares ⁹)	Producción de SH ₂
Resistencia a SO ₂	Producción de acidez volátil
Fermentación a baja temperatura	Producción de acetaldehído y piruvato
Corto período de adaptación durante la deshidratación (rápido arranque)	Formación de espuma
Regularidad fermentativa	Formación de precursores de etil carbamato
Resistencia a estrés fermentativo	Producción de polifenol oxidasas
Degradación de ácido málico	
Producción de glicerol	
Potenciación de aromas varietales (Producción de β-glucosidasa)	
Actividad killer	

Más recientemente las cepas seleccionadas, conocidas como levaduras de tercera generación, además de las propiedades mencionadas presentan actividades enzimáticas específicas (por ejemplo, β-glucosidasa) que permiten liberar precursores aromáticos de la propia uva, realzando el carácter varietal (Degre, 1993).

Actualmente existen varias compañías en el mercado que ofrecen una amplia gama de levaduras de tipo *Saccharomyces* capaces de abarcar la mayoría de las necesidades según el tipo y estilo de vino que desee obtener el elaborador. Estos cultivos se rehidratan e inoculan a las dosis recomendadas (normalmente 1-3 x 10⁶ cél/ml) por el fabricante y, normalmente, se

multiplican y son capaces de imponerse sobre la población de levaduras presentes en el mosto dominado el proceso de fermentación. Numerosos trabajos confirman este hecho (Pérez et al., 2000; Ambrona et al., 2005; Ambrona et al., 2006; Blanco et al., 2013a, 2013b), si bien se ha demostrado que aunque las cepas inoculadas son las principales responsables de la fermentación no suprimen del todo el desarrollo de las levaduras del mosto al principio de la fermentación (Querol et al., 1992). Incluso, existen datos que indican que no siempre las levaduras sembradas son capaces de imponerse en la fermentación (Barrajón et al., 2007; Blanco et al., 2012;).

Por tanto, el uso de levaduras comerciales (LSA) para la elaboración de vino garantiza un proceso controlado y la obtención de vinos correctos y de calidad. Por otra parte, con una fermentación dirigida se evitan los riesgos de defectos organolépticos y/o paradas fermentativas que pueden ocurrir durante un proceso espontáneo (Bisson, 1999). Sin embargo, esta práctica implica una tendencia a la uniformidad de los vinos y una pérdida de la tipicidad de los mismos, así como la pérdida de la complejidad que aportan las levaduras no-*Saccharomyces*, especialmente durante la etapa inicial de la fermentación. En este sentido, existe la creencia generalizada de que el uso de levaduras seleccionadas autóctonas permitiría expresar la tipicidad de cada variedad y zona (Degre, 1993; Pretorius, 2000). Estas levaduras no solo respetan y contribuyen a la tipicidad de los caldos, sino que están mejor adaptadas a las condiciones ambientales y a las características de los mostos de una región concreta (Regodón et al., 1997).

Por otra parte, el uso de cultivos mixtos, tanto de levaduras *Saccharomyces* como de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*, ofrece una práctica alternativa para intensificar y mejorar las propiedades sensoriales de los vinos. Las fermentaciones naturales “multistarter” son de difícil control y los resultados impredecibles, pudiendo afectar a la composición química y sensorial del vino. Por ello, es necesario llevar a cabo más trabajos de investigación sobre el uso de inóculos mixtos de levaduras (aplicados simultáneamente o de forma secuencial) en fermentaciones, para poder definir las condiciones más adecuadas en cada caso. Los trabajos realizados hasta este momento en esa dirección con distintas cepas de *Saccharomyces* han llegado a interesantes conclusiones. Se ha observado que la coinoculación con cepas complementarias de *Saccharomyces* modifica el perfil aromático de los vinos (King et al., 2008), y se cree que la variación puede ser debida a la interacción entre las cepas de levadura utilizadas que comparten intermediarios metabólicos (Grossmann et al., 1996; Cheraiti et al., 2005). Por otra parte, se ha demostrado que la composición de los vinos coinoculados con mezclas de levaduras difiere de la composición de la mezcla de vinos fermentados de forma independiente con cada cepa de levadura (Howell et al., 2006).

A continuación se exponen algunos datos existentes sobre la aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de vino.

4. Potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de vino

La proliferación de las levaduras no-*Saccharomyces* en las etapas iniciales de la fermentación ha estado tradicionalmente asociada con elevada acidez volátil y olores o sabores desagradables. Sin embargo, desde hace ya casi un par de décadas, muchos autores opinan que estas levaduras pueden contribuir a la obtención de vinos dotados de mayor complejidad aromática y mejor calidad (Fleet y Heard, 1993; Gil et al. 1996; Henick-Kling et al., 1998; Egli et al., 1998; Esteve-Zarzoso et al., 1998; Lambrechts y Pretorius, 2000; Romano et al., 2003; Fleet, 2003; Viana et al., 2008; Fleet, 2008). En general, las levaduras no-*Saccharomyces* mejoran la calidad del vino, pero no son capaces de completar la fermentación debido a su baja tolerancia al alcohol. Por otra parte, se ha demostrado que estas levaduras pueden presentar actividades enzimáticas o producir metabolitos deseables capaces de modificar las características sensoriales del vino (Rojas et al., 2001; Ciani et al., 2010). En este contexto, la utilización de cultivos mixtos de cepas no-*Saccharomyces* con cepas *Saccharomyces* constituye una herramienta muy útil que permite aprovechar las ventajas de una fermentación espontánea evitando problemas de ralentización y/o paradas fermentativas, a la vez que se favorece la complejidad organoléptica y, por tanto, la calidad del vino obtenido (Romano et al., 2003; Ciani et al., 2010).

La presencia de levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación depende de la influencia de diversos factores físico-químicos. En primer lugar, cabe citar que la mayoría de las levaduras no-*Saccharomyces* muestran una baja resistencia a SO_2 , pero, hay otros factores que influyen en su supervivencia. Así, la permanencia de ciertas levaduras como *Kloeckera apiculata* y/o *Candida stellata* está relacionada con la temperatura de fermentación; cuanto más baja es, aumenta su resistencia a etanol (Gao y Fleet, 1988). Este hecho fue confirmado por Erten (2002) y Mendoza et al. (2009) en cultivos mixtos de *K. apiculata* y *S. cerevisiae*. La supervivencia de otras especies en fermentación como *Torulaspota delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans* se ha relacionado con la concentración de oxígeno (Hansen et al., 2001). También se ha demostrado que la presencia de altas concentraciones de células viables de *S. cerevisiae* da lugar a interacciones célula-célula que inhiben a estas dos levaduras (Nissen et al., 2003).

Se han realizado varios estudios relacionados con el uso de cultivos mixtos de levaduras apiculadas y *Saccharomyces*. Los resultados obtenidos mostraron que estas levaduras favorecen la producción de algunos compuestos deseables (Herraiz et al., 1990; Gil et al.,

1996; Romano et al., 2003; Rojas et al., 2003; Moreira et al., 2008; Viana et al., 2009; Andorra et al., 2010 y 2012).

Ciertas levaduras como *Candida stellata* o *Candida zemplinina* se han utilizado por su capacidad para aumentar el contenido de glicerol y mejorar la composición analítica del vino (Ciani y Ferraro, 1996; Ferraro et al., 2000; Soden et al., 2000; Andorra et al., 2010 y 2012). Por otra parte, fermentaciones controladas de *Candida cantarelli* y *S. cerevisiae* pusieron de manifiesto que el uso de la inoculación secuencial de estas levaduras contribuye a la mejora de las características del vino Syrah (Toro y Vázquez, 2002). También se obtuvieron mejoras en el perfil aromático de vinos Chenin Blanc con combinaciones de *C. pulcherrima* y *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2003), en vinos Chardonnay con cultivos mixtos de *C. membranifaciens* y *S. cerevisiae* (García et al., 2010), y en la fermentación de mosto Debina mediante inoculación secuencial de *Metschnikowia* y *Saccharomyces* (Parapouli et al., 2010).

En fermentaciones especiales como las realizadas con elevadas concentraciones de azúcares para elaboración de vinos dulces naturales, el uso de combinaciones de *T. delbrueckii* (descrita como baja productora de ácido acético en estas condiciones) y *S. cerevisiae* redujo la acidez volátil y mejoró el perfil analítico del vino (Bely et al., 2008).

Además, con algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* se han realizado compuestos volátiles específicos mejorando la composición aromática del vino. Así, la combinación de *Debaryomyces vanriji* y *S. cerevisiae* aumentó la concentración de geraniol (García et al., 2002); la co-fermentación con *Pichia kluyveri* y *S. cerevisiae* incrementó los tioles varietales (Anfang et al., 2009); y el uso de inóculos secuenciales de *Pichia fermentans* y *S. cerevisiae* aumentó la concentración de ciertos componentes aromáticos (Clemente-Jimenez et al., 2005). *Williopsis saturnus* (antes *Hansenula saturnus*) tiene una alta capacidad para sintetizar ésteres como isoamyl acetato y etil acetato, por tanto podría fomentar el carácter afrutado de los vinos. Sin embargo, su uso en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* demostró que produce también altos niveles de ácido acético, que puede no ser favorable para la producción de vino (Erten y Tanguler, 2010). En estudios realizados con la variedad Airén se encontró que los vinos coinoculados con *Hansenula anomala* eran mejor valorados desde el punto de vista sensorial por sus notas frutales y florales (Izquierdo Cañas et al., 2011). Recientemente, también se ha evaluado el uso de ciertas levaduras no-*Saccharomyces* para el envejecimiento sobre lías en vinos tintos (Palomero et al., 2009).

Otras levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* e *Issatchenkia orientalis* han sido investigadas por su capacidad de degradar el ácido málico (desacidificación biológica). La primera se usa como células inmovilizadas (Silva et al., 2003) y ya está disponible comercialmente (Promalic®; Proenol); la segunda, se ha utilizado en cultivos mixtos con *S.*

cerevisiae (Kim et al., 2008). Por el contrario, *K. thermotolerans* se ha utilizado en cultivos mixtos por su capacidad de producir una acidificación biológica del vino (Kapsopoulou et al., 2007).

Los trabajos citados hasta aquí fueron realizados en su mayoría a escala de laboratorio utilizando mosto estéril o un medio sintético. Aunque más escasos, los estudios del uso de cultivos mixtos en fermentaciones a escala piloto o en bodegas experimentales han confirmado que confieren mayor complejidad al vino. Ensayos de este tipo se han realizado con mezclas secuenciales de *K. apiculata*, *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* (Herraiz et al., 1990), levaduras apiculadas y *S. cerevisiae* (Zironi et al., 1993), mezclas de *T. delbrueckii*, *K. thermotolerans* y *S. cerevisiae* (Ciani et al., 2006) e inoculación secuencial de *H. anomala* y *T. delbrueckii* con *Saccharomyces* (Izquierdo cañas et al., 2011). Así mismo, diversos grupos continúan investigando sobre el potencial de distintas levaduras no-*Saccharomyces* para su aplicación en enología (Viana et al., 2008; De Benedictis et al., 2010; Domizio et al., 2011; Cordero-Bueso et al., 2013)

5. Levaduras no-*Saccharomyces* comerciales

Las distintas compañías distribuidoras de levaduras vínicas no han sido ajenas al creciente interés de la comunidad científica y los elaboradores de vino por el potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* asociadas a los procesos fermentativos. Fruto de sus propios ensayos y/o en colaboración con diversos grupos de investigación, distintas casas comerciales ofertan ya levaduras no-*Saccharomyces* para obtener vinos diferenciados (Tabla 2).

Tabla 2. Levaduras comerciales de tipo no-*Saccharomyces*

Compañía	Nombre producto	Tipo de levadura
Chr. Hansen	PRELUDE™	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
	CONCERTO™	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
	FROOTZEN™	<i>Pichia kluyveri</i>
	MELODY	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Lallemand	Level 2TD®	<i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Laffort	Zymaflore® Alpha ^{TD} n. sacch	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Proenol	Promalic®	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

Chr. Hansen

Chr. Hansen fue la primera compañía en investigar el prometedor campo de las levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de vino. Una década después de su primer descubrimiento al respecto en 2003, Chr. Hansen ofrece 4 productos diferentes en esta gama (Tabla 2): 3 cultivos puros de levaduras no-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii*, *K. thermotolerans*, *P. Kluyveri*) para ser utilizadas como primer inóculo para iniciar la fermentación alcohólica y, a continuación, el enólogo puede inocular la cepa de *S. cerevisiae* que desee; y una mezcla de 3 levaduras (Melody). PRELUDE™ es una cepa de *T. delbrueckii* lanzada al mercado en 2009 que aporta cuerpo, suavidad y redondez en boca a los vinos. CONCERTO™ es una cepa de *K. thermotolerans* comercializada en 2012 especialmente recomendada para la elaboración de vinos en regiones de clima templado o cálido. Esta levadura produce ácido láctico aportando redondez y una acidez equilibrada a los vinos. FROOTZEN™ es una cepa de *P. kluyveri* aislada en Nueva Zelanda que fue lanzada en 2010. Es una cepa muy específica que tiene la capacidad de liberar precursores y, por tanto, aumenta la intensidad aromática y la complejidad de los vinos. Por último, MELODY es un cultivo iniciador mezcla de tres levaduras *K. thermotolerans*, *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*. Las dos primeras aportan el carácter de “fermentación espontánea” y *S. cerevisiae* asegura una fermentación correcta y el consumo de azúcares (www.chr-hansen.com/wine)

Lallemand

También desde el año 2003, Lallemand ha trabajado en el proceso de selección y producción de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* y su actuación en fermentación junto con cepas específicas de *S. cerevisiae*. En colaboración con el INRA (Francia) se seleccionó la cepa de *T. delbrueckii* TD291®, que ha sido comercializada con el kit Level 2TD®. Este kit está integrado por dos levaduras diferentes para ser utilizadas de forma secuencial, la primera es la cepa *T. delbrueckii* TD291 y la segunda una cepa específica de *S. cerevisiae*. *T. delbrueckii* intensifica la complejidad aromática y suaviza los vinos en boca y *S. cerevisiae* garantiza una fermentación correcta del mosto (www.lallemandwine.com).

Laffort

Laffort ofrece una cepa de *T. delbrueckii*, Zymaflore ® *Alpha*^{TD n. sacch}, que permite conseguir una gran complejidad aromática y mejorar el volumen en boca. Asociada con una cepa de *S. cerevisiae* reproduce el ecosistema natural de los mostos en fermentación y asegura una fermentación completa (www.laffort.com)

Proenol

ProMalic® fue creada por Proenol (en colaboración con Lallemand) como una buena alternativa a la fermentación maloláctica y/o a la desacidificación química. *Schizosaccharomyces pombe* es una levadura capaz de metabolizar el ácido málico dando

lugar a etanol (fermentación malo-alcohólica). Sin embargo, si permanece en el vino una vez terminada la fermentación, puede producir alteraciones del mismo. Este problema queda resuelto con Promalic, una levadura *S. pombe* encapsulada en una doble capa de perlas de alginato que se añade al inicio de la fermentación y se puede retirar fácilmente cuando se alcanzan los niveles deseados de ácido málico.

6. Utilización de varias levaduras: protocolos de coinoculación

Cuando se utilizan varias levaduras para llevar a cabo la fermentación es importante tener en cuenta cual es el momento más adecuado para añadir cada una de ellas. En el caso de co-inoculación de distintas cepas de *S. cerevisiae*, las levaduras suelen añadirse al inicio de la fermentación en proporciones similares. Sin embargo, cuando se trata de cultivos mixtos de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* se recomienda realizar una inoculación secuencial de ambas especies. Primero se siembra la levadura no-*Saccharomyces* y, una vez iniciada la fermentación se añade *Saccharomyces*, teniendo en cuenta una serie de consideraciones.

En primer lugar, las levaduras no-*Saccharomyces* no son tan resistentes a la presencia de SO₂ como *Saccharomyces*; por tanto, la cantidad de SO₂ en el mosto deber reducirse al mínimo (se recomienda que la concentración de SO₂ libre sea menor de 20 mg/l) para garantizar que las cepas añadidas sean capaces de imponerse sobre la población de levaduras presentes en el mosto y arrancar la fermentación.

Por otra parte, la dosis de inóculo inicial recomendada suele ser mayor en el caso de estas levaduras (30-40 g/hl) que cuando se utilizan cultivos de *Saccharomyces*. Además, en este punto se debe prestar atención a la temperatura recomendada durante el proceso de rehidratación de las levaduras (por ej. con *T. delbrueckii* se recomienda la rehidratación a 30°C frente a los 37°C indicados para *S. cerevisiae*).

Una vez que se ha iniciado la fermentación con la primera levadura (no-*Saccharomyces*) se procede al paso de inoculación con la segunda levadura (*Saccharomyces*) a la dosis indicada por el fabricante (normalmente 20-40 g/hl). El en caso de combinaciones de *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae* la inoculación de la segunda levadura se recomienda cuando la densidad ha bajado 10-15 puntos, aunque puede haber variaciones. Aún así, en algunos casos no siempre las levaduras que se inoculan son las que finalmente llevan a cabo la fermentación.

En esta guía se presentan los resultados de diversos trabajos realizados en centros de distintas comunidades autónomas sobre la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* y

Saccharomyces en la elaboración de vino. Se incluyen ensayos con cepas de *T. delbrueckii*, *K. thermotolerans*, *P. kluyveri* y *S. pombe* comerciales así como algunas experiencias con levaduras propias. Se han evaluado la cinética fermentativa, la inoculación secuencial, la capacidad de implantación de las levaduras y su influencia sobre las características químicas y sensoriales del vino.

7. Bibliografía

- Ambrona J, Maqueda M, Zamora E y Ramírez M. 2005. Sulfometuron resistance as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *J Agric Food Chem.* 53: 7438–7443.
- Ambrona J, Vinagre A, Maqueda M, Álvarez ML. y Ramírez M. 2006. Rhodamine-pink as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *J Agric Food Chem.* 54: 2977–2984.
- Andorra I, Berradre M, Mas A, Esteve-Zarzoso B y Guillamón JM. 2012. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT-Food Sci Technol.* 49: 8-13.
- Andorra I, Berradre M, Rozes N, Mas A, Guillamón JM y Esteve-Zarzoso B. 2010. Effect of pure and mixed cultures of the main yeast species on grape must fermentations. *Eur Food Res Technol.* 231: 215-224.
- Anfang N, Brajkovich M y Goddard MR. 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Savignon Blanc. *Aust J Grape Wine R* 15: 1-8.
- Barrajón, N., Martín, R., Alonso, S., Briones, A.I., 2007. Éxitos y fracasos en la inoculación de levaduras seco activas en bodegas de Castilla La Mancha. *Cuadernos de Estudios Manchegos* 31: 181-196.
- Bayonove C. Baumes R. Crouzet J. y Günata, Z. 2000. Aromas. En: Flanzy, C., (Ed.), *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos.* AMV & Mundi-prensa, Madrid, pp. 137-176.
- Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I y Dubourdiou D. 2008. Impact of mixed *Torulaspota delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol.* 122: 312-320.
- Bisson, LF. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 107–119.
- Blanco P, Mirás-Avalos JM, Suárez V, y Orriols I. 2013a. Inoculation of Treixadura musts with autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains: fermentative performance and influence on the wine characteristics. *Food Sci Technol Int.* 19 (2): 177-186.
- Blanco P, Mirás-Avalos JM, Pereira E y Orriols I. 2013. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *J Sci Food Agric.* DOI 10.1002/jsfa.
- Blanco P y Orriols I. 2012. Estudio de la implantación de levaduras autóctonas y comerciales en fermentaciones con mostos y bagazos de variedades gallegas. *Spanish Journal of Rural Development.* Vol III (Special 1): 85-94.
- Cheraiti N, Guezenc S y Salmon JM. 2005. Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Appl Environ Microbiol.* 71 (1): 255-260.

- Ciani M, Beco L y Comitini F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int J Food Microbiol* 108: 239-245.
- Ciani M, Comitini F, Mannazu I y Domizio P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*. 10 (2): 123-133.
- Ciani M y Ferraro L. 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl Environ Microbiol*. 62 (1): 128-132.
- Clemente-Jimenez JM, Mingorance-cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ y Rodríguez-Vico F. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int J Food Microbiol*. 98: 301-308.
- Cordero-Bueso G, Esteve-Zarzoso B, Cabellos JM, Gil-Díaz M y Arroyo T. 2013. Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv.L.). 236: 193-207.
- De Benedictis M, Bleve G, Grieco F, Tristezza M, Tufariello M y Grieco F. 2011. An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. *Antonie van Leeuwenhoek*. 99(2): 189-200.
- Degre R. 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In: *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet, GH ed.) pp.421-447. Harwood Academic Publisher GmbH, Chur, Switzerland.
- Domizio P, Romani P, Lencioni L, Comitini F, Gobbi M, Mannazu I y Ciani M. 2011. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int J Food Microbiol*. 147: 170-180.
- Egli CM, Edinger WD, Mitrakul CM y Henick-Kling T. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol*. 85: 779-789.
- Erten H. 2002. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 373-378.
- Erten H y Tanguer H. 2010. Influence of *Williopsis saturnus* yeasts in combination with *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Lett Appl Microbiol*. 50: 474-479.
- Esteve-Zarzoso B, Manzanares P, Ramón D y Querol A. 1998. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int Microbiol* 1:143-148.
- Ferraro L, Fatichenti F y Ciani M. 2000. Pilot scale vinification process by immobilised *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem* 35: 1125-1129.
- Fleet GH. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*. 86: 11-22.
- Fleet GH. 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res*. 8: 979-995.
- Fleet GH. 1993. The microorganisms of winemaking-isolation, enumeration and identification. In: *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet, GH ed.) pp.1-25. Harwood Academic Publisher GmbH, Chur, Switzerland.

- Fleet GH. y Heard GM. 1993. Yeasts: growth during fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology (Fleet, GH ed.) pp.27-54. Harwood Academic Publisher GmbH, Chur, Switzerland.
- Gao C y Fleet GH. 1988. The effect of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J Appl. Bacteriol.* 65: 405-410.
- García A, Carcel C, Samson A, Aguera E, Agosin E y Günata Z. 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *J Food Sci* 67: 1138-1143.
- García V, Vásques H, Fonseca F, Manzanares P, Viana F, Martínez C y Ganga MA. 2010. Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. *Revista Argentina de Microbiología.* 42: 226-229.
- Gil JV, Mateo JJ, Jimenez M, Pastor A y Huerta T. 1996. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J Food Sci.* 61: 1247-1266.
- Grossmann M, Linsenmeyer H, Muno H y Rapp A. 1996. Use of oligo-strain yeast cultures to increase complexity of wine aroma. *Vitic Enol Sci.*51: 175-179.
- Hansen EH, Nissen P, Sommer P, Nielsen JC y Arneborg N. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 91: 541-547.
- Henick-Kling T, Ediger W, Daniel P y Monk P. 1998. Selective effects of sulphur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast population and sensory characteristics of wine. *J Appl Microbiol.* 84: 865-876.
- Herraiz T, Reglero G, herraiz M, Martin-Alvarez PJ y Cabezudo M. 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *Am J Enol Vitic.* 41: 313-318.
- Howell KS, Cozzolino D, Bartowsky EJ, Fleet GH y Henschke PA. 2006. Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Res.* 6: 91-101.
- Izquierdo Cañas PM, Palacios García AT y García Romero E. 2011. Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspota*) and *Saccharomyces* yeast starter. *Vitis* 50 (4): 177-182.
- Jolly NP, Augustyn OPH y Pretorius IS. 2003. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *S Afr J Enol Vitic* 24: 63-69.
- Jolly NP, Augustyn OPH y Pretorius IS. 2006. The role and use of *Non-Saccharomyces* yeasts in wine production. *S Afr J Enol Vitic* 27: 15-39.
- Kapsopoulou K, Mourtzini A, Anthoulas M y Nerantzis E. 2007. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microb Biot.* 23: 735-739.
- Kim DH, Hong YA y Park HD. 2008. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic content in wine. *Biotechnol. Lett* 30: 1633-1638.

- King ES, Swiegers JH, Travis B, Francis IL, Bastian SE y Pretorius IS. 2008. Co-inoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc wines. *J Agric Food Chem.* 56: 10829-10837.
- Lambrechts MG. y Pretorius IS. 2000. Yeasts and its importance to wine aroma. A review. *S Afr J Enol Vitic.* 21: 97-129.
- Loureiro V. y Malfeito-Ferreira M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 86: 23-50.
- Martini A. 1993. The origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Wine Res.* 4: 165-176.
- Mendoza LM, Manca de Nadra MC, Bru E y Farías ME. 2009. Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in mixed culture. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36 (2): 229-237.
- Moreira N, Mendes P, Guedes de Pinho P, Hogg T y vasconcelos I. 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *Int J Food Microbiol.* 124: 231-238.
- Nissen P, Nielsen D y Arneborg N. 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by cell-cell-contact-mediated mechanism. *Yeast* 20: 331-341.
- Palomero F, Morata A, Benito S, Calderón F y Suárez-Lepe JA. 2009. New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chem* 112: 432-441.
- Parapouli M, Hatziloukas E, Drainas C y Perisynakis A. 2010. The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavor. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37: 85-93.
- Pérez F, Regodón JA, Valdés ME, De Miguel C. y Ramírez M. 2000. Cycloheximide resistance as marker for monitoring yeasts in wine fermentations. *Food Microbiol.* 17: 119-128.
- Pretorius IS. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Querol A., Barrio E., Huerta T. y Ramón D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (9): 2948-2953.
- Querol A., Barrio E. y Ramón D. 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 315-323.
- Rapp, A., 1990. Natural flavours of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 337, 777-785.
- Regodón, J.A., Pérez, F., Valdés, M.E., de Miguel, C., Ramirez, M. 1997. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol.* 14, 247-254.
- Rojas V, Gil JV, Piñaga F y Manzanares P. 2001. Studies on acetate production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int J Food Microbiol.* 70: 283-289.
- Rojas V, Gil JV, Piñaga F y Manzanares P. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int J Food Microbiol.* 86: 181-188.

- Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M y Capece A. 2003. Function of yeasts species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol.* 86: 181-188.
- Silva S, Ramon Portugal F, Andrade P, Texeira M y Strehaiano P. 2003. Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Am J Enol Vitic* 54: 50-55.
- Soden A, Francis IL, Oakey H y Henschke PA. 2000. Effect of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust J Grape Wine R.* 6: 21-30.
- Suárez Lepe JA e Iñigo Leal B. 2004. Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación. 3ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA y Pretorius IS. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Aust J Grape Wine R.* 11: 139-173.
- Toro ME y Vázquez F. 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarelli* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J Microbiol Biotechnol.* 18: 347-354.
- Török T, Mortimer RK, Romano P, Suzzi G y Polsinelli M. 1996. Quest for wine yeasts-an old story revisited. *J Ind Microbiol* 17: 303-313.
- Vaughan-Martini A y Martini A. 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganisms. *J Ind Microbiol.* 14: 514-522.
- Viana F, Gil JV, Genovés S, Vallés S y Manzanares P. 2008: Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.* 25: 778-785.
- Viana F, Gil JV, Vallés S y Manzanares P. 2009. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 135: 68-74
- Zironi R, Romano P, Suzzi G, Battistutta F y Comi G. 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 15: 235-238.



***INVESTIGACIÓN REALIZADA
CON LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES
EN DISTINTAS COMUNIDADES***

1. ANDALUCÍA

BELEN PUERTAS GARCIA

Financiación y período de ensayo:

- Ensayo contemplado dentro del Proyecto INIA RTA2009-00022-C02-00 “Estudio y aplicación de nuevas tecnologías para la mejora de la calidad de los vinos blancos y tintos andaluces”
- Colaboración de Lallemand (JM Heras) y del Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz. (M^a Esther Rodríguez y Jesús Manuel Cantoral)
- Período de ensayo: 2011 y 2012

Participantes:

Belén Puertas García, M^a Jesús Jiménez Hierro, Emma Cantos Villar, Zulema Piñeiro Méndez y Carmen Castejón Márquez.

Objetivos:

- Evaluar la cinética fermentativa de la inoculación secuencial de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*
- Analizar la capacidad de implantación de la levadura no-*Saccharomyces*
- Determinar la influencia de la inoculación secuencial sobre las características químico-enológicas y sensoriales de los vinos.

Metodología:

Se han llevado a cabo elaboraciones por triplicado las vendimias de 2011 y de 2012 de mostos de uva de las variedades blancas Chardonnay y Palomino fino, en los que se ha realizado la fermentación alcohólica con inoculación secuencial (IS) inoculando en los inicios de la misma, levaduras no-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii*) y posteriormente *Saccharomyces cerevisiae*. Como controles (CT) se han elaborado vinos en los que la fermentación alcohólica únicamente fue llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*. Todas las elaboraciones se han realizado en volúmenes de 100 L y se ha contado con la colaboración de la empresa Lallemand que nos ha producido a nivel industrial las cepas de levadura no-*Saccharomyces* y de *Sacharomyces*.

En todos los vinos finales se han determinado los parámetros físico-químicos, compuestos volátiles y se han analizado desde el punto de vista sensorial.

Además, se analizó la implantación de las levaduras inoculadas al final de las fermentaciones. El método utilizado fue el análisis del polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción del DNA mitocondrial.

Levaduras inoculadas:

- Level 2TD® de Lallemand (Inoculación secuencial de la cepa *Torulaspota delbrueckii* TD291 + una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* específica)
- Lalvin YSEO QA23® de Lallemand

Resultados más relevantes:

Cosecha 2011

Las fermentaciones transcurrieron normalmente, aunque se observaron algunas diferencias. Para ambas variedades la velocidad de fermentación en fase tumultuosa fue similar en las fermentaciones inoculadas con la levadura QA23 *S. cerevisiae* (CT), y más lenta en las fermentaciones IS. En cualquier caso, todas las levaduras completaron el proceso correctamente dando lugar a vinos con menos de 2,0 g/L de azúcares residuales.

En la tabla siguiente se muestran los porcentajes de implantación de cada levadura en las dos variedades.

Ensayo	CHARDONNAY				PALOMINO FINO			
	QA23 (Sc)	E491 (Sc)	E291 (Td)	Otras	QA23 (Sc)	E491 (Sc)	E291 (Td)	Otras
CT 1	77%			23%	67%		27%	6%
CT 2	100%				87%		13%	
CT 3	100%				93%		7%	
IS 1			100%				87%	13%
IS 2			100%			20%	47%	33%
IS 3			100%				60%	40%

Los vinos de Chardonnay IS tuvieron menor graduación alcohólica, menor acidez total, menor acidez volátil y mayor contenido en glicerol. Sin embargo, en la variedad Palomino fino la inoculación secuencial no tuvo efecto significativo sobre los parámetros anteriormente mencionados.

En relación a los ácidos orgánicos, en los vinos de Chardonnay IS se obtuvieron concentraciones más bajas de los ácidos tartárico, málico y acético, y más altas del ácido succínico, respecto al CT. Los vinos IS de Palomino fino presentaron mayor cantidad de succínico y menor de málico que el CT, comportamiento análogo al de la variedad Chardonnay, sin embargo, no hubo diferencias significativas en los ácidos acético y tartárico. En ninguna de las dos variedades se detectaron diferencias en los ácidos cítrico y láctico.

En ninguna de las dos variedades hubo diferencias entre IS y CT en los parámetros relacionados con el color (D.O. 420 nm y D.O. 520 nm) ni en las coordenadas CIELab.

Respecto a los compuestos volátiles minoritarios, en los vinos de Chardonnay no hubo diferencias ni en los terpenos (geraniol, linalol, terpineol y nerol) ni en los compuestos carbonílicos (hexanal, benzaldehído y diacetilo), observándose en los vinos IS menores cantidades de ésteres (acetato de etilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de hexilo, lactato de etilo, octanoato de metilo y 2-fenil acetato), alcoholes (1-hexanol, c-3-hexen-1-ol y 2-feniletanol) y ácidos (isobutírico, octanoico, decanoico e isovalérico). En los vinos de Palomino fino no hubo diferencias en ninguna de las familias de los compuestos mencionados.

En cuanto a los compuestos volátiles mayoritarios, los vinos de Chardonnay IS tuvieron mayores concentraciones de alcoholes superiores (N-propanol, isobutanol e isoamílicos) y menores de acetaldehído, no se encontraron diferencias ni en el metanol ni en el acetato de etilo. En los vinos de Palomino fino, las concentraciones de N-propanol y de isoamílicos fueron muy superiores en los vinos IS respecto a los CT. En los vinos de esta variedad, el metanol fue más bajo en los IS, y no hubo diferencias ni en acetaldehído, ni en acetato de etilo ni en isobutanol.

Mediante las pruebas triangulares se constató que no había diferencias sensoriales, entre los triplicados de cada ensayo. Posteriormente se realizaron las catas descriptivas.

Los vinos de Chardonnay IS, en los que la levadura dominante al final de la fermentación fue *T. delbrueckii*, destacaron por su mayor intensidad aromática, sobre todo tanto de notas afrutadas como de cítricos, fruta blanca y tropical, de manera que se podría correlacionar la presencia de esta levadura con las características sensoriales obtenidas en los vinos IS. Asimismo, resultaron más largos y agradables en boca.

En el caso de la variedad Palomino fino, apenas se detectaron diferencias sensoriales entre los vinos IS y CT, que podría ser debido al menor éxito obtenido en la implantación de las levaduras inoculadas.

Publicaciones más destacadas:

Jiménez-Hierro, M.J.; Piñeiro, Z.; Rodríguez, M. E.; Cantos-Villar, E.; Castejón, C.; Cantoral, J.M.; Puertas, B. (2013). **Influencia de la maceración pelicular y de la inoculación secuencial de levaduras en vinos blancos** Trabajo que se va a presentar como comunicación oral en el 9 Simposio de Vitivinicultura do Alentejo, que se celebrará los días 17 y 18 de Mayo de 2013, en Évora (Portugal).

2. ARAGÓN

ERNESTO FRANCO

Financiación y período de ensayo

Período de ensayo: 2010, 2011 y 2012

Participantes

Ensayo: VINIFICACIONES EXPERIMENTALES CON LEVADURAS NO SACCHAROMYCES.
TORULASPORA

Metodología:

Vinificaciones: de 1500 L, en la Bodega Piloto de Valderrobres

Levaduras: *Torulaspóra* ZYMAFLORE ALPHA y *Sacharomyces* ZYMAFLORE X16, ambas de Laffort

Varietades:

2010	Garnacha Blanca, Garnacha Tinta y Tempranillo.
2011	Garnacha Tinta y Tempranillo.
2012	Garnacha Tinta y Tempranillo.

Siembra: Las *Torulaspóras* se siembran directamente a 0,4 g/Kg uva o L, una vez que ha comenzado la fermentación se siembran las *Sacharomyces* a 0,2 g/Kg uva o L mosto

Resultados:

No se observan desviaciones durante la fermentación, aunque sí la cinética es más lenta en la siembra secuenciada con *Torulaspóra*.

Se observan diferencias en el contenido en polifenoles de los fermentados por *Torulaspóra*, que son mayores en los vinos de Garnacha Tinta y menores en el caso del Tempranillo; mientras que la intensidad de color es menor en los tintos de ambas variedades; en el resto de parámetros no se observan diferencias.

La analítica de aromas (realizada en los laboratorios SARCO) indica:

En las tres variedades se observa un aumento de la concentración de 3-mercaptohexan-1-ol y de 2-feniletanol en los vinos fermentados con *Torulospóra*, mientras que la suma de esteres se mantiene similar a excepción de los vinos de G. Blanca que disminuye, como se observa en los GRAFICOS 1, 2

La concentración de 3-mercaptohexan-1-ol se modifica en función del año, observando como en el año 2012 son superiores que en el año 2010 y 2011, GRAFICO 3, aunque se sigue manteniendo que los vinos inoculados con *Torulaspota* presentan mayor concentración de este compuesto relacionado con el carácter tiólico.

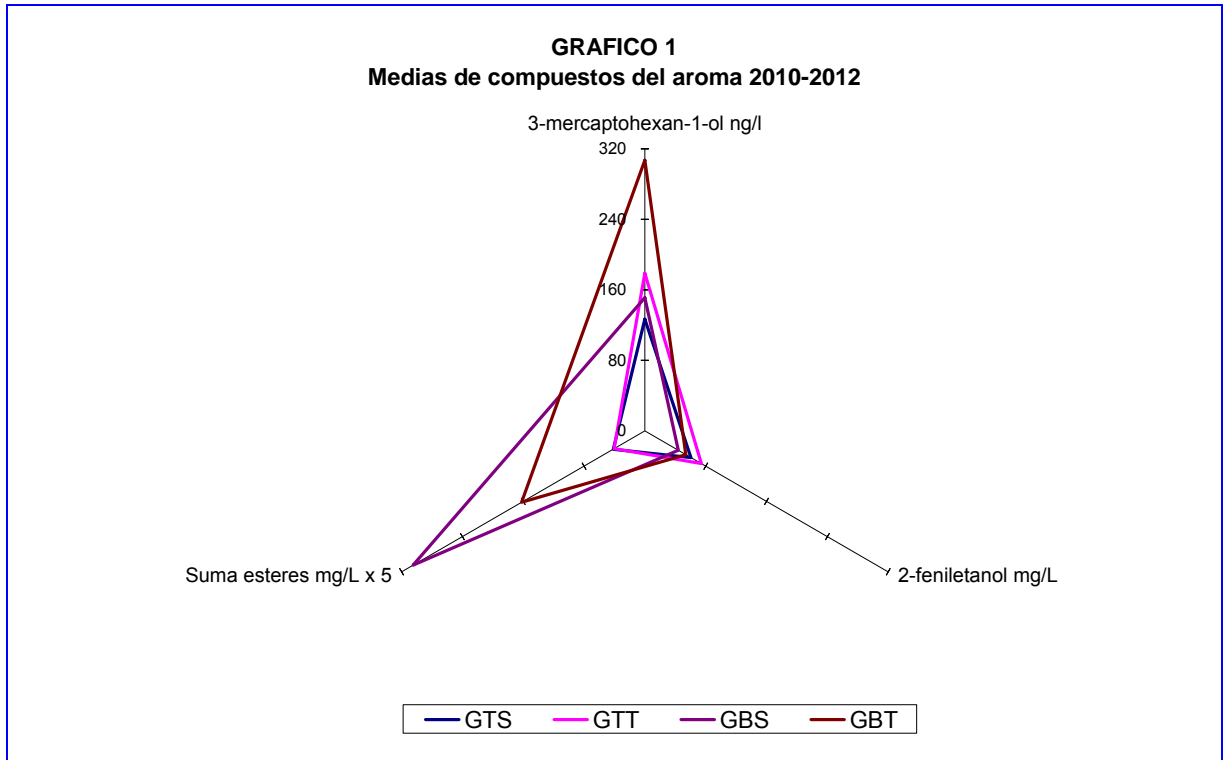


GRAFICO 2
Medias de compuestos del aroma 2010-2012

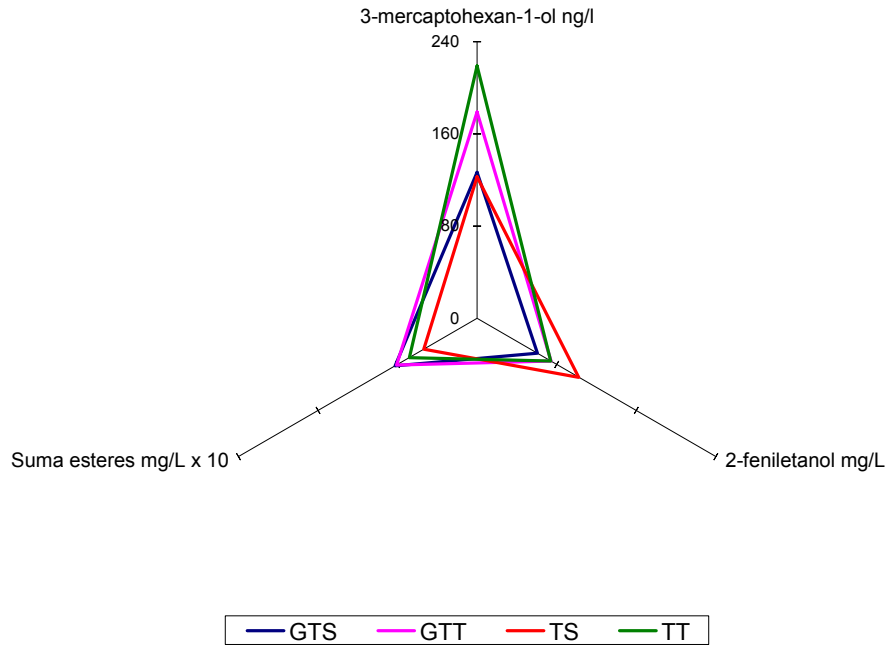
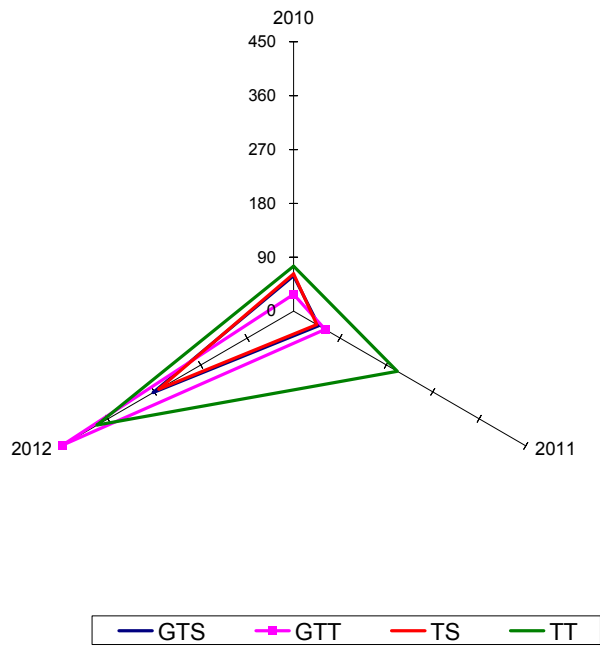


GRAFICO 3
Concentración de 3-mercaptohexan-1-ol ng/l en función del año



3. CASTILLA-LA MANCHA

PEDRO MIGUEL IZQUIERDO CAÑAS

Financiación y período de ensayo:

Instituto de la Vid y el Vino en colaboración con la empresa Lallemand, desde el año 2007 a la actualidad.

Participantes:

Pedro Miguel Izquierdo Cañas, Esteban García Romero

Objetivos:

Empleo de la inoculación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* para obtener vinos con características aromáticas y gustativas diferenciadas.

Metodología:

Se han llevado a cabo elaboraciones por duplicado en distintas vendimias de mostos de uva de las variedades blancas Airén y Macabeo y tintas Malbec y Mazuela, en los que se ha realizado la fermentación alcohólica inoculando en los inicios de la misma, levaduras no-*Saccharomyces* (*Hansenula anomala* y *Torulaspota delbrueckii*) y posteriormente *Saccharomyces cerevisiae*. Como controles negativos se han elaborado vinos en los que la fermentación alcohólica únicamente fue llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*. Todas las elaboraciones se han realizado en volúmenes de 100 L y se ha contado con la colaboración de la empresa Lallemand que nos ha producido a nivel industrial las cepas de levadura no-*Saccharomyces*. La cepa *Hansenula anomala* fue aislada y seleccionada en nuestro centro.

En todos los vinos finales se han determinado los parámetros físico-químicos, compuestos volátiles y se han analizado desde el punto de vista sensorial.

Además mediante técnicas de biología molecular se ha determinado la capacidad de implantación de las cepas no-*Saccharomyces*.

Resultados más relevantes:

En el caso de los vinos Airén y en dos vendimias diferentes se observó que los vinos en los que se empleó la inoculación secuencial con *Hansenula anomala* presentaban menor concentración de alcoholes lineales y tioalcoholes, compuestos responsables de notas herbáceas y cocidas.

Los vinos en los que se utilizó la cepa *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* contenían menor acidez volátil, acetaldehído y compuestos carbonílicos.

En la cata de preferencia los vinos Airén obtenidos por inoculación secuencial con *Hansenula anomala* fueron los preferidos por los catadores valorándolos como mas afrutados y con más notas florales.

Los vinos Macabeo elaborados mediante inoculación secuencial con *Hansenula anomala* presentaron menor acidez volátil y un mayor contenido en glicerina que los inoculados únicamente con *Saccharomyces cerevisiae*. En cuanto a su composición volátil presentaron menor contenido en acetato de etilo y de hexilo y un mayor contenido en acetato de 2-feniletilo, succinato de dietilo y 2-feniletanol entre otros compuestos. A nivel sensorial los vinos inoculados secuencialmente destacaron en la fase olfativa por una mayor intensidad y mejor calidad aromática, además fueron valorados con una mayor armonía y preferidos por los catadores.

Estos resultados de diversas vendimias son coincidentes y corroboran los trabajos obtenidos por otros autores, en el sentido de que la inoculación secuencial de no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* puede ser una vía para aumentar la calidad aromática y gustativa de los vinos.

La levadura *Hansenula anomala* aislada y seleccionada en el IVICAM ha mostrado de forma fehaciente sus buenas cualidades para ser utilizada en inoculación secuencial produciendo vinos mejor valorados por los catadores y con un mayor contenido en glicerina y menor contenido en acidez volátil.

Publicaciones más destacadas:

Izquierdo Cañas, P. M., Palacios García. A. T., García Romero, E. (2011). **Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspota*) and *Saccharomyces* yeast starter.** *Vitis-Journal of Grapevine Research*, 50, 4,177-182.

Izquierdo Cañas, P. M., García Romero, E. (2012). **Inoculación de *Hansenula anomala* y *Sacch. cerevisiae* en mostos Macabeo.** *La Semana Vitivinícola*, 3387, 1846-1851.

4. CASTILLA-LEÓN

SILVIA PÉREZ-MAGARIÑO

Financiación y período de ensayo:

Fondos propios (Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León)

Período de ensayo: 2009 y 2010

Participantes:

Silvia Pérez-Magariño, Carlos González-Huerta, Miriam Ortega

Objetivos:

Empleo de levaduras no-*Saccharomyces* *Schizosaccharomyces pombe* para reducir el contenido de ácido málico en vinos blancos y rosados.

Metodología:

Se han llevado a cabo elaboraciones de vinos con las variedades blancas Godello y Albarín y tintas Garnacha y Prieto Picudo. Estas elaboraciones se realizaron por duplicado en depósitos de 100 L durante las vendimias de 2009 y 2010.

La fermentación alcohólica se llevó a cabo por inoculación con *Saccharomyces cerevisiae* tras el desfangado de los mostos. Posteriormente se adicionaron las levaduras encapsuladas *Schizosaccharomyces pombe* (Promalic) en bolsas de nylon, siguiendo las recomendaciones del fabricante, en distintos momentos de la fermentación.

Resultados:

Únicamente se llevó a cabo el seguimiento del contenido de ácido málico, ya que era el objetivo que se buscaba.

Como se observa en la figura, la adición de las levaduras no-*Saccharomyces* *Schizosaccharomyces pombe* fue más efectiva cuando se adicionaron al inicio de la fermentación alcohólica, llegándose a obtener una disminución del contenido de ácido málico entre un 45-55%.

El menor efecto en la reducción del contenido de ácido málico se encontró en la fermentación tumultuosa, probablemente debido a que es el periodo de tiempo en el que la concentración de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* es más elevada.

La disminución en el contenido de ácido málico fue independiente de la concentración inicial en el mosto de partida.

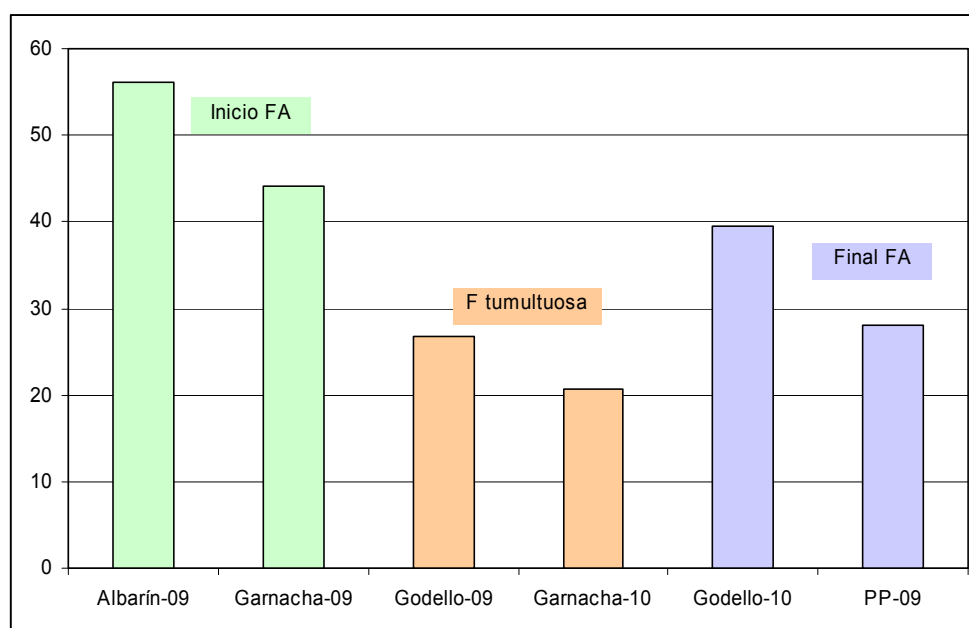


Figura. Descenso del contenido de ácido málico (%)

5. CATALUÑA

ANNA PUIG PUJOL / M^a CARME MASQUÉ TELL

Financiación y período de ensayo:

- Colaboración contractual con Lallemand.
- Fondos propios

Período de ensayo: 2010 y 2012.

Participantes:

Anna Puig, Fina Capdevila, Enric Bartra, Margarita Vilavella, M. Carme Masqué, Claustre Grau, Josep Valiente, Xoán Elorduy, Santiago Mínguez.

Ensayo:

- 2010: Inoculación secuencial *Torulaspora*-Sc en la variedad Chardonnay.
- 2012: Inoculación secuencial *Torulaspora*-Sc y *Hansenula*-Sc en uvas tintas de Garnacha de grado alcohólico probable elevado.
- 2012: Inoculación secuencial *Torulaspora*-Sc y *Metschnikowia*-Sc en mosto de la variedad Garnacha blanca.

Objetivos:

Inoculación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* para la elaboración de vinos blancos y tintos con características aromáticas y gustativas diferenciales.

- Seguimiento de las cinéticas de fermentación de los depósitos donde se ha realizado la inoculación secuencial con las no *Saccharomyces* respecto a un depósito control con sólo *S. cerevisiae*.
- Análisis de la capacidad de implantación de las cepas no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* a lo largo del proceso fermentativo.
- Características enológicas y sensoriales de los vinos obtenidos.

Metodología:

En la campaña del 2010, las experiencias se realizaron con uvas de la variedad Chardonnay procedente de una parcela situada en la D.O. Penedés.

En la campaña del 2012, las uvas tintas utilizadas pertenecían a la variedad Garnacha tinta procedentes de un viñedo de la D.O. Terra Alta. En otra serie de experiencias, se utilizó también mosto procedente de uvas seleccionadas de la variedad Garnacha blanca de viñedos de la D.O. Terra Alta proporcionado por la Cooperativa Agrícola de Bot.

Los lotes se recogieron en el momento óptimo de madurez y estado sanitario.

El mosto de la variedad Chardonnay (2010) se obtuvo mediante estrujado y prensado en prensa neumática con nieve carbónica para enfriar el mosto y preservar los aromas. Se dosificó sulfuroso a razón de 3 g/Hl y se desfangó con enzimas pectolíticas durante 20 h aprox. Posteriormente se analizó su composición (Tabla 1) y se distribuyó en 4 depósitos de 100 L (2 para inoculación secuencial y 2 depósitos testigo).

Las uvas de Garnacha tinta (2012) se despallaron, estrujaron y encubaron en lotes de 150 L de pasta/depósito. La dosis de SO₂ fue de 4 g/Hl y se adicionaron enzimas para favorecer la extracción de color. Las características del mosto antes de empezar a fermentar se muestran en la Tabla 1.

Las experiencias con Garnacha blanca se llevaron a cabo con mosto desfangado por flotación, sulfitado a razón de 3 g/Hl y se distribuyó en lotes de 100 L. En la Tabla 1 se muestran las características del mosto inicial.

Mosto. Las características enológicas de los mostos utilizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los mostos

	Chardonnay (2010)	Garnacha tinta (2012)	Garnacha blanca (2012)
Grado brix	21.8	25.60	22.0
Grado alcohólico probable (% vol)	12.63	15.23	12.76
pH	3.52	3.74	3.50
SO ₂ libre (mg/L)	2	7	-
SO ₂ total (mg/L)	20	39	-
Acidez total (g/L tartárico)	6.6	4.6	3.9
Ácido málico (g/L)	3.3	0.7	0.6
Ácido tartárico (g/L)	5.2	5.3	5.6
NFA (mg/L)	232	241	139
NTU	36	-	-

Levaduras inoculadas

2010 (Chardonnay)

- Depósito testigo: *S. cerevisiae* QA23 de Lallemand
- Level 2TD® de Lallemand (Inoculación secuencial de la cepa *Torulaspora delbrueckii* TD291 + una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* específica)

2012 (Garnacha tinta)

- Depósito testigo: *S. cerevisiae* Lalvin EC 1118 de Lallemand
- *Torulaspora delbrueckii* TD291 + *S. cerevisiae* Lalvin EC 1118
- *Hansenula anomala* (IVICAM)+ *S. cerevisiae* Lalvin EC 1118

2012 (Garnacha blanca)

- Depósito testigo: *S. cerevisiae* Lalvin QA23 de Lallemand

- *Torulaspota delbrueckii* TD291 + *S. cerevisiae* Lalvin QA23
- *Metschnikowia pulcherrima* (LAMAP 1781) + *S. cerevisiae* Lalvin QA23

Fermentaciones

La siembra de levaduras se realizó según el protocolo y dosis indicados por el fabricante. En los casos de la inoculación secuencial, hay que tener en cuenta tres aspectos importantes:

- (1) La temperatura de hidratación de las cepas no *Saccharomyces* no debe superar los 30°C.
- (2) El sulfuroso libre en el mosto no debe ser superior a 20 mg/L.
- (3) La siembra de *S. cerevisiae* se realiza a las 24-36 h o una vez la densidad ha bajado 10-15 unidades.

Chardonnay (2010). Las fermentaciones se realizaron por duplicado (dos testigos + dos con inoculación secuencial: *Torulaspota* + *S. cerevisiae*) en depósitos de acero inoxidable de 100 L de capacidad a una temperatura de 18°C-20°C. El seguimiento de la fermentación se realizó mediante controles diarios de densidad y temperatura. Una vez finalizada, los vinos se trasegaron, realizándose las correcciones oportunas de sulfuroso y se conservaron en frío (0°C) para favorecer la estabilización tartárica. Posteriormente se embotellaron y conservaron para su posterior análisis físico-químico y organoléptico.

Garnacha tinta (2012). Las fermentaciones de 150 L de pasta se realizaron a una temperatura de 28°C desde su inicio (como establecía el protocolo de trabajo). Diariamente se realizaron remontados para favorecer la maceración y controles de densidad y temperatura. Finalizada la fermentación alcohólica, se realizó un prensado ligero y 100 L de vino obtenidos de cada lote se colocaron en depósitos de acero inoxidable para la realización de la FML con inóculo de bacterias comerciales. Acabada la FML, los vinos se sulfitaron, trasegaron, y se colocaron en frío para su estabilización tartárica. No se realizó ningún tratamiento con clarificantes para preservar todas las características sensoriales de los vinos elaborados. Justo antes de su embotellado, los tres lotes se filtraron por tierras y se corrigió el sulfuroso. Una vez embotellados se conservaron a 16°C hasta su análisis enológico y sensorial.

Garnacha blanca (2012). Las fermentaciones se realizaron en depósitos de acero inoxidable de 100 L de capacidad a una temperatura de 18°C-23°C. El seguimiento de la fermentación se realizó mediante controles diarios de densidad y temperatura. Una vez finalizada, los vinos se trasegaron, realizándose las correcciones oportunas de sulfuroso, se clarificaron y se conservaron en frío (0°C) para favorecer la estabilización tartárica. Posteriormente se embotellaron y conservaron para su posterior análisis físico-químico y organoléptico.

Control de implantación de las cepas de levadura

Se realizó un estudio de implantación de las levaduras sembradas para comprobar realmente las cepas que estaban actuando en cada etapa. Para los depósitos donde sólo se sembró una cepa, se realizaron dos tomas de muestra: una a mitad y otra a final de FA. Para los depósitos con inoculación secuencial (excepto en la variedad Garnacha blanca) se tomaron tres muestras: justo antes del inóculo de la cepa de Sc, a mitad de FA y al final del proceso. El análisis se llevó a cabo mediante el estudio del perfil de restricción del ADN mitocondrial de una población de levaduras representativa en cada punto de muestreo.

Análisis enológico y sensorial

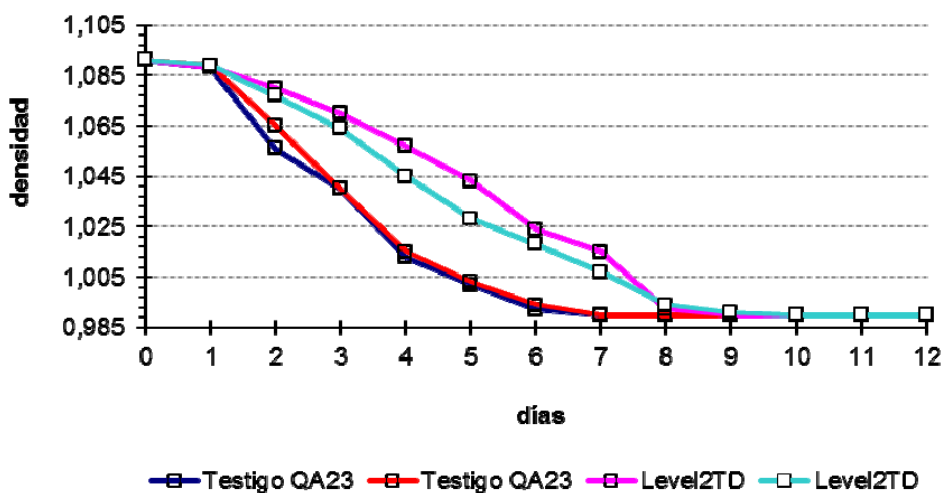
Los parámetros físico-químicos y cromáticos de los vinos se determinaron según métodos oficiales estandarizados. El análisis sensorial de los vinos fue llevado a cabo por un panel de 7-10 catadores expertos mediante una cata descriptiva en el que se evaluaron diversos descriptores adaptados para cada tipo de variedad puntuados en una escala de 1 a 9. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con las puntuaciones de cada descriptor para determinar diferencias entre los distintos lotes de la misma variedad. En el caso de la Garnacha tinta, se realizó también una prueba de comparaciones múltiple.

Resultados

Cinéticas fermentativas

Chardonnay (2010): Inoculación secuencial con *Torulaspota delbrueckii* TD291. Las cuatro vinificaciones tuvieron una cinética de arranque casi paralela (Figura 1), empezando a fermentar casi simultáneamente. No obstante, las fermentaciones con inoculación secuencial de *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*, tuvieron una cinética un poco más lenta respecto a los depósitos testigo. Éstos últimos terminaron de fermentar a los 8 días, mientras que los depósitos con inoculación secuencial lo hicieron a los 10.

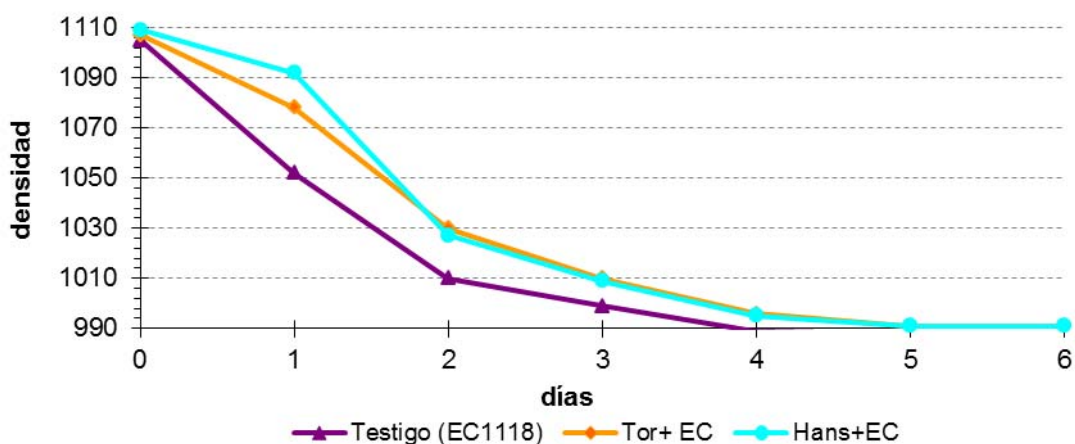
Figura 1. Evolución de las fermentaciones: Chardonnay 2010



Garnacha tinta (2012). Inoculación secuencial con *Torulaspora delbrueckii* TD291 y *Hansenula anomola* (IVICAM).

Como se puede observar (Figura 2), los tres lotes fermentaron rápidamente debido a la elevada temperatura (28°C) a la que tuvo lugar el proceso. El depósito que actuó como testigo, sembrado con la cepa EC1118 fue el más rápido en terminar, considerándose acabada la FA al 4º día de su inicio. Los depósitos con inoculación secuencial de *Torulaspora*+EC1118 y *Hansenula*+EC1118 se comportaron de modo casi paralelo, finalizando la FA un día más tarde que el testigo.

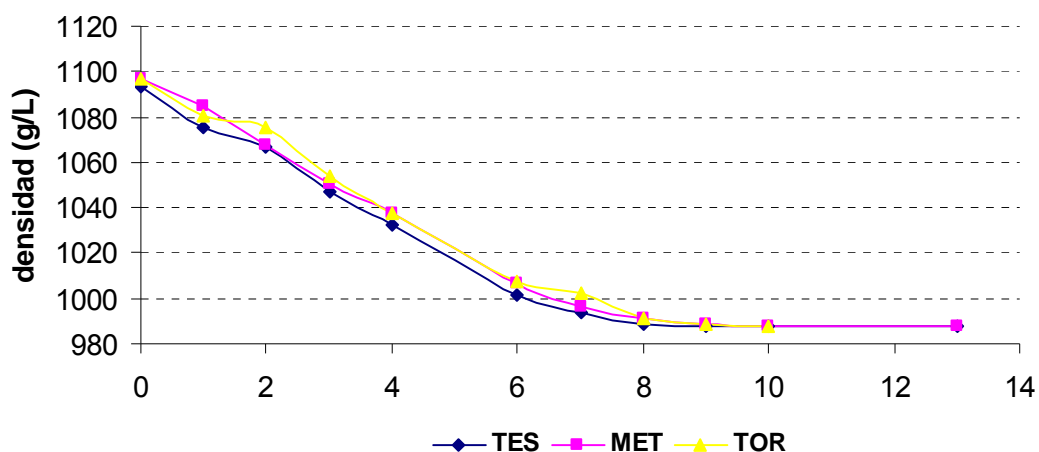
Figura 2. Evolución de la fermentaciones: Garnacha tinta 2012



Garnacha blanca (2012). Inoculación secuencial con *Torulaspora delbrueckii* TD291 y *Metschnikowia pulcherrima* LAMAP 1781.

Como se puede observar (Figura 3), para los tres lotes se dio la fermentación alcohólica por finalizada a los 8 días. Sin embargo, en las primeras 48h el descenso de densidad fue más rápido en el testigo coincidiendo con el período en el que en los depósitos de inoculación secuencial aún no se había inoculado la cepa de Sc. A partir de la inoculación de la cepa QA23 en los depósitos de inoculación secuencial la fermentación evolucionó paralelamente en los 3 depósitos aunque para el depósito de inoculación secuencial con *Torulaspora* TD291 se alcanzaron densidades inferiores a 1000 un día más tarde.

Figura 3. Evolución de las fermentaciones: Garnacha blanca 2012.



Implantación de las levaduras

Chardonnay (2010): Inoculación secuencial con *Torulaspora delbrueckii* TD291.

Tabla 2. Porcentaje de implantación de las cepas sembradas.

	Sc QA23 (a)	Sc QA23 (b)	Level 2TD (a)	Level 2TD (b)
ANTES del inóculo de Sc	-	-	(1080)* 100 % Tor	(1077) 100% Tor
MITAD FA	(1040) 100 % Sc	(1040) 100 % Sc	(1057) 50% Sc + 33,33 % Tor + 8,33 % "a" + 8,33 % "b"	(1045) 91,66 % Tor + 8,33 % Sc
FINAL FA	(992) 100 % Sc	(994) 100 % Sc	(990) 75 % Sc + 25 % Tor	(991) 58 % Tor + 42 % Sc

() *Densidad en el momento de toma de muestra

En las fermentaciones donde sólo se sembró *S. cerevisiae* QA23 la implantación de ésta fue total (Tabla 2). En el caso de las fermentaciones donde se realizó inoculación secuencial, la cepa de *Torulaspota* se implantó en ambos depósitos desde el inicio hasta el momento de la inoculación de *S. cerevisiae*. A partir de aquí, el comportamiento a nivel de población de levaduras fue distinto: mientras que en el depósito Level 2TD (a) *S. cerevisiae* desplazó a *Torulaspota* de manera paulatina a mitad y final del proceso, en el depósito Level 2TD (b) *Torulaspota* predominó sobre *S. cerevisiae* a mitad del proceso y también ligeramente al final.

Garnacha tinta (2012). Inoculación secuencial con *Torulaspota delbrueckii* TD291 y *Hansenula anomola* (IVICAM).

Tabla 3. Porcentaje de implantación de las cepas sembradas.

	Sc EC 1118	Torulaspota + EC 1118	Hansenula + EC 1118
ANTES del inóculo de Sc	-	75 % Tor + 25 % otras Sc (5 perfiles: A (8,33 %); B,C,D,E (4,16 % cada uno))	22,23 % Hans + 77,77 % otras Sc
MITAD FA	100 % EC 1118	19,04 % EC 1118 + 14,28 % Torula + 58,33 % otras Sc (9 perfiles: A,C,D,E,F (9,52 % cada una); B,G,H,I (4,76% cada una))	16,66 % EC 1118 + 0 % Hans + 83,33 % otras Sc (7 perfiles: A (45,83%); C,D,G (8,33 % cada una); B,E,F (4,17 % cada una))
FINAL FA	91,67 % EC 1118 + 8,33 % otras Sc (perfil "E")	20 % EC 1118 + 0 % Torula + 80 % otras Sc (7 perfiles: E (50%); A,F,J,K,L,M (5 % cada una))	27,27 % EC 1118 + 0 % Hans + 72,72 % otras Sc (10 perfiles: A (27,27%); I (9,1 %); C,D,F,H,J,K,L,M (4,54% cada una))

En el depósito testigo (Sc EC1118) no existió ningún problema de imposición de la cepa seleccionada. Por lo tanto, se asume que esta cepa no presenta ningún problema de fermentación cuando se siembra al inicio de la fermentación alcohólica, en mostos de uva tinta de alto grado alcohólico a temperaturas de proceso elevadas.

En el depósito de inoculación secuencial con *Torulasporea* (Tor + EC 1118), la presencia de esta cepa no *Sc* antes de la inoculación de la EC 1118 fue importante (75 %). La implantación de la cepa EC 1118 posterior a su inóculo no fue demasiado buena: 19 % de presencia a mitad y 20 % al final de la FA. Al final del proceso, se encontraron como dominantes, cepas de *S. cerevisiae* salvajes que también se encontraron como mayoritarias en otros depósitos.

La vinificación con inoculación secuencial con *Hansenula* (Hans + *Sc* EC 1118) no presentó la implantación de levaduras esperada. La presencia de *Hansenula anomala* durante las 24 primeras horas de proceso fermentativo fue sólo del 22 %. A mitad de fermentación había desaparecido totalmente. *S. cerevisiae* EC 1118 tuvo dificultades de implantación, encontrándose sólo en un 16,7 % a mitad y en un 27,3 % al final. El resto de levaduras encontradas fueron levaduras autóctonas, presentes en el mosto de partida. Una de ellas, la cepa "A", la que presentó un porcentaje de presencia más alto, también se encontró como mayoritaria (mismo perfil que la cepa "E") en el depósito de inoculación secuencial con *Torulasporea*.

Garnacha blanca (2012). Inoculación secuencial con *Torulasporea delbrueckii* TD291 y *Metschnikowia pulcherrima* LAMAP 1781.

Tabla 4. Porcentaje de implantación de las cepas sembradas en la experiencia con Garnacha blanca (2012).

	Sc QA23	Torulasporea + QA23	Metschnikowia + QA23
ANTES del inóculo de Sc	-	30,43% Torula + 69,57% otras <i>Sc</i> (7 perfiles: A (21,74%); B, D, E (8,7% cada una); C (13,04%); F, I (4,35% cada una))	54,17% Metsch + 45,83% otras <i>Sc</i> (5 perfiles: A,B (16,67% cada una) ; C,D,N (4,17% cada una))
FINAL FA	91,67% QA23 + 8,33% otra <i>Sc</i> (1 perfil: A)	8,33 % QA23 + 12,5% Torula + 79,17% otras <i>Sc</i> (6 perfiles: A (33,33%); B, E, G (4,16% cada una); C (20,83%); D (12,5%))	50% QA23 + 0% Metsch + 50% otras <i>Sc</i> (3 perfiles: A (16,67%), C (29,17%); H (4,17%))

En los depósitos con inoculación secuencial de levaduras se observa que antes de añadir la cepa de Sc, la cepa *Metschnikowia* presenta una implantación mayor (54%) que la cepa de *Torulaspóra* (30%). En ambas vinificaciones el resto de perfiles encontrados son de Sc autóctonos.

Al final de la FA en las vinificaciones de inoculación secuencial se observa que la cepa de *Torulaspóra* todavía mantiene un 12% de implantación mientras que la cepa QA23 presenta un porcentaje de implantación bastante bajo (8%). El resto son perfiles de Sc autóctonos. En la vinificación inoculada con la cepa de *Metschnikowia* ésta ha desaparecido por completo y la cepa QA23 presenta un porcentaje de implantación del 50%, el otro 50 % es de otras cepas de Sc.

Así pues parece que *Torulaspóra* presenta un porcentaje de implantación inicial inferior a *Metschnikowia*. Sin embargo, esta última desaparece a medida que avanza la fermentación mientras que *Torulaspóra* presenta un pequeño porcentaje de supervivencia.

En lo que respecta al testigo al final de la FA la implantación de la cepa inoculada (QA23) es de casi el 92%, el porcentaje restante es para el perfil "A", perfil de una cepa autóctona que aparece en todos los depósitos y estadios de fermentación analizados en porcentajes considerables.

Análisis enológico de los vinos

Chardonnay (2010): Inoculación secuencial con *Torulaspóra delbrueckii* TD291.

Los análisis de los vinos de las dos modalidades después de la fermentación alcohólica se muestran en la Tabla 5. Todas las fermentaciones acabaron sin dejar azúcares residuales y alcanzando un grado alcohólico muy similar. No existieron diferencias significativas entre los vinos en la acidez volátil ni en el resto de parámetros testados entre los vinos.

Tabla 5. Características de los vinos de Chardonnay.

	Sc QA23 (a)	Sc QA23 (b)	Level 2TD (a)	Level 2TD (b)
PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS				
Grado alcohólico (% vol)	13.14	13.12	13.08	12.95
Acidez total (ác. tartárico) (g/L)	5.6	5.9	5.4	5.5
Acidez acética (ác. acético) (g/L)	0.22	0.20	0.13	0.28
Azúcares totales (G+F) (g/L)	1.4	1.4	1.6	1.8
pH	3.36	3.35	3.39	3.38
Ácido L-málico (g/L)	2.3	2.5	2.2	2.2
Ácido L-láctico (g/L)	0.2	0.3	0.3	0.3
Calcio (mg/L)	86	92	87	85
Magnesio (mg/L)	75	74	74	73
Potasio (mg/L)	637	637	690	712
PARÁMETROS CROMÁTICOS				
A ₄₂₀	0,069	0,075	0,07	0,091

A ₅₂₀	0,02	0,02	0,016	0,022
A ₆₂₀	0,005	0,007	0,006	0,006
A ₂₈₀ (IPT)	6,99	6,7	5,65	6,32
A ₃₂₀ (ácidos hidroxicinámicos)	1,649	1,649	1,652	1,653
Intensidad	0,094	0,102	0,092	0,118
Tonalidad	3,449	3,75	4,375	4,136
Cielab "L" (luminosidad)	98,576	98,494	98,748	98,371
Cielab "a" (-a "verde"; +a "rojo")	-0,276	-0,587	-0,681	-0,663
Cielab "b" (-b "azul"; +b "amarillo")	4,824	5,11	4,817	6,361
Cielab "H" (hue)	93,277	96,553	98,051	95,957
Cielab "C" (cromaticidad)	4,832	5,144	4,865	6,395
Cielab "S" (saturación color)	0,049	0,052	0,049	0,065

Garnacha tinta (2012). Inoculación secuencial con *Torulasporea delbrueckii* TD291 y *Hansenula anomola* (IVICAM).

Tabla 6. Características de los vinos de Garnacha tinta.

	Sc EC 1118	Torulasporea + EC 1118	Hansenula + EC 1118
PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS			
Grado alcohólico % vol	14.69	15.09	14.55
Acidez total g/L	3.9	4.2	4.1
Acidez volátil g/L	0.53	0.57	0.53
Ácido láctico g/L	0.5	0.5	0.5
Ácido málico g/L	0.1	0.1	0.1
Dióxido de azufre libre mg/L	9	7	7
Dióxido de azufre total mg/L	22	19	20
pH	3.65	3.69	3.64
Glucosa + fructosa g/L	0.4	0.5	0.5
Glicerol g/L	9.6	10.8	10.1
Ácido tartárico g/L	2.6	2.5	2.8
PARÁMETROS CROMÁTICOS			
Abs 320	17.940	18.920	19.950
Abs 280	38.090	40.100	43.110
Abs 420	2.286	2.380	2.551
Abs 520	3.739	3.687	4.223
Abs 620	0.741	0.777	0.843
IC	6.766	6.844	7.617
Tonalidad	0.611	0.645	0.604
a*	54.05	53.18	52.19
b*	33.51	32.68	31.87
L*	22.7	21.8	20.2
C	63.60	62.42	61.15
H*	31.80	31.57	31.41
Antocianos totales mg/L	313	300	353
Taninos mg/L	1388	1598	1744

Los vinos con inoculación secuencial difieren ligeramente del vino control presentando mayores valores de glicerol, compuestos fenólicos totales (A_{280}) y taninos, pudiendo contribuir al cuerpo y estructura del vino final.

Garnacha blanca (2012). Inoculación secuencial con *Torulaspota delbrueckii* TD291 y *Metschnikowia pulcherrima* LAMAP 1781.

Tabla 7. Características de los vinos de Garnacha blanca.

	Sc QA23	<i>Torulaspota</i> + QA23	<i>Metschnikowia</i> + QA23
PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS			
Grado alcohólico % vol	13.80	13.70	13.90
Acidez total g/L	4.3	4.2	4.4
Acidez volátil g/L	0.33	0.43	0.32
Ácido láctico g/L	<0.1	<0.1	<0.1
Ácido málico g/L	0.54	0.57	0.57
Dióxido de azufre libre mg/L	12	9	11
Dióxido de azufre total mg/L	70	75	74
pH	3.39	3.40	3.41
Glucosa + fructosa g/L	0.11	<0.10	0.10
Glicerol g/L	6.98	6.59	6.52
Ácido tartárico g/L	2.94	2.94	2.95
PARÁMETROS CROMÁTICOS			
Abs 280	10.333	10.289	10.296
Abs 420	0.095	0.083	0.091
Abs 520	0.047	0.033	0.035
Abs 620	0.013	0.008	0.012
IC	0.155	0.124	0.138
Tonalidad	2.202	2.515	2.600
Taninos mg/L	50	40	50

En lo que respecta a los parámetros físico-químicos sólo se observan pequeñas diferencias en lo que respecta a la acidez volátil y el contenido en glicerol. Aunque para los 3 vinos la acidez volátil es inferior a 0.45 g/L para el vino obtenido en la vinificación de inoculación secuencial con la cepa *Torulaspota* TD291 es una décima superior (0.43 g/L) que para el testigo y el vino de inoculación secuencial con *Metschnikowia* (0.33 y 0.32 g/L respectivamente). El contenido final en glicerol de los vinos es ligeramente superior en el vino testigo que en los vinos de inoculación secuencial. Para el resto de parámetros físico-químicos no se observan diferencias significativas entre los 3 vinos.

Los parámetros cromáticos de los vinos tampoco muestran diferencias significativas. Sólo destacar que en general las Abs a 280, 420, 520 y 620 nm son ligeramente más altas para el vino testigo y que el vino procedente de la inoculación secuencial con *Torulaspota* es el que

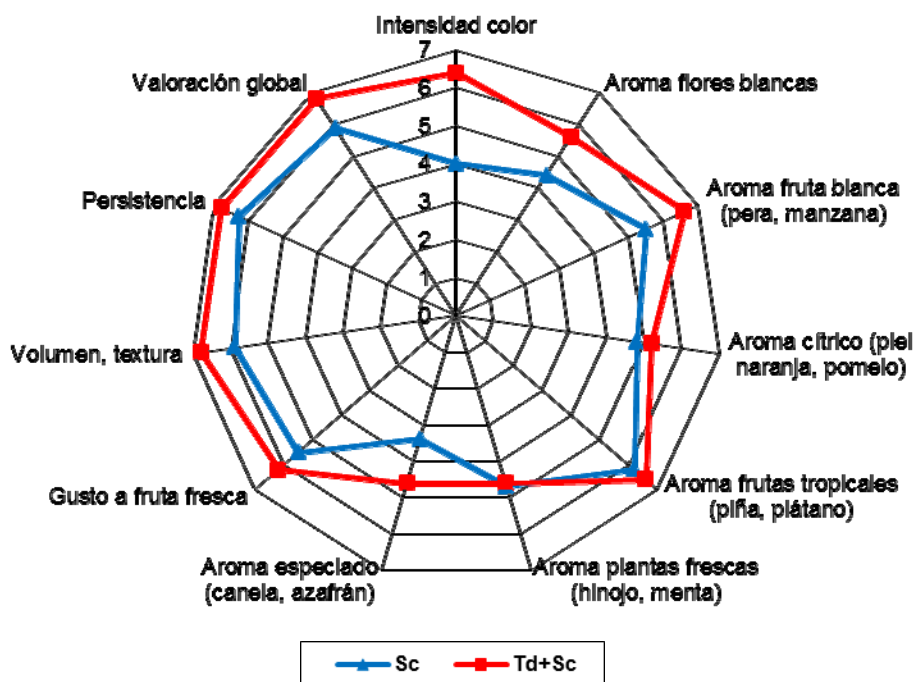
presenta valores más bajos. En cuanto a la concentración de taninos también es inferior para el vino de inoculación secuencial con *Torulaspota* que para los otros dos vinos.

Análisis sensorial

Chardonnay (2010): Inoculación secuencial con *Torulaspota delbrueckii* TD291.

Los vinos obtenidos con los dos procedimientos se juzgaron significativamente diferentes como puede observarse en la Figura 4. Los valores que se presentan son la media de los aportados por todos los catadores para cada descriptor. Sólo se representa uno de los dos duplicados para cada tratamiento. Como tendencia, los lotes fermentados con inoculación secuencial se valoraron como más intensos aromáticamente y más complejos, con notas notablemente más afrutadas y florales. Los vinos testigo presentaron notas semejantes a frutas tropicales pero menos intensas en los descriptores de frutas blancas (pera, manzana), flores blancas y especies como canela o azafrán. En boca, se percibió una mayor textura, volumen y persistencia en los vinos elaborados con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*.

Figura 4. Puntuación sensorial de los diferentes descriptores en los vinos de Chardonnay



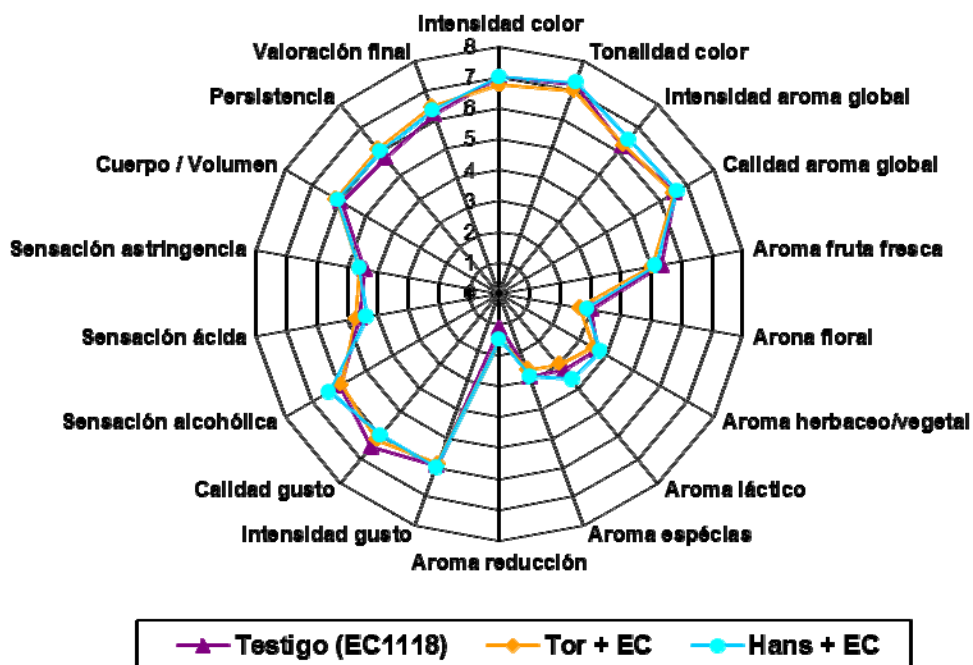
Garnacha tinta (2012). Inoculación secuencial con *Torulaspora delbrueckii* TD291 y *Hansenula anomola* (IVICAM).

En el caso de esta variedad se realizó un test de comparaciones múltiple que nos permitió efectuar la comparación simultánea de varias muestras, teniendo en cuenta el tratamiento con distintas levaduras y repeticiones del mismo tratamiento, y mediante el análisis estadístico de los resultados, nos permitió concluir que las diferencias entre los vinos no eran significativas.

En referencia al análisis descriptivo (Figura 5), se pidió a los catadores que puntuaran 17 descriptores en una escala del 0 al 9. Al realizar el tratamiento estadístico de los datos de la puntuación para cada descriptor (análisis de la varianza, ANOVA de un factor) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Aunque en estos vinos no se observaron diferencias significativas ni en la composición química ni en las puntuaciones sensoriales, la sensación general de los catadores en los vinos elaborados con inoculación secuencial, tanto con *Torulaspora* como con *Hansenula*, fue de mayor persistencia y cuerpo en boca respecto al vino testigo elaborado sólo con *S. cerevisiae*.

Figura 5. Puntuación sensorial de los diferentes descriptores en los vinos de Garnacha tinta



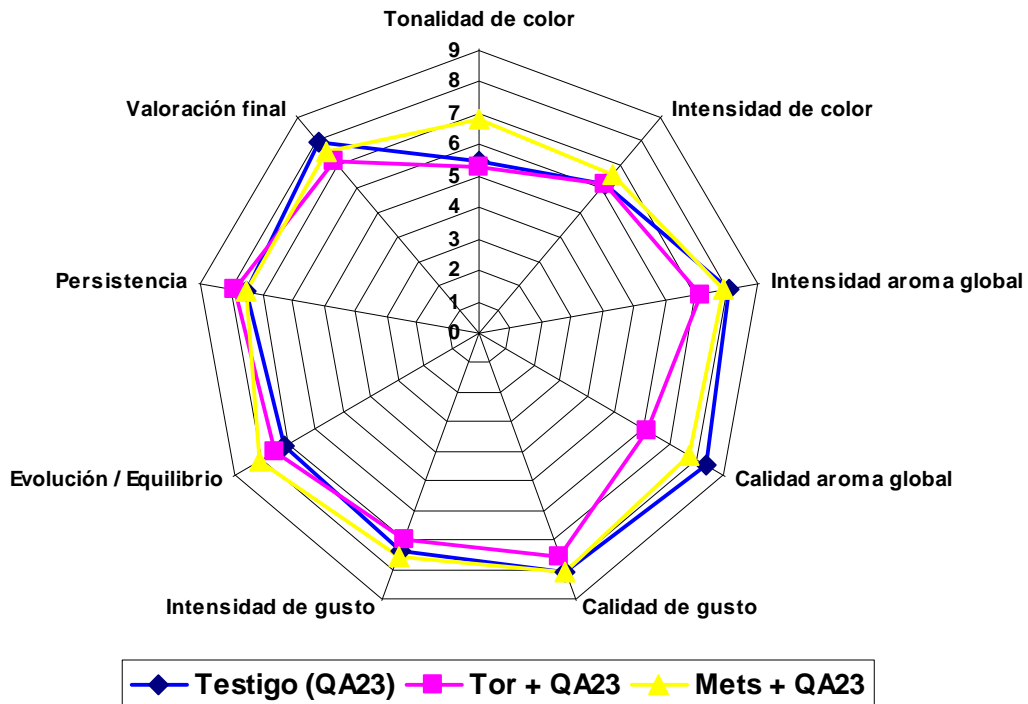
Garnacha blanca (2012). Inoculación secuencial con *Torulaspota delbrueckii* TD291 y *Metschnikowia pulcherrima* LAMAP 1781.

Para esta experiencia se hizo una cata con 7 jueces comparando simultáneamente los 3 vinos. Los distintos descriptores están valorados de 0 a 9. Se puede observar en el gráfico de la Figura 6 que el vino de inoculación secuencial con *Metschnikowia* mantiene una puntuación elevada en la mayoría de los descriptores, destacándose los descriptores gustativos.

Los catadores describieron el vino testigo como un buen ejemplo de la variedad, identificando a la vez el vino de inoculación secuencial con *Metschnikowia* con características muy similares. En el vino de inoculación secuencial con *Torulospota* predominaron los aromas de compota de fruta blanca.

Gustativamente ambos vinos de inoculación secuencial fueron considerados de mayor volumen y persistencia en boca que el testigo.

Figura 6. Puntuación sensorial de los diferentes descriptores en los vinos de Garnacha blanca



Conclusiones generales

Estos resultados muestran claramente un fuerte interés en la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* en sinergia con levaduras de la especie *S. cerevisiae*. En este estudio, el uso de una cepa de *T. delbrueckii* (TD 291) y una de *S. cerevisiae* complementaria o bien una de *Metschnikowia* (LAMAP 1781) con *S. cerevisiae* repercute en un impacto notable sobre la intensidad y complejidad aromática, así como en un mejor volumen en boca de los vinos blancos obtenidos en comparación con los vinos elaborados con inóculos convencionales con *S. cerevisiae*.

Respecto a los vinos tintos elaborados con inoculación secuencial con *Torulaspota* (TD 291) y *Hansenula* (IVICAM) y una cepa de *S. cerevisiae* no se observan diferencias significativas en cuanto a composición química y cualidades sensoriales de los vinos respecto a los elaborados sólo con *S. cerevisiae*. Aunque los catadores manifestaron la sensación de mayor persistencia y cuerpo en boca en los vinos con inoculación secuencial.

Por lo tanto, este sistema de inoculación ofrece al enólogo nuevas opciones para influir en la calidad organoléptica de los vinos de manera controlada.

Publicaciones

A. Puig-Pujol, J.M^a Heras, E. Bartra, S. Romero, F. Capdevila, J. Viñas, S. Mínguez. 2011. "Inoculación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* para la mejora aromática en variedades blancas". XI Congreso Nacional de Investigación Enológica (GIENOL). Jerez de la Frontera, del 1 al 3 de Junio de 2011.

6. EXTREMADURA

EMILIANO ZAMORA DE ALBA / MANUEL RAMÍREZ FERNÁNDEZ

Financiación y período de ensayo

- Fondos propios
- PROYECTO: Apoyo a los planes de actuación de los Grupos Catalogados. Consejería de Infraestructura y Desarrollo Tecnológico. Junta de Extremadura. (GR10088).
- PROYECTO: Caracterización y selección de nuevas levaduras vínicas asesinas (killer) para acelerar la autólisis de las lías en la elaboración de cava. DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y GESTIÓN DEL PLAN NACIONAL DE I+D+i. Ministerio de Ciencia e Innovación. (AGL2011-25711).
- Período de ensayo: 2010-2012

Participantes

Emiliano Zamora ², Matilde Maqueda ¹, María Luz Álvarez ², Pedro Cotilla ², Rocío Velázquez ¹, Manuel Ramírez ¹

¹Departamento de Ciencias Biomédicas Área de Microbiología, Edificio Juan Remón Camacho, Avda. de Elvas s/n. 06071 Badajoz. mramirez@unex.es.

²Estación Enológica, Consejería de Agricultura, Medio Ambiente, Desarrollo Rural y Energía. Junta de Extremadura. Almendralejo, Badajoz.

Ensayo: Inoculación secuencial o inicial de *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* en mosto uvas blancas y tintas de Extremadura

Objetivos

- Evaluar la cinética fermentativa de la inoculación secuencial e inicial de *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*
- Analizar la capacidad de implantación de la levadura *Torulaspota*
- Determinar la influencia de la inoculación secuencial sobre las características químicas y sensoriales de los vinos.

Metodología:

Mosto/pasta: Cigüente 2010 suplementado con 0,3 g/L de activador de fermentación y Cabernet-Sauvignon 2011, cuyas características se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los mostos de este estudio.

Parámetro	Cigüente 2010	Cabernet-Sauvignon 2011
<i>Grado probable (% vol)</i>	10,7	14,6
<i>Azúcares reductores (g/l)</i>	181	247
<i>Acidez total (g/l tartárico)</i>	6,4	6,2
<i>pH</i>	3,12	3.67
<i>Ácido Málico (g/l)</i>	1,7	2,1

Levaduras inoculadas:

- Cinco levaduras autóctonas *Torulaspota*: dos estirpes killer *Kbarr-1*, una silvestre, EX1180, y su mutante espontáneo resistente a cicloheximida (CYH^R), EX1180-11C4; dos estirpes killer *Kbarr-2*, una silvestre, EX1257, y su mutante CYH^R, EX1257-CYH5; y un mutante CYH^R y no-killer procedente de la levadura EX1180, EX1180K-.
- Un mutante CYH^R de una levadura *Torulaspota* comercial no-killer (*Torulaspota delbrueckii* TD291 de Lallemant), TL3.
- Dos levaduras *Saccharomyces cerevisiae* comerciales de la casa Heral Enología SL: EX88 (killer K2) y E7AR1 (killer K2 y CYH^R).

Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron por duplicado en depósitos estériles de vidrio de 5 L de capacidad a temperatura controlada en cámara termostatazada.

Los inóculos de las levaduras se obtuvieron mediante crecimiento 48 horas en YPD. Las células se recuperaron por centrifugación, se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en el mosto. Se añadieron a una concentración aproximada de 10⁷ cél/ml. La temperatura se controló a 16-18°C para vino blanco y 20-22°C para vino tinto. La evolución de las fermentaciones se siguió mediante medida diaria de densidad, °Brix y temperatura.

Control microbiológico

Se tomaron muestras para el control de implantación de las levaduras inoculadas al inicio de la fermentación, en fase tumultuosa y al final. En las fermentaciones con inoculación secuencial también se tomó muestra tras la inoculación de la segunda levadura *S. cerevisiae*. Las muestras se diluyeron de forma adecuada y se sembraron en medio YEPD. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias visibles, se procedió al recuento de levaduras, análisis de su morfología, y réplica en placa de YEPD suplementado con 2ug/L de cicloheximida. Adicionalmente, se aisló de un número representativo de colonias de cada muestra para su posterior identificación mediante el análisis de su morfología celular, de sus esporas, el mtDNA-RFLP, su fenotipo killer, y la presencia de virus de dsRNA. Con estos datos se validaron los resultados obtenidos mediante réplica en placa de YEPD suplementado con

2ug/L de cicloheximida. El test de fenotipo killer, aislamiento de ácidos nucleicos, análisis de restricción del mtDNA, y análisis de los dsRNA víricos se realizaron como se describió previamente (1, 3).

Análisis químico y sensorial de los vinos

Los parámetros químicos básicos de los mostos y vinos (grado alcohólico, azúcares reductores, acidez total, acidez volátil, pH, ácido tartárico, ácido málico, y ácido láctico) se determinaron según los métodos oficiales (Reglamento CE 479/2008) o con un analizador FTIR (WineScan FT120-FOSS Electric) calibrado en base dichos métodos. El contenido de sulfuroso libre y total de los vinos se cuantificó siguiendo la metodología oficial (Reglamento CE 479/2008).

La valoración sensorial de los vinos fue realizada por un panel de 6 catadores expertos de la DO Ribera del Guadiana.

Resultados

Nuestra primera opción para la inoculación de levaduras *Torulaspota* fue seguir las recomendaciones de las publicaciones existentes y de las casas comerciales de levaduras vínicas, la inoculación secuencial, inicialmente con *Torulaspota* y dos días después con *Saccharomyces* más activador de fermentación para asegurar la viabilidad de las levaduras. Lamentablemente, las levaduras *Torulaspota* fueron rápidamente desplazadas en menos de un día por las levaduras *Saccharomyces*, participaron muy poco en el proceso de fermentación, y no se apreció ninguna mejora digna de destacar en los vinos inoculados con *Torulaspota*. Es más, en estos casos hubo frecuentemente problemas de final de fermentación en vinos blancos y deterioro de la calidad organoléptica en los vinos tintos respecto al control sin inoculas. A la vista de estos resultados, decidimos analizar en detalle la interferencia entre las poblaciones de levaduras *Torulaspota* y *Saccharomyces* mediante co-inoculación inicial del mosto con mezclas de dos levaduras, involucrando en los experimentos a nuevas levaduras *Torulaspota* killer.

Las fermentaciones realizadas con mosto Cigüente indican que las levaduras *Saccharomyces* desplazan con mucha facilidad a las levaduras *Torulaspota*. Es necesario una proporción inicial del 90% para asegurar la dominancia de las levaduras *Torulaspota* killer. Esta dominancia se ve favorecida en mosto filtrado sin partículas adsorbentes de las toxinas killer, aunque también se observó en mosto desfangado. Esta proporción inicial de levaduras *Torulaspota* killer requerida para desplazar a las levaduras *Saccharomyces* es muy superior a la proporción requerida de levaduras *Saccharomyces* K2 (menos del 10%) para obtener tasas de similares de desplazamiento (2). Las *Torulaspota* no-killer fueron incapaces de dominar la fermentación en las mismas condiciones. En las fermentaciones con un 50% inicial de

Torulaspota, éstas fueron desplazadas fácilmente por *Saccharomyces*, aunque las *Torulaspota* killer permanecieron en mayor proporción que las no-killer durante varios días (Figura 1).

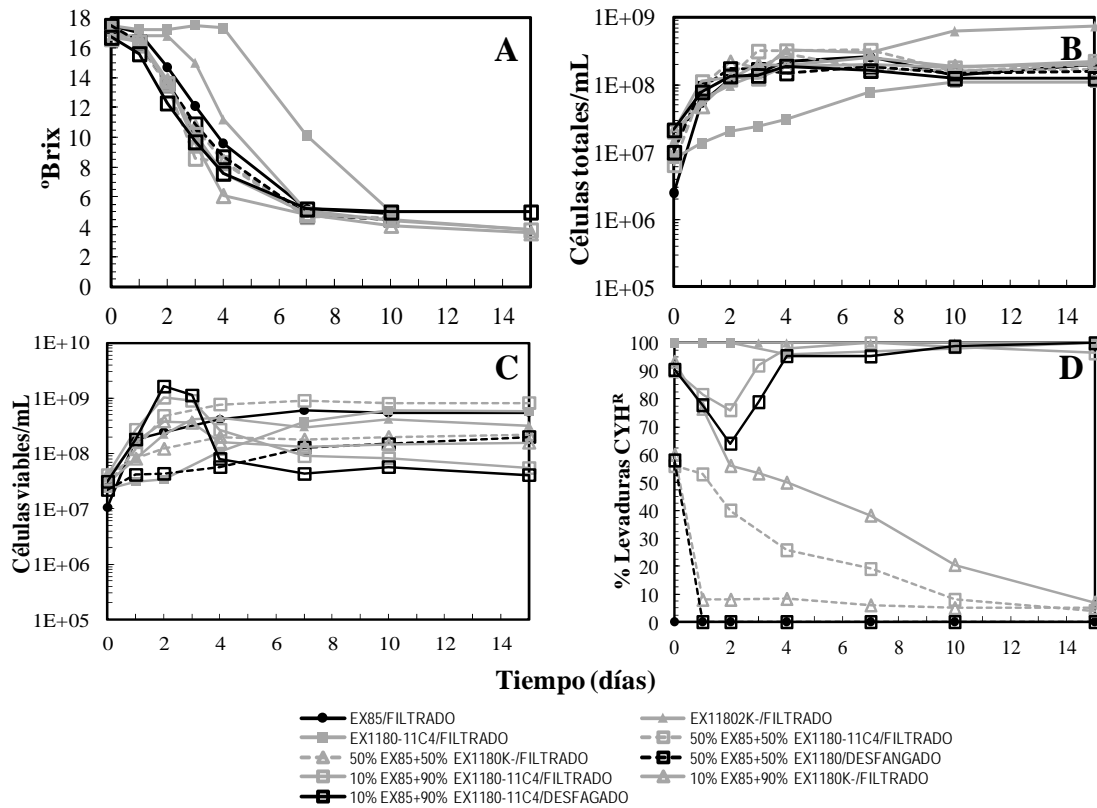


Figura 1. Evolución de las fermentaciones de mosto Cigüente desfagado o filtrado inoculado con distintas levaduras. A: °Brix. B: Levaduras totales. C: Levaduras viables. D: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R).

La inoculación inicial de mosto Cigüente desfagado con levaduras *Torulaspota* sin inoculación posterior con *Saccharomyces* demostró que las levaduras *Torulaspota* pudieron dominar fácilmente la fermentación al haber pocas levaduras *Saccharomyces* silvestres en el mosto clarificado (Figura 2). No obstante, la cinética de fermentación de las fermentaciones inoculadas con *Torulaspota* fue siempre más lenta que la correspondiente a *Saccharomyces*, y en algunos casos hubo problemas de final de fermentación, quedando los vinos semisecos. Además, los catadores no apreciaron mejora evidente de la calidad de los vinos, aunque si apreciaron aromas a fruta confitada/pastelería en los vinos elaborados con *Torulaspota*. No hubo degradación de málico en ningún vino, ni incremento de la cantidad de láctico. En consecuencia, tampoco se apreciaron aromas lacteados en ningún vino.

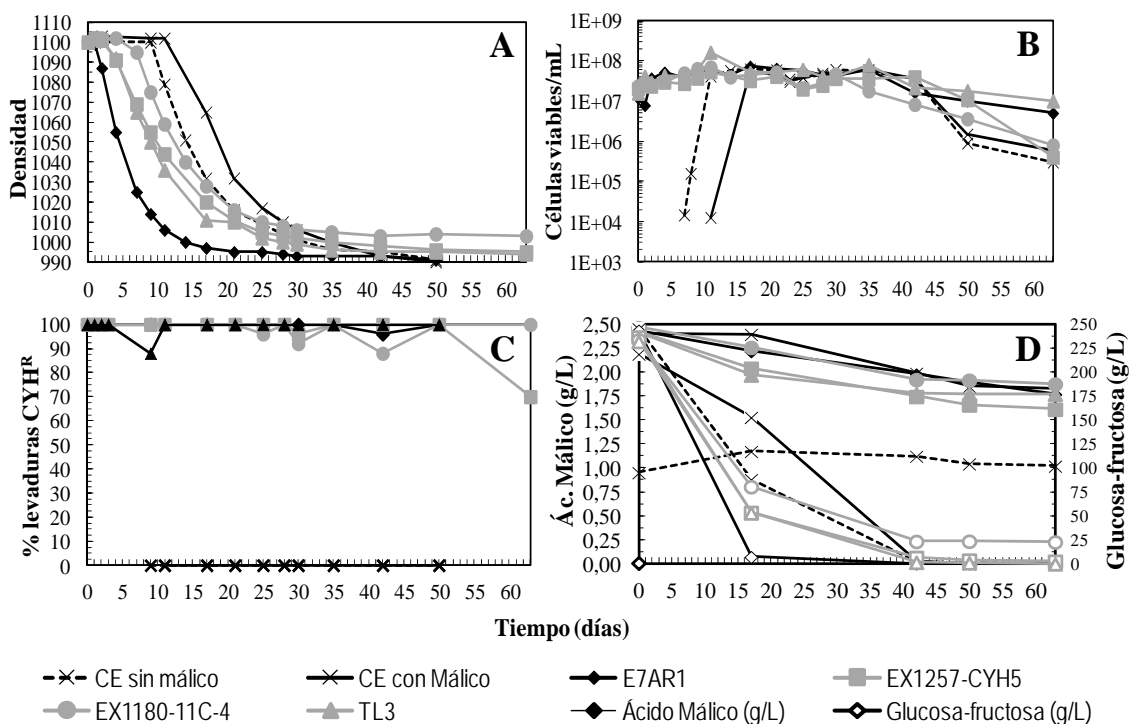


Figura 2. Evolución de las fermentaciones de mosto Cigüente desfangado, suplementado o no con L-málico hasta 2,4 g/L, e inoculado con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. A: Densidad. B: Levaduras viables. C: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R). D: Consumo de azúcares y málico.

Finalmente, la inoculación inicial de pasta de uva Cabernet-Sauvignon con levaduras *Torulaspota*, sin inoculación posterior con *Saccharomyces*, indica que las levaduras *Torulaspota* pueden dominar la fermentación aunque con cierta dificultad al haber muchas levaduras *Saccharomyces* silvestres en los hollejos. Esta dominancia fue mejor cuando se inocularon levaduras *Torulaspota* killer (EX1180-11C4 o EX1257-CYH5) respecto a las fermentaciones inoculadas con *Torulaspota* no-killer (TL3). Una vez más, la cinética de fermentación de las vinificaciones inoculadas con *Torulaspota* fue siempre más lenta que la correspondiente a *Saccharomyces*, aunque en esta ocasión no hubo problemas de final de fermentación quedando los vinos secos. Sólo se apreció fermentación maloláctica en los vinos inoculados con *Torulaspota* (Figura 3). Se apreciaron mejoras evidentes de algunos parámetros enológicos y de la calidad de los vinos de *Torulaspota*, más redondos en boca, aromas a fruta confitada/pastelería, y tonos lacteados (Tabla 1). En contraprestación, como es lógico, disminuyó la intensidad de los aromas frutales respecto a los vinos inoculados con *Saccharomyces* o control sin inocular, en los que no se produjo fermentación maloláctica.

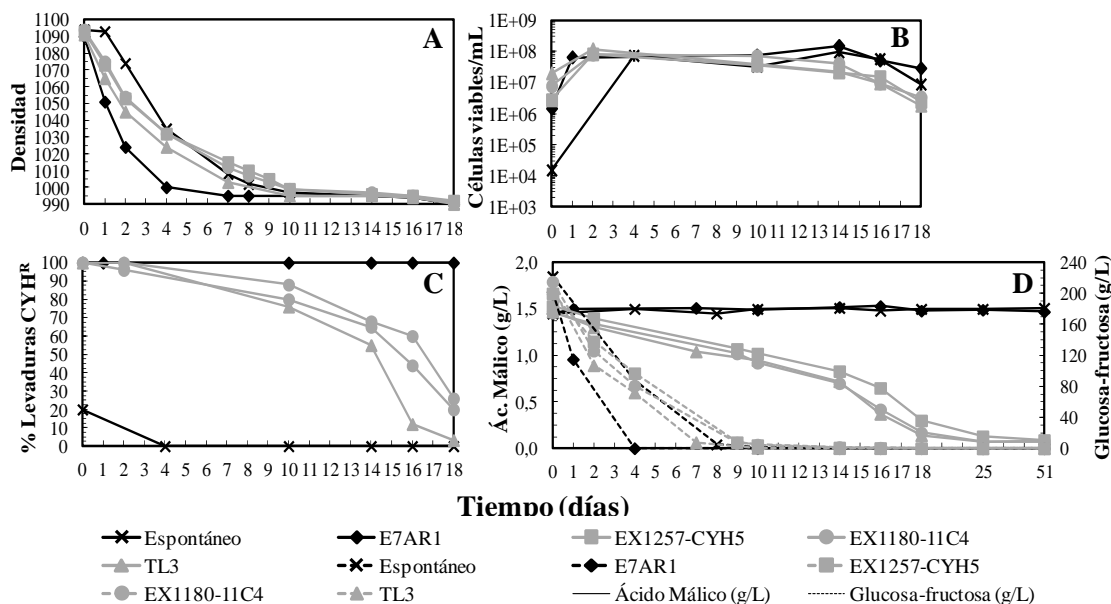


Figura 3. Evolución de las fermentaciones de uva Cabernet-Sauvignon inoculado con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. A: Densidad. B: Levaduras viables. C: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R). D: Consumo de azúcares y málico.

Análisis físico-químico y organoléptico de los vinos

Parámetro	Espontáneo	E7AR1	CH1257-CYH5	EX1180-11C-4	TL3
T15 (días)	2,67	0,83	1,25	1,5	1,17
T100 (días)	8	4	9,5	9,5	8,5
Grado alcohólico (% v/v)	13,2	12,58	12,97	12,97	12,92
Azúcares residuales (g/L)	2,4	2,0	3,7	3,9	3,1
Ac. Total (g/L)	8,5	8,6	7,2	7,1	6,4
Ac. volátil (g/L)	0,31	0,24	0,43	0,65	0,63
Masa Volúmica (g/mL)	0,990	0,990	0,992	0,991	0,990
pH	3,3	3,28	3,4	3,43	3,47
Ac málico (g/L)	1,54	1,43	0,09	0,08	0,07
Ac. láctico (g/L)	0,07	0,06	0,79	0,64	0,65
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,03	0,01	0,19	0,33	0,09
Note Análisis organoléptico-1	86	70	75	87	60
Análisis organoléptico-2	86	70	85	87	60

Tabla 1. Características de los vinos elaborados con uva Cabernet -Sauvignon.

Comentario de cata:

El vino EX1180-11C4 tiene una agradable fase olfativa, con notas a frutas rojas y lacteados que recuerdan a yogur de fresa y frambuesa. No presenta toques vegetales que recuerden a la variedad. En boca es el más equilibrado destacando menos la acidez que en los otros vinos y con buena estructura y persistencia. Vía retronasal lacteados y frutales persistentes.

Publicaciones más destacadas:

1. **Maqueda, M., E. Zamora, N. Rodríguez-Cousiño, and M. Ramírez.** 2011. Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiol.* **27**:205-209.
2. **Pérez, F., M. Ramírez, and J. A. Regodón.** 2001. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **79**:393-399.
3. **Rodríguez-Cousiño, N., M. Maqueda, J. Ambrona, E. Zamora, E. Esteban, and M. Ramírez.** 2011. A new wine *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus encoded killer toxin (*Klus*) with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:1822-1832.

7. GALICIA

PILAR BLANCO CAMBA

Financiación y período de ensayo

- Fondos propios
- Colaboración de Lallemand (JM Heras) y Laffort.

Período de ensayo: 2010 y 2011

Participantes

Ignacio Orriols, Alfonso Losada, Esteban Pereira (contratado proyecto 08TAL002505PR de la Xunta de Galicia), Becarios de apoyo a la investigación de la Consellería do Medio Rural de la Xunta de Galicia (Iria Dacosta; Cintia Martínez; Ana María del Río).

Ensayo: Inoculación secuencial de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* en mosto de variedades de uva blanca de Galicia

Objetivos

- Evaluar la cinética fermentativa de la inoculación secuencial de *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*
- Analizar la capacidad de implantación de la levadura no-*Saccharomyces*
- Determinar la influencia de la inoculación secuencial sobre las características químicas y sensoriales de los vinos.

Metodología:

Mosto- plurivarietal (Treixadura; Godello, otras) cuyas características se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características del mosto plurivarietal utilizado en este estudio.

Parámetro	2010	2011
<i>Grado probable (% vol)</i>	13,7	13,9
<i>Azúcares reductores (g/l)</i>	231,3	234,6
<i>Acidez total (g/l tartárico)</i>	5,0	4,8
<i>pH</i>	3,44	3,47
<i>Ácido tartárico (g/l)</i>	5,1	5,5
<i>Ácido Málico (g/l)</i>	2,1	2,1
<i>Sulfuroso libre (mg/l)</i>	10	21
<i>Sulfuroso total (mg/l)</i>	38	78

Levaduras inoculadas:

2010

- Level 2TD® de Lallemand (Inoculación secuencial de la cepa *Torulaspora delbrueckii* TD291 + una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* específica)
- *S. cerevisiae* 24 (levadura autóctona de la colección de levaduras de la EVEGA)
- Lalvin YSEO QA23® de Lallemand
- Levaduras propias del mosto (fermentación espontánea)

2011

- *Torulaspora delbrueckii* TD291 (Lallemand) + *S. cerevisiae* 24 (EVEGA)
- *Torulaspora delbrueckii* Zymaflore® Alpha (Laffort) + *S. cerevisiae* 24 (EVEGA)
- *S. cerevisiae* 24 (EVEGA)

Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron por duplicado en depósitos de acero inoxidable de 100 l de capacidad dotados de camisa de refrigeración. Las levaduras comerciales se inocularon siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los inóculos de la levadura autóctona se obtuvieron mediante crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* 24 en YPD. Las células se recuperaron por centrifugación, se levaron con agua estéril y se resuspendieron en suero fisiológico hasta su uso. Cuando estuvo disponible el mosto, tras un paso previo de aclimatación, se añadieron al mismo a una concentración de 10^6 cél/ml. La temperatura se controló a 17°C y la evolución de las fermentaciones se siguió mediante medida diaria de la densidad y la temperatura. Una vez finalizada la fermentación el vino fue sulfitado, trasegado y, tras un proceso de clarificación y estabilización en frío, embotellado y conservado hasta su posterior análisis químico y sensorial.

Control microbiológico

Al inicio de la fermentación (Fi) y durante las fases tumultuosa (Ft) y final (Ff) de la misma se tomaron muestras para el control de implantación de las levaduras inoculadas. En los depósitos con inoculación secuencial también se tomó muestra tras la inoculación de la segunda levadura (F2). Las muestras se diluyeron de forma adecuada y se sembraron en medio WL Nutrient Agar (Scharlau Microbiology). Las placas se incubaron a 28°C hasta la aparición de colonias visibles, tras lo cual se procedió al recuento de levaduras y al aislamiento de un número representativo de colonias de cada muestra para su posterior identificación. Los aislados se crecieron en Lysine Medium (Scharlau Microbiology) para su diferenciación en levaduras de tipo *Saccharomyces* y non-*Saccharomyces*. Aquellos aislados identificados como *Saccharomyces* se caracterizaron a nivel de cepa mediante la técnica de análisis de los patrones de restricción del mtDNA (mtDNA-RFLPs) según el protocolo descrito por Querol *et al.* (1992).

Análisis químico y sensorial de los vinos

Los parámetros químicos básicos de los mostos y vinos (grado alcohólico, azúcares reductores, acidez total, acidez volátil, pH, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico y glicerol) se determinaron según los métodos oficiales (Reglamento CE 479/2008) o con un analizador FTIR (WineScan FT120-FOSS Electric) calibrado en base dichos métodos. El contenido de sulfuroso libre y total de los vinos se cuantificó siguiendo la metodología oficial (Reglamento CE 479/2008).

La valoración sensorial de los vinos fue llevada a cabo por un panel de 9 catadores expertos. La ficha de cata incluía diversos descriptores puntuados en una escala de 1 a 9 y los datos se procesaron utilizando el programa Big Sensory Soft.

Resultados

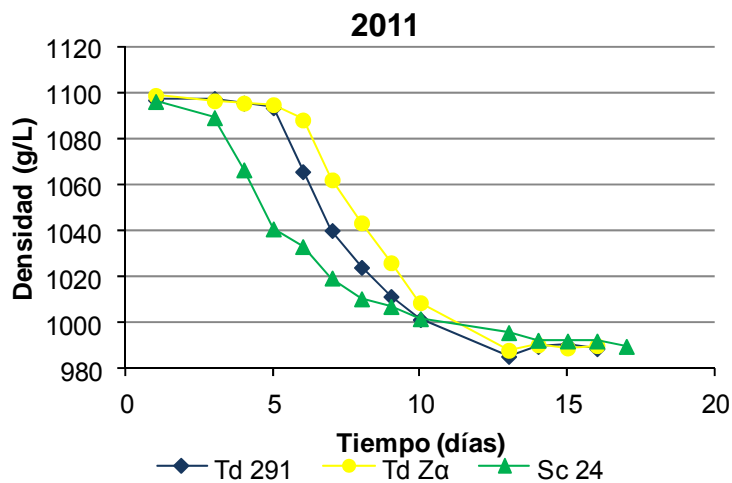
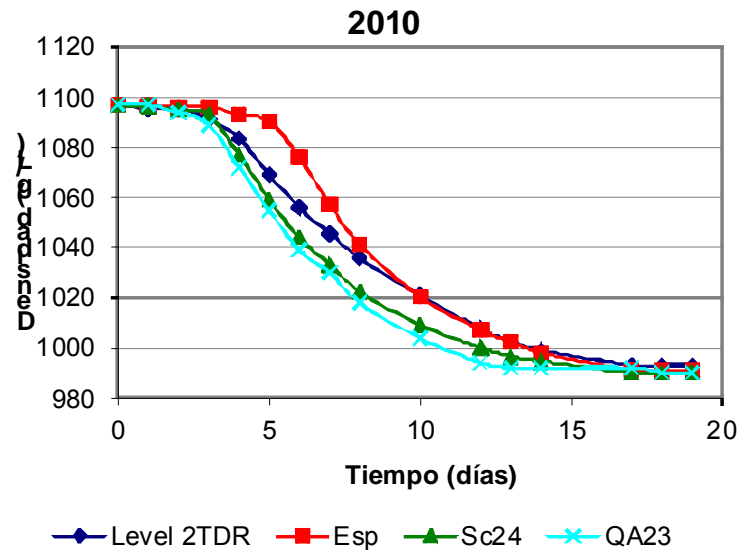


Figura 1. Evolución de las fermentaciones inoculadas con distintas levaduras durante la campaña de 2010 y 2011.

En todos los casos las fermentaciones transcurrieron normalmente, aunque se observaron diferencias en el inicio de las mismas. En 2010 las fermentaciones inoculadas con las levaduras comerciales (TD 291 y QA23) arrancaron el primer día, mientras que *S. cerevisiae* 24 arrancó el segundo día y la fermentación espontánea tardó 5 días en comenzar. Además, se observó que la velocidad de fermentación en fase tumultuosa era similar en las dos fermentaciones inoculadas con *S. cerevisiae* y el proceso espontáneo, y más lenta en la fermentación con inoculación secuencial. En cualquier caso, todas las levaduras completaron el proceso correctamente dando lugar a vinos de elevada graduación alcohólica y con menos de 2 g/l de azúcares residuales (Tabla 3). En los ensayos de 2011, las fermentaciones inoculadas con las cepas de *T. delbrueckii* tardaron hasta 5 días en arrancar, posiblemente debido a la elevada concentración de SO₂ del mosto ese año. A continuación, la velocidad de fermentación fue similar a la de la fermentación inoculada con *S. cerevisiae*.

El análisis genético de las levaduras aisladas durante la fermentación demostró que las cepas de *S. cerevisiae* inoculadas al inicio del proceso se habían implantado sobre la población microbiana presente en el mosto. Sin embargo, en los ensayos de inoculación secuencial el porcentaje de la levadura *T. delbrueckii* añadida al inicio varió a medida que avanzaba la fermentación (Tabla 2). En el caso de las fermentación del 2010 con inoculación secuencial se observó que la cepa de *T. delbrueckii* TD 291, no solo se implantó al inicio al 100%, sino que estaba presente a lo largo de todo el proceso incluso tras la inoculación de la cepa de *S. cerevisiae* QA 23 al cuarto día de fermentación. Sin embargo, en los ensayos del año 2011, esta cepa de *T. delbrueckii* TD291 aparecían al inicio de la fermentación y en fase tumultuosa con una frecuencia del 50, que disminuía al final del proceso. La presencia de la cepa Zymaflore Alpha disminuía en fase tumultuosa y ya no se detectó al final de la fermentación. Por tanto, a pesar de la concentración de SO₂ del mosto en 2011 y del retraso en el inicio de la fermentación, las levaduras *T. delbrueckii* fueron capaces de llevar a cabo la fermentación, aunque en menor proporción de lo que se observó en 2010. Además, la cepa Zymaflore® Alpha parecía ser más sensible a estas condiciones que la TD 291.

Tabla 2. Porcentaje de implantación de *T. delbrueckii* durante la fermentación.

Fermentación	Fi	F2	Ft	Ff
<i>Level 2TD</i> ®	100	60	48	47
<i>TD291+Sc 24</i>	45	--	44	26
<i>Zymaflore</i> ® <i>Alpha +Sc 24</i>	50	--	34	0

Otro dato a tener en cuenta fue que la cepa de *S. cerevisiae* Sc24 utilizada como segundo inóculo en 2011 no aparecía como cepa de *S. cerevisiae* responsable de la fermentación (resultados no mostrados). Por lo tanto, en los ensayos de inoculación secuencial quizás se debería aumentar la cantidad de inóculo de la segunda levadura o anticipar el momento de su adición.

Los resultados del análisis químico de los vinos (Tabla 3) obtenidos en 2010 indican que la inoculación secuencial de *Torulaspota delbrueckii* y *S. cerevisiae* dio lugar a vinos con menor graduación alcohólica, mayor acidez total y mayor contenido en glicerol. Con la levadura comercial QA23 los vinos presentaron mayor grado alcohólico pero menos glicerol que los demás, mientras que la cepa Sc24 de la EVEGA mostró menor rendimiento en alcohol pero producía más glicerol que la comercial. Finalmente, mediante fermentación espontánea se obtuvo casi tanto grado alcohólico como con la levadura comercial, aunque la acidez total era más baja.

Tabla 3. Características de los vinos obtenidos en 2010.

Parámetro	Level 2TD®	Esp	Sc24	QA23
Alcohol (%v/v)	13,6	14,2	13,9	14,3
Azúcares reductores (g/l)	0,8	1,0	0,9	0,7
Acidez total (g /l tartárico)	6,4	5,9	6,0	6,1
Acidez volátil (g/l acético)	0,23	0,22	0,33	0,31
pH	3,14	3,18	3,21	3,19
Ácido tartárico (g/l)	2,3	1,9	2,1	2,0
Ácido málico (g /l)	1,5	1,8	1,7	2,0
Ácido láctico (g/l)	--	0,4	0,4	0,3
SO ₂ libre (mg /l)	8	21	11	7
SO ₂ total (mg/l)	64	91	85	62
Glicerol (g/l)	8,3	7,5	7,6	7,3

En los ensayos del año 2011 no se observaron diferencias tan claras entre los vinos, excepto en el contenido de glicerol, mayor en las fermentaciones con inoculación secuencial de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* (6,5 g/l con TD291 y 6,4 g/l con Zymaflore® Alpha frente a 6,0 g/l con *S. cerevisiae* 24).

Las diferencias químicas de los vinos del 2010 fueron apreciadas a nivel sensorial por los catadores (Figura. 2). Así, el vino procedente de la inoculación secuencial destacó sobre los demás por un intenso aroma a piña, y también a nivel global por su intensidad aromática y persistencia en boca. Por otra parte, cabe destacar la buena aceptación por los catadores del

vino resultante de la fermentación espontánea por su intensidad aromática y su complejidad, con mayores notas florales y a fruta fresca. Estos resultados permiten confirmar el papel de las levaduras non-*Saccharomyces* para la obtención de vinos complejos y diferenciados.

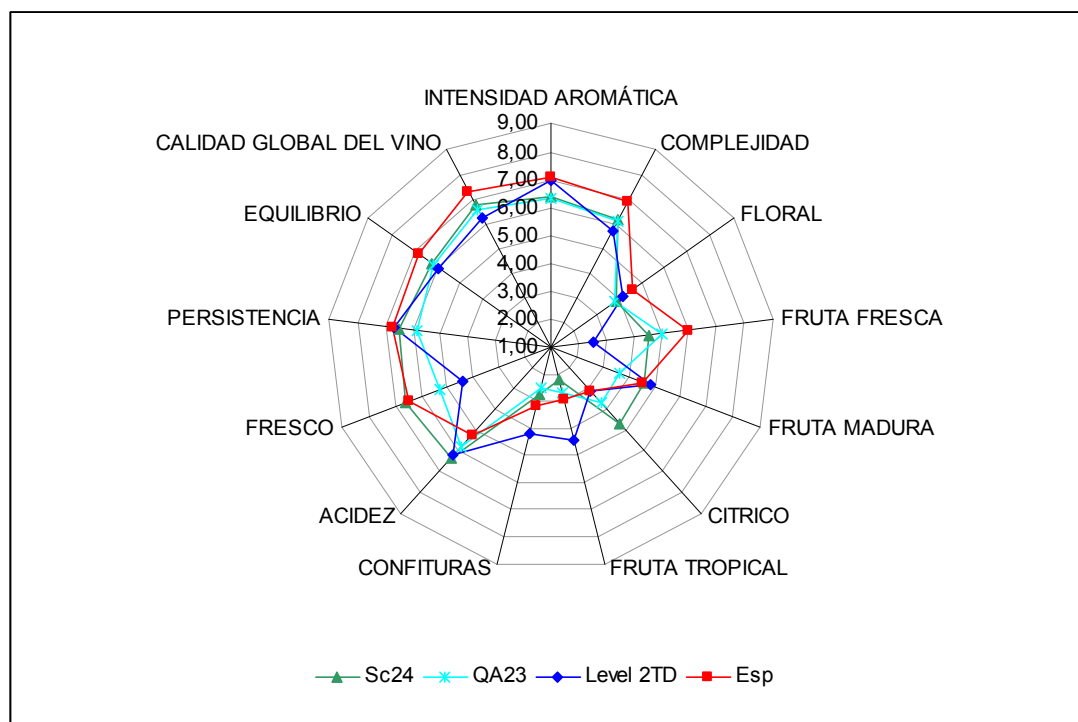


Figura 2. Valoración sensorial de los vinos elaborados en 2010.

Publicaciones más destacadas:

Blanco P., Pereira E., Losada A., Heras JM., Orriols I. 2011. Aplicación secuencial de levaduras non-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* en la elaboración de vinos con variedades de uva blanca de Galicia. XXXIV World Congress of Vine and Wine. Porto-Portugal, 20-27 June.

Blanco P., Losada A., Heras JM., Orriols I. 2012. Influencia de la inoculación secuencial de *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* en mosto de variedades de uva blanca de Galicia: cinética de fermentación y características del vino. 27ª Reunión Anual del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura e Enología. Sergude-Boqueixón-A CORUÑA. 8-10 Mayo 2012

8. MADRID

TERESA ARROYO CASADO

Financiación y período de ensayo

- Fondos propios
- Período de ensayo: 2012

Participantes

García, M., Cabellos, J.M., Ramos, V., Arroyo, T.

Ensayo

Ensayos preliminares de utilización de un cultivo mixto con levaduras autóctonas en la D.O. “Vinos de Madrid”

Objetivos

La tendencia actual de búsqueda de la exaltación de propiedades enológicas de interés en la elaboración de vinos en cada región productora, ha llevado a la realización de estudios de la microbiota en viñedos viejos y bodegas de elaboración ecológica y tradicional. En una primera fase se han realizado exhaustivos estudios de las levaduras propias de cada una de las tres subzonas de la DO “Vinos de Madrid”. Estos estudios han permitido un amplio conocimiento de ecología microbiana así como su distribución en el viñedo y en bodega. En una segunda etapa se seleccionaron las levaduras de mayor potencial enológico y se están ensayando para su aplicación en la elaboración comercial de vinos en la Denominación de Origen “Vinos de Madrid”.

En este ensayo a escala de laboratorio, se ha realizado un estudio de un cultivo mixto de dos levaduras aisladas en la región de Madrid, estudiadas y seleccionadas en base a sus buenas propiedades biotecnológicas, fermentativas y productoras de vinos de calidad.

Metodología

Se han utilizado dos cepas de levaduras de la colección de levaduras del IMIDRA (CLI): *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 y *Torulaspota delbrueckii* CLI 918.

Los ensayos, siempre por triplicado, se han realizado en fermentadores con 1L de mosto de la variedad Malvar y se distribuyeron de la siguiente forma:

- F1: Cultivo puro de *S. cerevisiae* 10^6 células/mL.
- F2: Cultivo mixto de *S. cerevisiae* 10^6 células/mL + *T.delbrueckii* 10^6 células/mL, ambas cepas inoculadas al mismo tiempo.

- F3: Cultivo secuencial de *T. delbrueckii* 10^6 células/mL al alcanzar 5° alcohol se inoculó la cepa de *S. cerevisiae* 10^6 células/mL.
- F4: Cultivo puro de *T. delbrueckii* 10^6 células/mL.

El mosto de la variedad Malvar utilizado tenía las siguientes características:

Grado Brix: 20,4

Grado alcohólico probable: 11,3°

pH: 3,03

Acidez total: 4,40 g/L.

Se ajustó el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) del mosto con sulfato de amonio hasta 250 mg/L. El pH a 3,2 y el contenido de azúcar fue de 200 g/L.

Los cultivos de levaduras se inocularon a una concentración de 10^6 células/mL y en los cultivos mixtos la mezcla fue del 50%. Las fermentaciones se realizaron a 18°C grados en una sala termostatazada, con agitación y control de temperatura en cada fermentador; se siguió la evolución de la cinética fermentativa por pesada de manera automática a intervalos de dos horas.

Se analizaron parámetros generales de los vinos elaborados siguiendo métodos oficiales de análisis.

Una vez obtenidos los vinos y tras decantación en frío a 4°C, se centrifugaron para eliminar las células de levaduras y se mantuvieron bajo atmósfera de N_2 hasta el momento de su análisis sensorial. En un primer paso se realizaron catas triangulares siguiendo la norma UNE-EN ISO 4120:2008, y se calcularon los niveles de significación de los resultados obtenidos para confirmar las diferencias encontradas por los evaluadores. Seguidamente se procedió al análisis sensorial de los vinos por un grupo de 7 catadores entrenados en el análisis sensorial de vinos blancos de la DO. "Vinos de Madrid".

Resultados

Evolución de la fermentación en condiciones controladas de temperatura, agitación y levaduras autóctonas.

Todas las fermentaciones se han realizado de manera satisfactoria en los cuatro tipos de ensayos realizados. Las fermentaciones tuvieron una duración aproximada de 13 días aunque no todas presentaron la misma evolución. Los procesos con una fase exponencial más rápida y mayor consumo de azúcares corresponden a las fermentaciones realizadas con cultivo puro de *Saccharomyces cerevisiae* y a la fermentación mixta de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii*, ambas han mostrado una evolución muy similar (Figura 1). La

dinámica del ensayo de *Torulaspora delbrueckii* en cultivo puro es la misma que la observada para la fermentación secuencial de *Torulaspora delbrueckii* en el inicio del proceso; cuando se adiciona el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* es cuando se produce un aumento importante de la actividad fermentativa, que coincide con el incremento en el número de células de la población de levaduras como se puede ver en la Figura 2; si bien los niveles de pérdida de CO₂ son inferiores a los que se producen en el transcurso de la fermentación alcohólica de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivo puro y en fermentación mixta.

Figura 1. Evolución de la cinética fermentativa de los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*

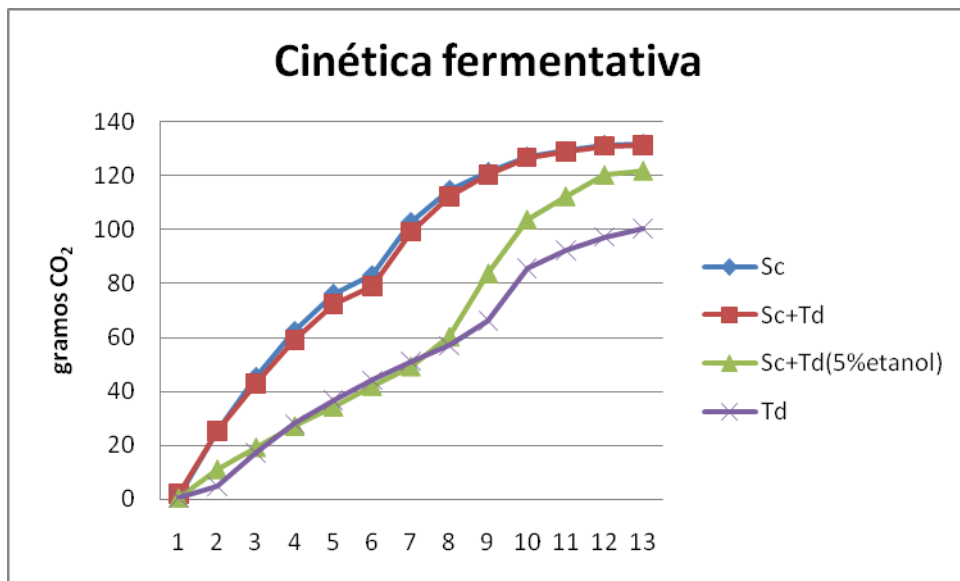
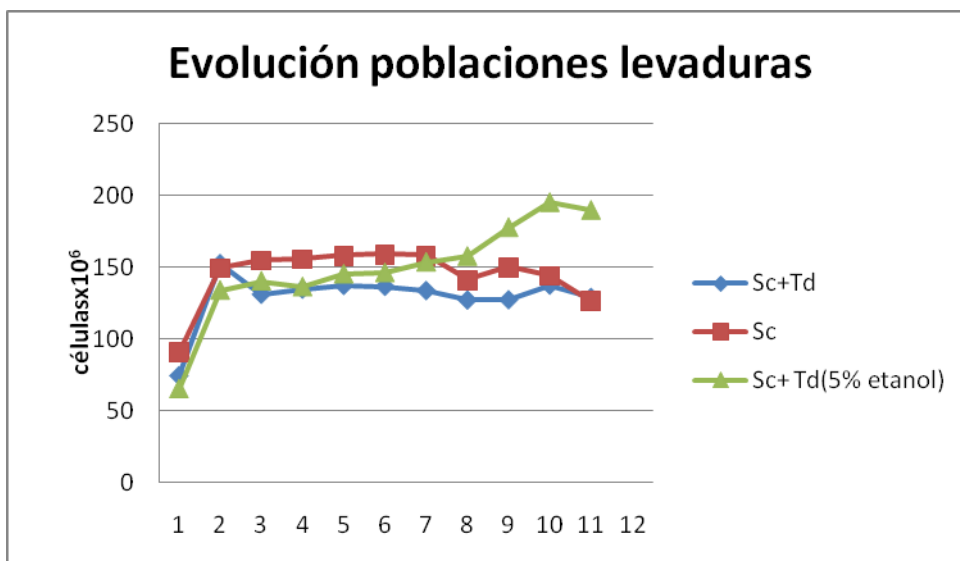


Figura 2. Evolución de las poblaciones de levaduras del cultivo puro de *Saccharomyces cerevisiae* y del cultivo mixto *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii* y secuencial (5% etanol).



Del estudio de los parámetros físico-químicos, Tabla1, se observa que todas los ensayos han completado la fermentación alcohólica a excepción del cultivo puro de *Torulaspóra delbrueckii* que muestra altos contenidos de azúcares residuales, tanto de fructosa como de glucosa. Los valores más elevados de acidez volátil han correspondido al ensayo secuencial que presenta una mayor producción de acidez volátil al comienzo de la fermentación, al igual que ocurre con el cultivo puro de *Torulaspóra*. Como resultados interesantes destacan un mayor contenido en glicerina y menor grado alcohólico en el vino producido en la fermentación secuencial de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspóra delbrueckii*, este ensayo también muestra el mayor contenido en ácido glucónico, incluso con valores superiores a los producidos por *Torulaspóra delbrueckii* en cultivo puro.

Tabla 1. Resultados analíticos de los vinos elaborados.

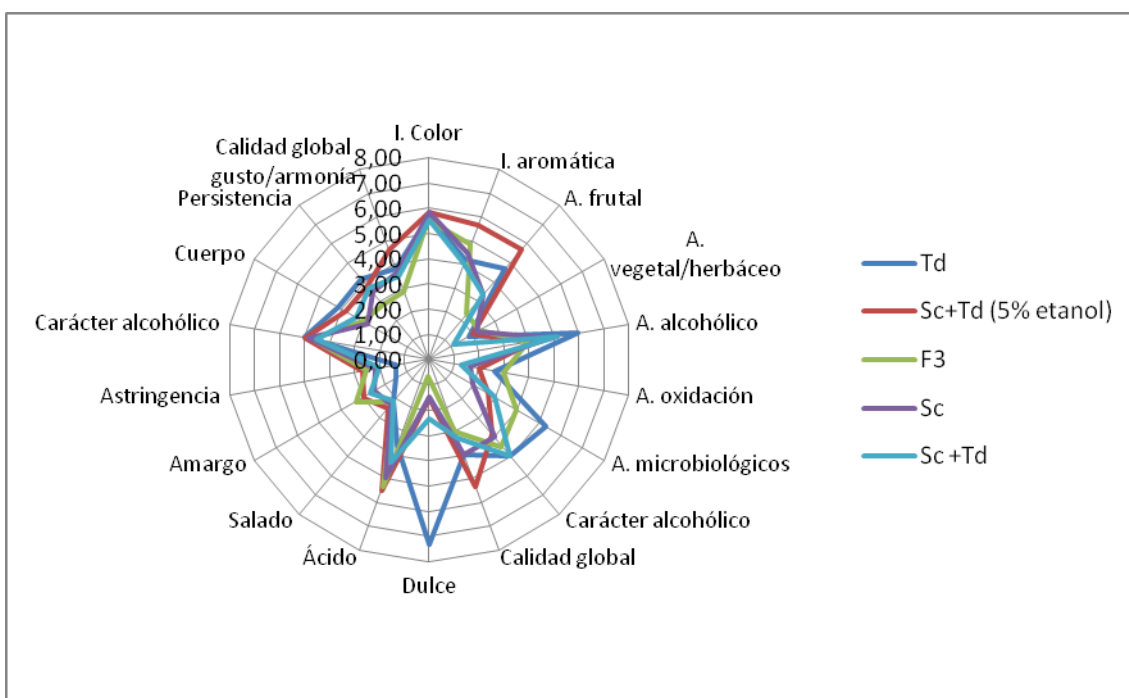
ENSAYO	Sc	Td	Sc+Td	Sc+Td(5% etanol)
Acidez total (g/l tartárico)	5,60±0,01	6,75±0,22	5,46±0,06	6,06±0,06
Acidez volátil(g/l acético)	0,50±0,01	0,60±0,01	0,46±0,06	0,61±0,2
Ácido acético(g/l)	0,49±0,02	0,52±0,03	0,42±0,02	0,45±0,05
Ácido D-glucónico(g/l)	<0,10	0,67±0,10	<0,10	0,80±0,07
Ácido D-tartárico(g/l)	3,69±0,02	3,45±0,08	3,74±0,02	3,58±0,05
Ácido L-láctico(g/l)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Ácido L-málico(g/l)	0,95±0,03	1,05±0,01	0,90±0,01	0,93±0,6
Azúcares reductores(g/l)	<1,5	33,7±4,2	<1,5	2,2±0,05
Dióxido de carbono(mg/l)	463±84	849,5±133,64	554,00±95	632,33±91,36
Fructosa(g/l)	<1,2	21,45±2,47	<1,2	1,9±0,05
Glicerina(g/l)	3,12±0,14	7,14±0,3	2,87±0,02	5,28±0,20
Glucosa(g/l)	1,63±0,06	14,75±1,91	1,67±0,5	1,7±0,2
Grado alcohólico adq(% vol.)	13,13±0,06	10,88±0,28	13,03±0,01	12,8±0,00
Masa volúmica 20°C(mg/l)	<0,9890	1,00±0,01	<0,9890	0,98±0,00
pH	3,30±0,0	3,34±0,04	3,3±0,01	3,3±0,0
Sulfuroso libre(mg/l)	<12	<12	<12	<12
Sulfuroso total(mg/l)	<30	<30	<30	<30

Análisis sensorial

En un primer momento se llevaron a cabo pruebas triangulares para ver el nivel de diferenciación de los vinos según el tipo de elaboración realizada. Cuando se hace el estudio comparativo del ensayo de cultivo mixto con el vino elaborado con *Torulaspóra delbrueckii* el nivel de significación de la prueba triangular es del 1%. Todos los catadores, fueron capaces de diferenciar entre los dos tipos de muestras. El resto de los ensayos obtuvieron un nivel de significación del 5%, lo que indica que los catadores han discriminado de manera acertada los diferentes sistemas de elaboración cuando se comparaban entre sí.

Los vinos elaborados por triplicado fueron sometidos a análisis sensorial y de los resultados obtenidos, Figura 3, se observa que los catadores han mostrado preferencia por el vino elaborado de manera secuencial. Este vino ha destacado tanto por una mayor intensidad aromática y mayor aroma frutal, lo que le ha hecho puntuar mejor en cuanto a calidad global. El vino elaborado con *Torulasporea delbrueckii* en cultivo puro, aunque ha mostrado buena aceptación, destaca por su carácter dulce como consecuencia de un menor poder fermentativo de esta levadura.

Figura 3. Valoración organoléptica de los vinos elaborados



Conclusiones

La utilización de cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulasporea delbrueckii* dan como resultado un vino de características mejoradas con respecto al vino elaborado con un cultivo puro, tanto de *Torulasporea delbrueckii* como *Saccharomyces cerevisiae*, si bien hay que destacar que cuando se realiza de manera secuencial, adicionando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al mosto-vino con un 5% de etanol, el vino resultante muestra mayor intensidad aromática, más glicerol y resulta ligeramente menos alcohólico, por lo que también fue el mejor valorado en el análisis sensorial.

9. NAVARRA

JULIÁN SUBERVIOLA

Financiación y período de ensayo

- Fondos propios
- Colaboración con la empresa Enolviz (Productos enológicos y equipamiento de bodega)

- Período de ensayo: 2010, 2011 y 2012

Participantes

Mari Carmen Jimeno Mendoza, Natalia Jaúregui Martínez, Carlos Izuriaga Echeverría, y Laura Aguirre Lopez

Ensayo: Estudio comparativo de la utilización de distintas levaduras *No-Saccharomyces*

COSECHA 2010

Objetivos:

Elaboración de *vinos blancos*, *vinos rosados* y *vinos blancos dulces* con levaduras *No Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii*) y *Saccharomyces*.

Siembra:

Las *Saccharomyces* se siembran directamente a 30 gr/hl de mosto desfangado.

Las *Torulasporas*, individualmente, se siembran directamente a 30 gr/hl de mosto desfangado.

En los ensayos de inoculación secuencial las *Torulasporas* se siembran directamente a 30 gr/hl mosto desfangado. Una vez que ha comenzado la fermentación (tras 2 días aprox.), se siembran las *Saccharomyces* a 30 gr/hl.

Vinificaciones: 100l/variante en la bodega experimental de EVENA.

a) **Vino blanco Chardonnay**

Variantes:

- Testigo: Inoculación tradicional con la levadura *Na33/EC31118*.
- Kit casa comercial 1 (Level 2TD): inoculación secuencial de la levadura *Torulaspora delbrueckii*, seguida de inoculación de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Kit casa comercial 2 (Crh. Hansen): inoculación secuencial de la levadura *Torulaspora delbrueckii*, seguida de inoculación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Resultados:

Los resultados analíticos y de cata se recogen a continuación.

Parámetros de la uva:

DATOS DE LA MUESTRA	Chardonnay
GAP	13,70
pH	3,5
ATT	8,7

Parámetros básicos del vino:

	Testigo	Inoculación secuencial Casa comercial 1	Inoculación secuencial Casa comercial 2
Grado alcoh. Adquirido 20/20	14,74	14,83	14,85
Acidez total tartárica (g/l)	6,2	5,9	6
Anhídrido sulfuroso libre (mg/l)	16	20	17
Anhídrido sulfuroso total (mg/l)	69	75	70
Calcio (mg/l)	60	64	70
Hierro (mg/l)	1,9	1,4	1,3
Potasio (mg/l)	550	575	525
Magnesio (mg/l)	108	104	106
Acidez volátil acética (g/l)	0,29	0,15	0,2
Azúcares reductores	1,7	2,1	1,7

Parámetros de color del vino:

	Testigo	Inoculación secuencial Casa comercial 1	Inoculación secuencial Casa comercial 2
Densidad óptica 420 nm	0,129	0,133	0,139
Densidad óptica 520 nm	0,038	0,037	0,049
Densidad óptica 620 nm	0,011	0,009	0,013
Intensidad colorante	0,178	0,179	0,201
Densidad óptica 280 nm	8	7	7
Tonalidad	3,39	3,59	2,84

Análisis organoléptico (Ficha de cata UIE, s/100):

	1	2	3
Puntuación total	77	76	80
Orden de preferencia	2°	3°	1°

Análisis perfil aromático:

PARAMETROS ($\mu\text{g/L}$)	TESTIGO	IS Casa comercial 1	IS Casa comercial 2
Butirato de Etilo	352	264	398
Isobutanol	5379	4960	2576
Acetato de Isoamilo	4705	4513	6867
3 Hexanol	90	109	111
Alcohol Isoamilico	142856	144442	150446
Hexanoato de Etilo	502	353	508
1 Pentanol	7	6	4
Lactato de etilo	1452	100	1791
1 Hexanol	1852	2063	1437
Octanoato de etilo	671	352	664
Butirolactona	1098	1732	1784
Fenilacetaldehido	17	15	13
Ac. Butírico	24	203	211
Acido Isovalérico	2665	2645	2764
Acetato de 2 Feniletilo	115	194	238
Acido Hexanoico	48812	28828	52833
2 Feniletanol	7310	7960	7951
Ac. Octanoico	6648	4078	6762

Cata de aromas:

	1	2	3
Puntuación total	25	22	25
Orden de preferencia	1°	3°	1°

- Los vinos elaborados con inoculación secuencial de no *Saccharomyces* y *Saccharomyces*, generan menor acidez volátil que el testigo.
- Tanto en aromas como en el conjunto de la cata, el vino elaborado con el kit 2, que presenta mayores valores de aromas afrutados, es mejor valorado que el resto, pero no hay grandes diferencias.
- Los vinos elaborados con los dos kits comerciales presentan mayores concentraciones de aromas florales.

b) Vino rosado Garnacha

Variantes:

- Testigo: Inoculación tradicional con la levadura Na33/EC31118.
- Kit casa comercial 1 (Level 2TD): inoculación secuencial de la levadura *Torulaspora delbrueckii*, seguida de inoculación de *Saccharomyces cerevisiae*.(IS Kit 1)
- Kit casa comercial 2 (Crh. Hansen): inoculación secuencial de Levadura *Torulaspora delbrueckii*, seguida de inoculación de *Saccharomyces cerevisiae*.(IS Kit 2)
- Kit casa comercial 1: inoculación solo con Levadura *Torulaspora delbrueckii*. (TD1)
- Kit casa comercial 2: inoculación solo con Levadura *Torulaspora delbrueckii*. (TD2)

Resultados:

Los resultados analíticos y de cata se recogen a continuación.

Parámetros de la uva:

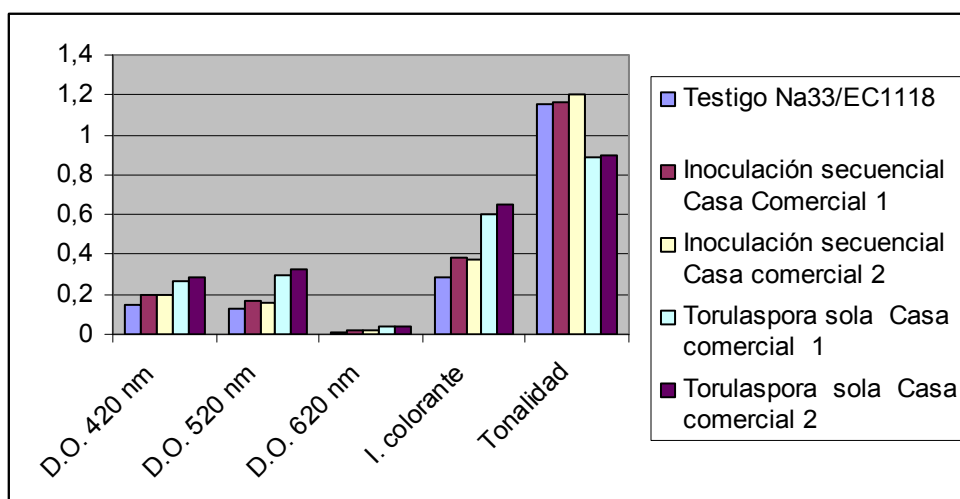
DATOS DE LA MUESTRA	Rosado
GAP	13,87
pH	3,54
ATT	6.4
NFA (g/l)	306.8

Parámetros básicos del vino:

	Testigo Na33/EC1118	IS Kit 1	IS Kit 2	TD1	TD2
Grado alcoh. Adquirido 20/20	14,82	14,84	14,76	14,83	14,48
pH	3,3	3,32	3,26	3,37	3,33
Acidez total tartárica (g/l)	5,2	5,1	5,3	5,1	5,1
Ácido málico (g/l)	1,3	1,1	1,2	1	1,2
Anhídrido sulfuroso libre (mg/l)	16	16	16	10	10
Anhídrido sulfuroso total (mg/l)	63	66	60	62	50
Calcio (mg/l)	44	46	46	58	44
Hierro (mg/l)	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2
Potasio (mg/l)	450	450	450	450	500
Magnesio (mg/l)	54	66	54	62	60
Acidez volátil acética (g/l)	0,47	0,29	0,32	0,4	0,28
Azúcares reductores	1,7	1	3,9	9,9	12,8

Parámetros de color del vino:

	Testigo Na33/EC1118	IS Kit 1	IS Kit 2	TD1	TD2
Densidad óptica 420 nm	0,145	0,197	0,194	0,268	0,289
Densidad óptica 520 nm	0,126	0,17	0,161	0,3	0,322
Densidad óptica 620 nm	0,01	0,016	0,015	0,037	0,039
Intensidad colorante	0,281	0,383	0,37	0,605	0,65
Densidad óptica 280 nm	10	11	10	11	10
Tonalidad	1,15	1,16	1,20	0,89	0,90



Análisis organoléptico (Ficha de cata UIE, s/100):

	1	2	3	4	5
Puntuación total	66	70.5	73.5	76.5	74.5
Orden de preferencia	5°	4°	3°	1°	2°

- La *Torulaspora* en solitario puede aportar personalidad diferenciada, sin menoscabo de la calidad organoléptica en la elaboración de vinos con azúcares residuales.
- Los vinos elaborados con inoculación secuencial de levaduras no *Saccharomyces* y *Saccharomyces*, y con *Torulaspora* (no *Saccharomyces*) en solitario, generan menor acidez volátil.

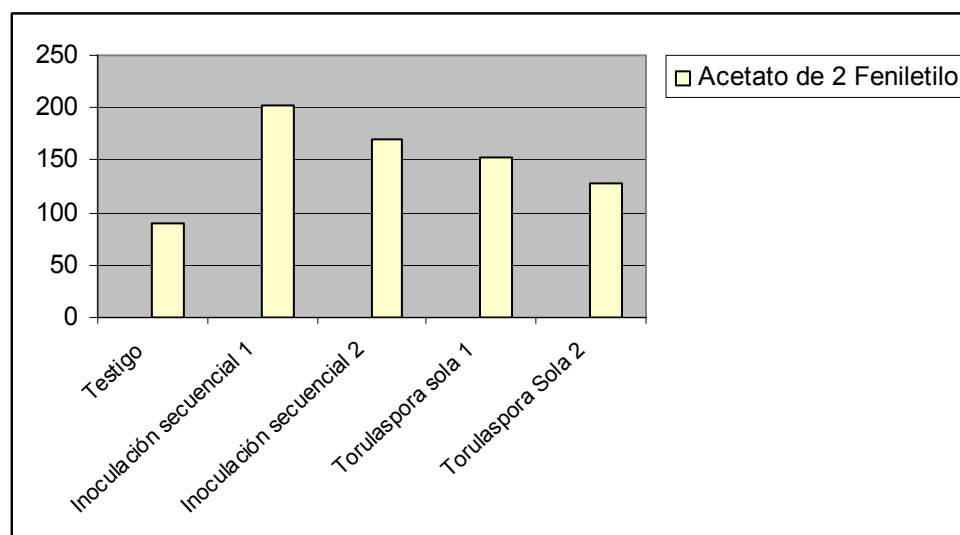
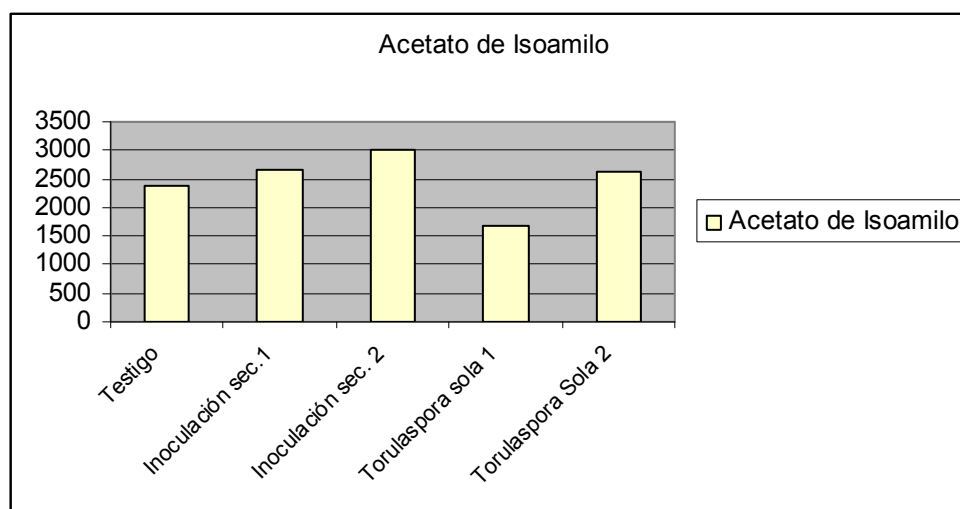
- Los vinos elaborados con *Torulaspota* en solitario tienen más y mejor color.

Análisis perfil aromático:

PARAMETROS ($\mu\text{g/L}$)	Testigo Na33/EC1118	IS Kit 1	IS Kit 2	TD1	TD2
Butirato de Etilo	300	201	698	190	299
Isobutanol	9786	11725	13554	11433	15311
Acetato de Isoamilo	2388	2660	3014	1672	2610
3 Hexanol	79	78	78	79	77
Alcohol Isoamilico	330848	387275	326367	459509	128584
Hexanoato de Etilo	396	223	440	174	341
1 Pentanol	14	12	10	13	27
Lactato de etilo	4176	2099	3702	217	3231
1 Hexanol	1949	1836	1549	1911	1583
Octanoato de etilo	506	218	461	139	301
Butirolactona	2276	1493	2791	2011	2023
Fenilacetaldehido	17	12	58	13	24
Ac. Butírico	89	53	95	32	23
Acido Isovalérico	2789	2815	3037	2719	3004
Acetato de 2 Feniletilo	90	203	169	152	127
Acido Hexanoico	66645	39100	81292	41908	79154
2 Feniletanol	8333	11526	9006	11532	7621
Ac. Octanoico	8156	4640	7930	4480	7989

Cata de aromas:

	1	2	3	4	5
Puntuación total	22	22	22.5	23	24.5
Orden de preferencia	4°	4°	3°	2°	1°



c) Moscatel de grano menudo

Variantes:

- Testigo: elaboración de una mistela, mezcla de mosto desfogado y alcohol vínico, encabezando hasta 10 % vol.
- Kit casa comercial 1: inoculación de Levadura *Torulaspora delbrueckii*.
- Kit casa comercial 2: inoculación de Levadura *Torulaspora delbrueckii*.

Resultados:

Los resultados analíticos y de cata se recogen a continuación.

Parámetros de la uva:

DATOS DE LA MUESTRA	Moscatel
GAP	15.45
pH	3,52
ATT	5,8
Ácido málico (g/l)	2,9

Comparando las variantes de casas comerciales entre sí, no se observan grandes diferencias en parámetros básicos.

Parámetros básicos del vino:

	Testigo	Torulaspora sola Casa comercial 1	Torulaspora Sola Casa comercial 2
Grado alcoh. Adquirido 20/20	10,11	15,7	15,35
Acidez total tartárica (g/l)	3,8	4,9	4,8
Anhídrido sulfuroso libre (mg/l)	18	18	23
Anhídrido sulfuroso total (mg/l)	55	110	96
Calcio (mg/l)	50	40	48
Hierro (mg/l)	0,3	0,6	0,5
Potasio (mg/l)	700	625	600
Magnesio (mg/l)	106	108	116
Acidez volátil acética (g/l)	0,15	0,5	0,27
Azúcares reductores	248	12,4	27,3

Parámetros de color del vino:

	Testigo	Torulaspora sola Casa comercial 1	Torulaspora Sola Casa comercial 22
Densidad óptica 420 nm	0,121	0,218	0,111
Densidad óptica 520 nm	0,03	0,156	0,038
Densidad óptica 620 nm	0,012	0,15	0,02
Intensidad colorante	0,163	0,524	0,169
Densidad óptica 280 nm	8	7	7
Tonalidad	4,03	1,40	2,92

Análisis organoléptico (Ficha de cata UIE, s/100):

	1	2	3
Puntuación total	82	76.5	77.5
Orden de preferencia	1°	3°	2°

En cata, se prefiere el vino testigo, que es un mosto apagado con alcohol, que mantiene casi intactos los aromas terpénicos del moscatel, y no hay diferencias significativas entre variantes.

En cuanto al análisis del perfil aromático el vino elaborado con la *Torulaspora de casa comercial 2*, presenta más cantidad de aromas florales.

Análisis perfil aromático:

PARAMETROS (µg/L)	TESTIGO Encabezado	Torulaspora sola Casa comercial 1	Torulaspora sola Casa comercial 2
Butirato de Etilo	245	330	255
Isobutanol	327	487	2156
Acetato de Isoamilo	238	4634	4663
3 Hexanol	113	109	108
Alcohol Isoamilico	21589	185873	278058
Hexanoato de Etilo	93	466	250
1 Pentanol		13	10
Lactato de etilo	37	160	88
1 Hexanol	490	624	577
Octanoato de etilo	132	651	274
Butirolactona	483	2724	3094
Fenilacetaldehido	13	12	19
Ac. Butírico	25	115	48
Acido Isovalérico	2135	2522	2402
Acetato de 2 Feniletilo	16	239	376
Acido Hexanoico	3396	49074	29182
2 Feniletanol	2305	7219	9472
Ac. Octanoico	2189	7247	4309

Cata de aromas:

	1	2	3
Puntuación total	25	23	23.5
Orden de preferencia	1°	3°	2°

Conclusiones generales:

- ❖ Los vinos con inoculación secuencial generan valores inferiores de Acidez Volátil.
- ❖ Para la elaboración de vinos rosados semi-dulces, es aconsejable el uso de *Torulaspota* en solitario.
- ❖ El uso de *No Saccharomyces* + levadura *Saccharomyces cerevisiae* asociada, da vinos con mayores concentraciones de aromas florales que el uso *Saccharomyces cerevisiae* en solitario.

Cosecha 2011

Ensayo: Fermentación de mostos rosado con inoculación de levaduras *Saccharomyces* y *No Saccharomyces (Pichia)*.

Objetivos:

En este ensayo se pretende potenciar el perfil aromático, aumentando tanto la producción de ésteres de cadena larga como la producción de tioles, utilizando la “teórica” capacidad de una levadura *No Saccharomyces (Pichia)* de aumentar estos perfiles aromáticos.

Metodología:

Se procede a inocular con frootZen el mosto desfangado y listo. Cuando la densidad baja 20 puntos se introduce la *Saccharomyces cerevisiae* correspondiente según protocolo de hidratación e inoculación.

Diariamente se realiza un seguimiento de la densidad y la temperatura (en cámara controlada a 16°C), hasta que finaliza la fermentación alcohólica, procediendo a valorar las materias reductoras o glucosa y fructosa.

Variiedad: Garnacha. Vinos rosados.

Variantes:

1. Testigo: inoculación con solo levadura mix Na33/EC1118

2. *Pichia* + Na33: coinoculación de dos levaduras, primero de frootZen (*Pichia*) y cuando la densidad baja 20 puntos desde la primera inoculación, se añade *Saccharomyces cerevisiae* Na33/EC31118.
3. *Pichia* + Saint George S101: coinoculación de dos levaduras, primero de frootZen (*Pichia*) y cuando la densidad baja 20 puntos desde la primera inoculación, se añade levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Saint Georges S101.

Siembra:

Las *Saccharomyces* se siembran directamente a 25 gr/hl de mosto desfogado.

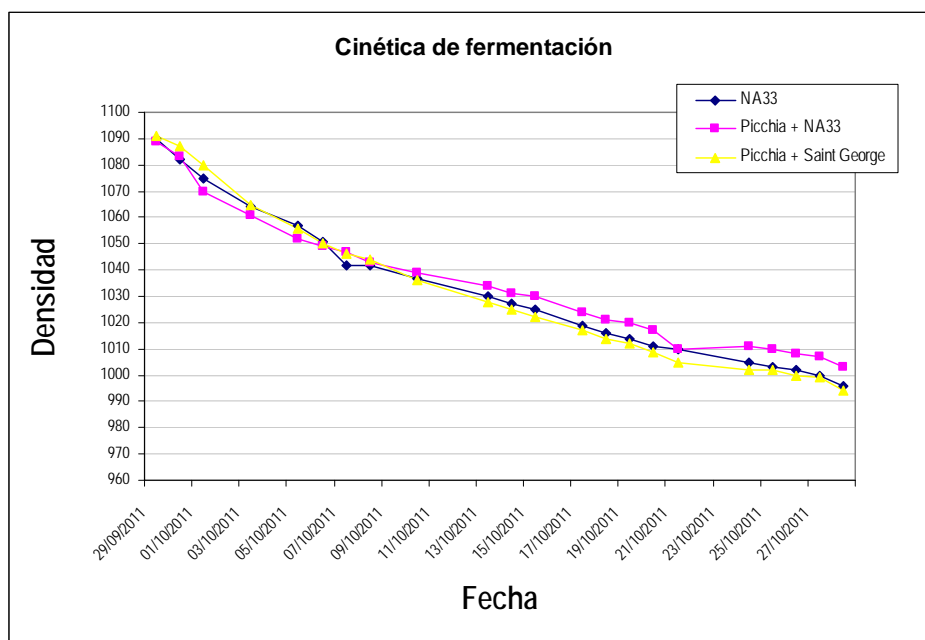
Las *Pichias* se siembran directamente a 60 gr/hl de mosto desfogado. Una vez que ha comenzado la fermentación (tras 2 días), se siembran las *Saccharomyces* a 25 gr/hl.

Vinificaciones: de 100 l. por variante en la bodega experimental de EVENA

Resultados:

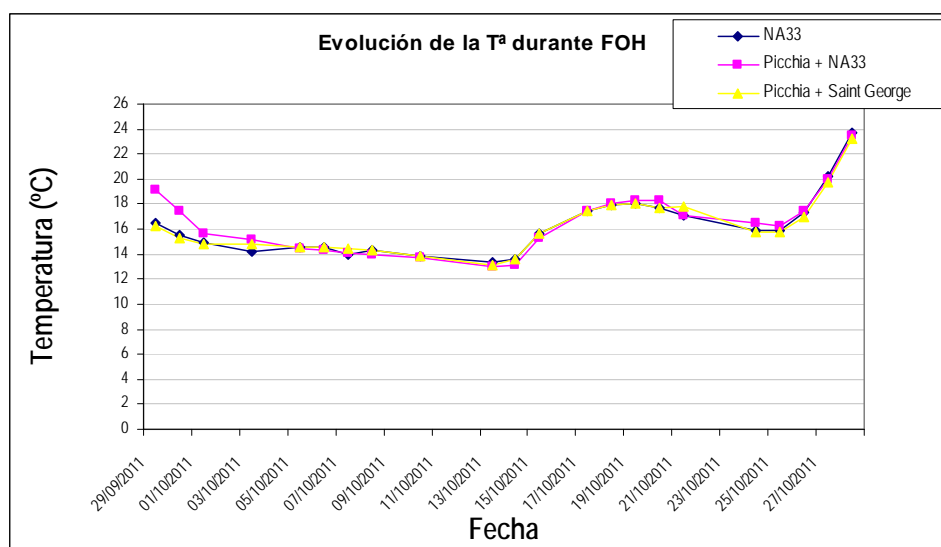
Los resultados se muestran a continuación,

Cinética fermentativa: Densidad inicial: 1095 gr/l



La fermentación alcohólica se alargó pasados los 50 días, hasta el punto de no acabar (niveles de azúcares reductores mayores a 6g/l glucosa, ver siguiente tabla).

Evolución temperatura durante FOH



Podemos observar una estabilización de la temperatura hasta los 16°C durante los 15 primeros días del arranque de la fermentación para las tres variantes. A partir de ahí, la temperatura para las tres variantes aumenta progresivamente hasta alcanzar niveles de 24°C.

Parámetros básicos del vino

PARAMETROS BASICOS VINO	TESTIGO	PICCHIA + NA33	PICCHIA + SAINT GEORGE
GRADO ALC VOL ADQUIRIDO 20/20 %Vol	14,09	14,65	14,91
ACIDEZ TOTAL g/l ac. Tartárico	4,1	4,9	4,6
ACIDEZ VOLATIL g/l ac. acético	0,65	0,65	0,67
ANH SULF LIBRE mg/l	< LC 10	< LC 10	< LC 10
ANH SULF TOTAL mg/l	17	16	19
AZUCARES REDUCTORES g/l glucosa	6,8	11,2	6,6
ACIDO L-MALICO g/L	< LC 0,2	< LC 0,2	< LC 0,2
CALCIO mg/l	44	54	58
HIERRO mg/l	1,2	0,8	1,3
POTASIO mg/l	520	540	540
MAGNESIO mg/l	122	128	130
pH	3,54	3,43	3,49

Parámetros de color del vino:

PARAMETROS DE COLOR DEL VINO	TESTIGO	PICCHIA + NA33	PICCHIA + SAINT GEORGE
DENSIDAD OPTICA 420 nm Un Abs/cm	0,532	0,789	0,557
DENSIDAD OPTICA 520 nm Un Abs/cm	0,467	0,705	0,416
DENSIDAD OPTICA 620 nm Un Abs/cm	0,096	0,121	0,079
INTENSIDAD COLORANTE Un Abs/cm	1,1	1,6	1,1

Análisis organoléptico (Ficha de cata UIE, s/100):

	TESTIGO	PICCHIA+NA33	PICCHIA+S.GEORGE
Puntuación	58,8	64,8	60,8
Orden de preferencia	3°	1°	2°

Comentario de los resultados:

No se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros básicos y de color del vino. En cata, el vino preferido fue el resultante de la coinoculación de *Pichia* más la levadura Na33/EC1118.

No se pueden extraer conclusiones concluyentes de este trabajo ya que el vino resultante en las tres variantes no acabó la fermentación alcohólica, con niveles de azúcares reductores de más de 6g/l glucosa.

Cosecha 2012

Objetivos:

Elaboración de *vinos blancos*, *vinos rosados*, *vinos blancos dulces* y *vinos tintos* que permitan comparar distintos cultivos de *No Saccharomyces* y *Saccharomyces*.

a) Variedad: Chardonnay

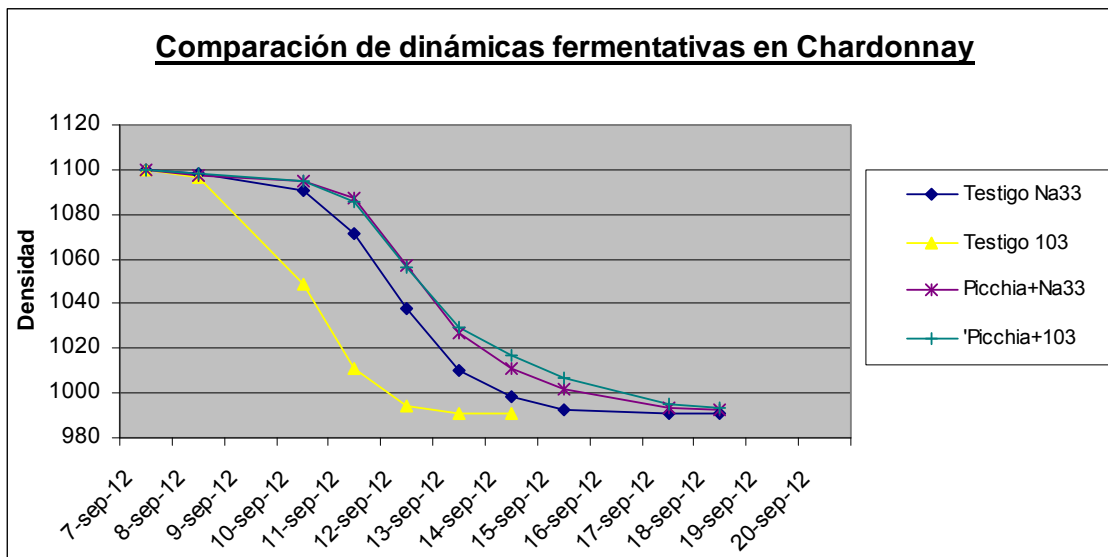
Variantes:

1. Testigo Na33: inoculación con solo levadura mix Na33/EC1118.
2. Testigo 103: inoculación con solo levadura *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* BC S103.
3. *Pichia* + Na33: coinoculación de dos levaduras, primero de frootZen (*Pichia*) y cuando la densidad baja 20 puntos desde la primera inoculación, se añade *Saccharomyces cerevisiae* Na33.
4. *Pichia* + 103: coinoculación de dos levaduras, primero de frootZen (*Pichia*) y cuando la densidad baja 20 puntos desde la primera inoculación, se añade levadura *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* BC S103.

Resultados:

Los resultados se muestran a continuación.

Cinética fermentativa



El vino elaborado con solo BC S103 fermentó más rápidamente que las otras tres variantes (una diferencia de una semana).

Respecto a los parámetros básicos y de color, no se observan diferencias significativas entre variantes (datos no mostrados).

Se observa una reducción de ésteres totales significativa de la variante resultante de la coinoculación de *Pichia* y *Na33*.

ESTERES Y ALCOHOLES SUPERIORES	Testigo Na33	Testigo 103	Pichia + Na33	Pichia + 103
Acetato de Etilo mg/l	102	115,5	89,5	102
Acetato de Metilo mg/l	<LD 5	<LD 5	<LD 5	<LD 5
Acetaldehido mg/l	79	74,5	68,5	70,5
Esteres Totales mg/l de acetato de etilo	102	115,5	89,5	102
2-Butanol mg/l	<LD 5	<LD 5	<LD 5	<LD 5
1-Propanol mg/l	107,5	49,5	41	39
1-Butanol mg/l	<LD 5	<LD 5	<LD 5	<LD 5
Isoamilicos mg/l	208,5	175,5	204	193
Isobutanol mg/l	38,5	28,5	50,5	41

Análisis organoléptico (Ficha de cata UIE, s/100):

	Testigo Na33	Testigo 103	Pichia + Na33	Pichia + 103
Puntuación total	71.00a	71.43a	70.43a	68.85a
Orden de preferencia	2°	1°	3°	4°

Respecto a la cata, no hay diferencias significativas entre variantes.

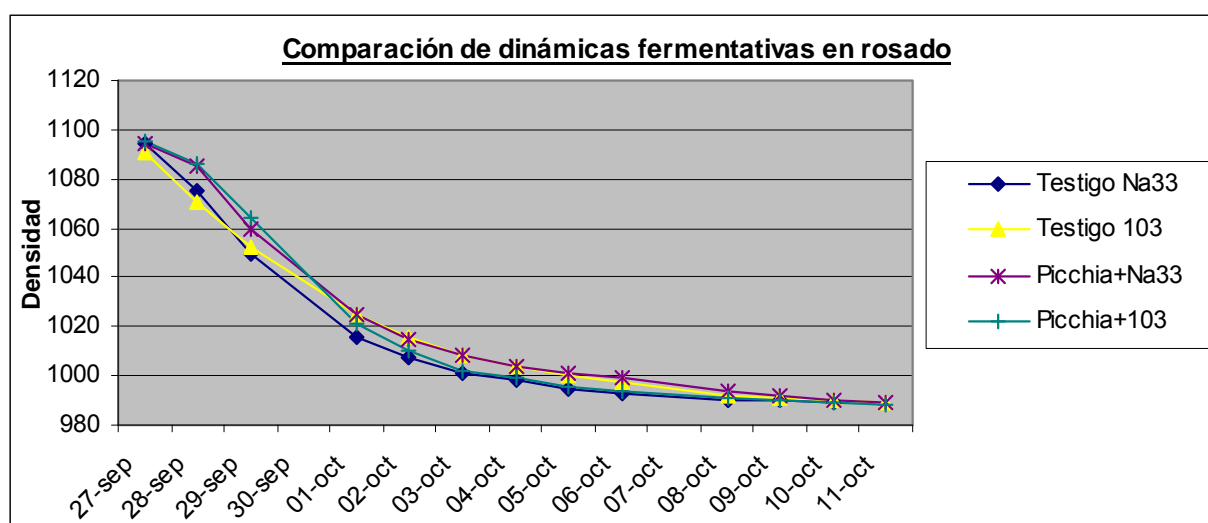
b) Variedad: Rosado Garnacha

Variantes:

1. Testigo Na33: inoculación con solo levadura mix Na33/EC1118.
2. Testigo 103: inoculación con solo levadura 103.
3. *Pichia* + Na33: coinoculación de dos levaduras, primero de frootZen (*Pichia*) y cuando la densidad baja 20 puntos desde la primera inoculación, se añade Na33.
4. *Pichia* + 103: coinoculación de dos levaduras, primero de frootZen (*Pichia*) y cuando la densidad baja 20 puntos desde la primera inoculación, se añade levadura 103.

Resultados:

Cinética fermentativa



Parámetros básicos del vino

PARAMETROS BASICOS VINO	Testigo Na33	Testigo 103	Pichia + Na33	Pichia + 103
GRADO ALC VOL ADQUIRIDO 20/20	14,395	14,365	14,485	14,43
ACIDEZ TOTAL g/l ac. Tartárico	4,5	4,4	4,2	4,05
ACIDEZ VOLATIL g/l ac. acético	0,315	0,38	0,325	0,36
ANH SULF LIBRE mg/l	12,5	15	13,5	13,5
ANH SULF TOTAL mg/l	64	75	51	54,5
AZUCARES REDUCTORES g/l	1,6	< LC 1	< LC 1	< LC 1
ACIDO L-MALICO	1,05	0,7	1	1
CALCIO mg/l	33	35	40	36
HIERRO mg/l	0,5	0,65	0,55	0,6
POTASIO mg/l	720	790	670	640
MAGNESIO mg/l	121	121	125	120
pH	3,435	3,49	3,445	3,465

Los vinos resultantes de la coinoculación de *Pichia* con ambas cepas de *S. cerevisiae* son menos potasófilos que los testigos. Respecto a los demás parámetros básicos y de color, no se observan diferencias significativas entre variantes.

Análisis perfil aromático:

ESTERES Y ALCOHOLES SUPERIORES	Testigo Na33	Testigo 103	Pichia + Na33	Pichia + 103
Acetato de Etilo mg/l	77,5	88,5	75,5	79
Acetato de Metilo mg/l	< LD (5)	< LD (5)	<LD 5	<LD 5
Acetaldehido mg/l	44	53	36,5	39
Esteres Totales mg/l de acetato de etilo	77,5	88,5	75,5	79
2-Butanol mg/l	< LD (5)	< LD (5)	<LD 5	<LD 5
1-Propanol mg/l	35,5	41,5	31	31
1-Butanol mg/l	< LD (5)	< LD (5)	<LD 5	<LD 5
Isoamilicos mg/l	191,5	209,5	183,5	185,5
Isobutanol mg/l	39	36,5	39,5	38,5

Análisis organoléptico (Ficha de cata UIE, s/100):

	Testigo Na33	Testigo 103	Pichia + Na33	Pichia + 103
Puntuación total	69.00a	62.86a	69.00a	64.43a
Orden de preferencia	1°	3°	1°	2°

Se observó un aumento ligero de la concentración de ésteres totales y alcoholes superiores de la variante resultante de la inoculación solitaria con BC S103.

Respecto a la cata, no hay diferencias significativas entre variantes, aunque se prefieren los vinos elaborados con Na33, tanto en solitario como en coinoculación con *Pichia*.

c) Variedad: Moscatel de Grano Menudo

Variantes:

1. Testigo Na33: inoculación con solo levadura mix Na33/EC1118.
2. *Pichia*: inoculación con solo levadura frootZen (*Pichia*)

Resultados:

El moscatel elaborado con *Pichia* fermenta más rápido que el testigo.

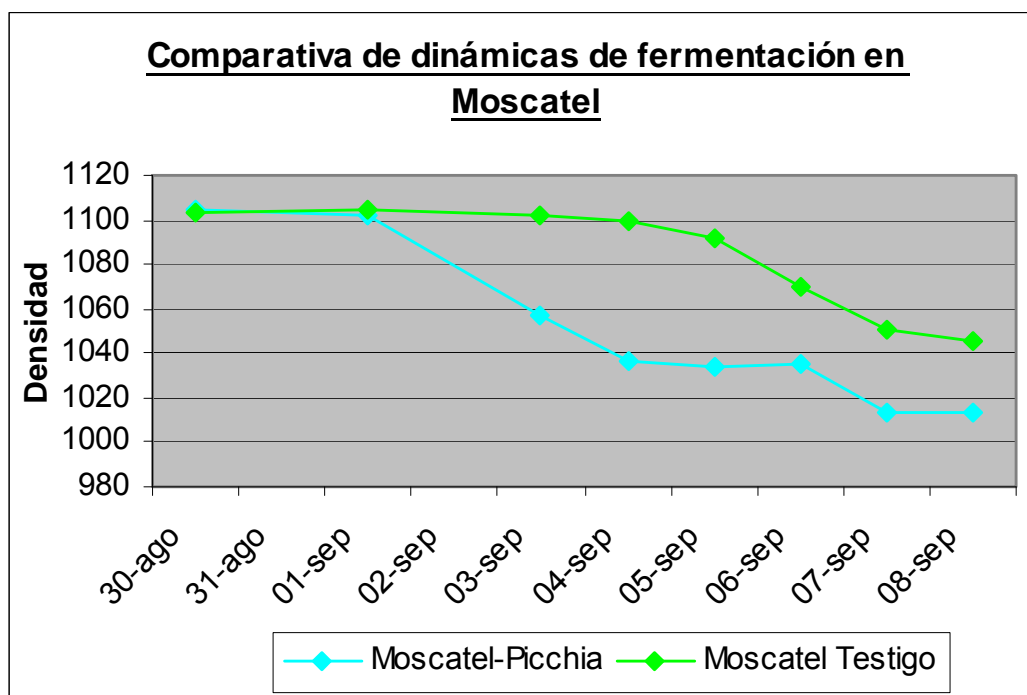
Respecto a los parámetros básicos y de color, no se observan diferencias significativas entre variantes (datos no mostrados).

Se observó un aumento ligero en la concentración de ésteres totales del moscatel testigo.

El moscatel testigo presenta mayor contenido en 1-propanol, en contra presenta menor contenido en isoamílicos que el moscatel elaborado con *Pichia*.

Respecto a la cata, no hay diferencias significativas entre variantes, aunque se prefiera el moscatel elaborado con *Pichia*.

Cinética fermentativa



Análisis perfil aromático:

ESTERES Y ALCOHOLES SUPERIORES	Testigo Na33	Pichia
Acetato de Etilo mg/l	88	72
Acetato de Metilo mg/l	< LD 5	< LD 5
Acetaldehido mg/l	102	119
Esteres Totales mg/l de acetato de etilo	88	72
2-Butanol mg/l	<LD 5	<LD 5
1-Propanol mg/l	66	38
1-Butanol mg/l	<LD 5	<LD 5
Isoamilicos mg/l	116	158
Isobutanol mg/l	25	26

Análisis organoléptico (Ficha de cata UIE, s/100):

	Testigo Na33	Pichia
Puntuación total	73.42a	75.00a
Orden de preferencia	2°	1°

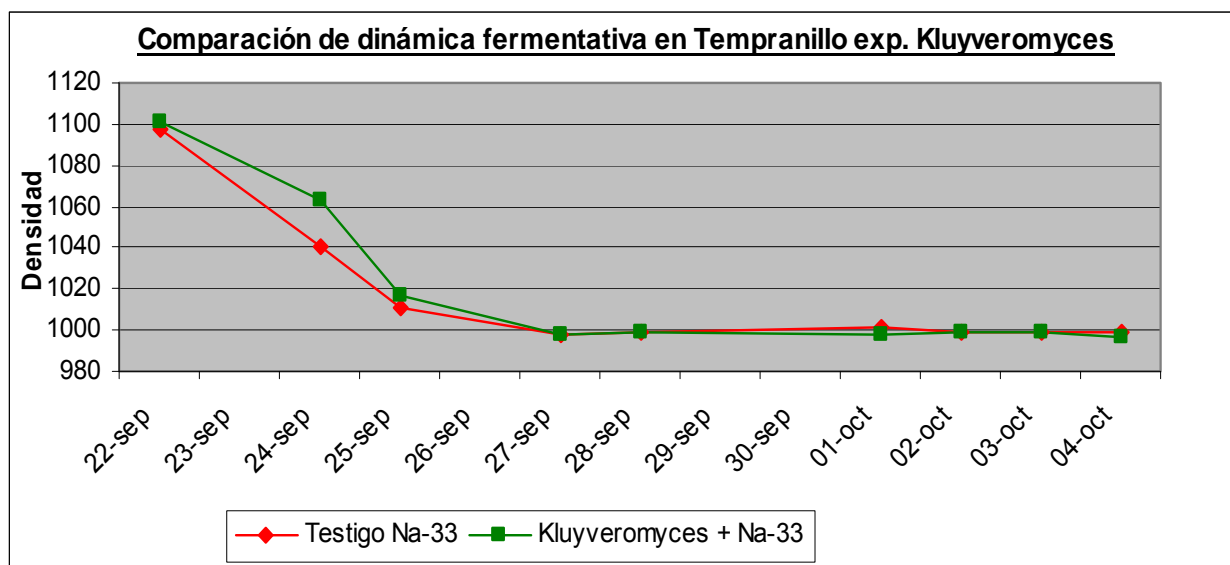
d) Variedad: Tempranillo

Variantes:

1. Testigo Na33: inoculación con solo levadura mix *S. cerevisiae* Na33/EC1118.
2. *Kluyveromyces* + Na33: coinoculación de dos levaduras, primero *kluyveromyces thermotolerans* CONCERTO y, cuando la densidad baja 25-30 puntos desde la primera inoculación, se añade *S. cerevisiae* Na33.

Resultados:

Cinética fermentativa



Parámetros básicos del vino

PARAMETROS BASICOS VINO	Testigo Na33	Kluyv. + Na33
GRADO ALC VOL ADQUIRIDO 20/20	14,35	14,57
ACIDEZ TOTAL g/l ac. Tartárico	2,9	3,2
ACIDEZ VOLATIL g/l ac. acético	0,63	0,77
ANH SULF LIBRE mg/l	20	18
ANH SULF TOTAL mg/l	36	31
AZUCARES REDUCTORES g/l	< LC 1	< LC 1
ACIDO L-MALICO	< LC 0,2	< LC 0,2
CALCIO mg/l	62	60
HIERRO mg/l	1	1,2
POTASIO mg/l	2640	2720
MAGNESIO mg/l	116	110
pH	4,63	4,61

Parámetros de color del vino:

PARAMETROS DE COLOR DEL VINO	Testigo Na33	Kluyv. + Na33
DENSIDAD OPTICA 420 nm Un Abs/cm	2,42	2,894
DENSIDAD OPTICA 520 nm Un Abs/cm	2,403	2,85
DENSIDAD OPTICA 620 nm Un Abs/cm	0,783	0,933
INTENSIDAD COLORANTE Un Abs/cm	5,6	6,7
IPT Un Abs/cm	41	47
ANTOCIANOS	598	628
CATEQUINAS	656	802
INDICE IONIZACIÓN ANTOCIANOS	6,3	9,6

Análisis organoléptico (Ficha de cata UIE, s/100):

	Testigo Na33	Kluy + Na33
Puntuación total	67.67a	68.89a
Orden de preferencia	2°	1°

- Comparando las variantes entre sí, no se observan grandes diferencias en parámetros básicos.
- En cuanto a parámetros de color, el vino elaborado con *kluyveromyces* presenta mayor contenido en Intensidad Colorante, IPT, Antocianos, Catequinas e Índice de Ionización de Antocianos.
- En cata, se prefiere el vino elaborado con *kluyveromyces*, aunque no hay diferencias significativas entre ambas variantes.

10. PAÍS VASCO

MANU LAUZIRIKA

Financiación y periodo de ensayo

- Fondos propios de la Diputación Foral de Bizkaia.
- Experiencia realizada con mosto de la vendimia del año 2012

Participantes

Nagore Martínez, Xabier Ormaetxea y Manu Lauzirika

Ensayo

Elaboración de dos Txakolis a partir de mosto procedente de la variedad de vid Hondarrabi Zuri.

Objetivos

Estudio comparativo de dos Txakolis elaborados a partir del mismo mosto, uno de ellos con el empleo de inoculación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii*) y de *Saccharomyces* y el otro únicamente con *Saccharomyces cerevisiae*.

Metodología

Partiendo de 1.000 litros de un mismo mosto, éste se ha dividido en dos depósitos de acero inoxidable de 1000 litros de capacidad, 500 litros de mosto en cada uno de ellos. En el primero se le han añadido secuencialmente levaduras no-*Saccharomyces* y, posteriormente, *Saccharomyces cerevisiae*. Como testigo, la segunda elaboración solo fue inoculada con levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras empleadas son de la casa comercial LAFFORT y se corresponden con las referencias: Zymaflore Alpha para la *Torulaspora delbrueckii* y Zymaflore VL1 para la *Saccharomyces cerevisiae*. La dosis de inoculación para la primera de las levaduras ha sido de 30g/Hl y para la segunda de 20 g/Hl.

La vendimia y prensado fue realizado el día 11/10/2013 y el desfogado en frío el día siguiente, 12/10/2013. En el mosto a elaborar con *Torulaspora* la primera inoculación se realizó el día 14/10 con una temperatura del mosto de 13°C, la segunda inoculación, con *Saccharomyces*, fue realizada el día 19/10. El mosto destinado a la fermentación estándar con *Saccharomyces* se inoculó el día 15/10.

Las elaboraciones realizadas fueron de 500 litros cada una de ellas en depósitos de acero inoxidable con camisa refrigerante. La fermentación alcohólica fue realizada a una temperatura de 16°C en la bodega experimental de la Estación de Fruticultura de Zalla.

Resultados

Debido a que es el primer año que realizamos esta experiencia únicamente disponemos de unas conclusiones preliminares, con lo que podemos decir que:

- Según las analíticas realizadas, el grado alcohólico, la Acidez total y la Acidez volátil son ligeramente inferiores en el Txakoli elaborado con *Torulaspota* y la cantidad de glicerol es mayor.
- En las catas realizadas, se obtiene como conclusión que el Txakoli inoculado con *Torulaspota* es más redondo, equilibrado y untuoso. Además por una parte de los catadores, se observan aromas más exóticos y una intensidad aromática mayor con la inoculación secuencial.

Tabla 1. Características de los vinos obtenidos

Parámetro	<i>Saccharomyces</i>	<i>Torulaspota</i> + <i>Saccharomyces</i>
Alcohol (%vol)	13,5	13,2
Azúcares reductores (g/l)	1,3	1,7
Extracto seco total (g/l)	21,7	22,5
Acidez total (g/l tartárico)	8,2	8,0
Acidez volátil (g/l acético)	0,42	0,40
PH	3,03	2,98
Ácido tartárico (g/l)	2,7	2,5
Ácido málico (g/l)	3,2	2,9
Ácido láctico (g/l)	<0,1	<0,1
SO ₂ libre (mg/l)	<0,5	7
SO ₂ total (mg/l)	39	56
Glicerol (g/l)	5,7	6,7

11. RIOJA

JUANA MARTINEZ GARCIA

Financiación y período de ensayo

- Financiación Regional: Proyecto PR-16-11(Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de La Rioja): “Caracterización vitivinícola de variedades de vid minoritarias y nuevas en la D.O.Ca. Rioja. Estudio del comportamiento enológico de la variedad Tempranillo Blanco”.
- Colaboración con la empresa Laffort.

Periodo de Ensayo: 2011

Participantes

Pilar Rubio, Elisa Baroja, Enrique García-Escudero

Objetivos

- El objetivo principal del proyecto es el estudio del comportamiento vitícola y enológico de las variedades minoritarias consideradas de mayor interés según los trabajos previos.
- Asimismo, se pretende profundizar en el conocimiento de las características enológicas de la variedad Tempranillo blanco, con el fin de optimizar la calidad de los vinos elaborados.
- Uno de los factores estudiados en el último apartado es el empleo de diferentes levaduras para potenciar las características aromáticas en los vinos de dicha variedad.

Ensayos realizados: metodología

Este trabajo se efectuó en la campaña 2011 con uva de la variedad Tempranillo blanco, procedente de una parcela experimental localizada en la Finca Valdegón (Agoncillo. La Rioja), propiedad del gobierno de La Rioja.

La uva se recogió en el momento óptimo de madurez y en perfecto estado sanitario. El mosto obtenido mediante estrujado y prensado se desfangó con enzimas pectolíticas a baja temperatura (10 °C) durante 20 horas. Posteriormente, se analizó su composición (Tabla 1) y se distribuyó en depósitos de 25 l, que fermentaron con las siguientes levaduras:

- *S. cerevisiae* ZYMAFLORE X16 (Laffort).
- *Torulaspora* ZYMAFLORE ALPHA (Laffort) + *S. cerevisiae* ZYMAFLORE X16 (Laffort).
- Flora espontánea

Tabla 1. Composición química del mosto desfangado

Parámetros	Mosto Tempranillo B.
Grado probable (%vol)	12,69
pH	3,32
Acidez total (g/l)	7,16
Acido tartárico (g/l)	7,44
Acido málico (g/l)	2,86
Potasio (mg/l)	1449
Sulfuroso libre (mg/l)	27
Sulfuroso total (mg/l)	64
IPT 280 nm	9,25
Turbidez (NTU)	83
NFA (mg/l)	168

Fermentaciones

La siembra de levaduras se realizó según el protocolo de la casa comercial. En el caso de la inoculación secuencial, primero se sembró *Torulaspora delbrueckii* para iniciar la fermentación, y cuando la densidad descendió 10-15 puntos se inoculó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación alcohólica se desarrolló a 18-20 °C, controlándose diariamente la evolución de densidad y temperatura. Una vez concluida los vinos se trasegaron, se sulfitaron y se conservaron a baja temperatura (5° C) para favorecer su estabilización y evitar las reacciones oxidativas.

Análisis químico y sensorial de los vinos

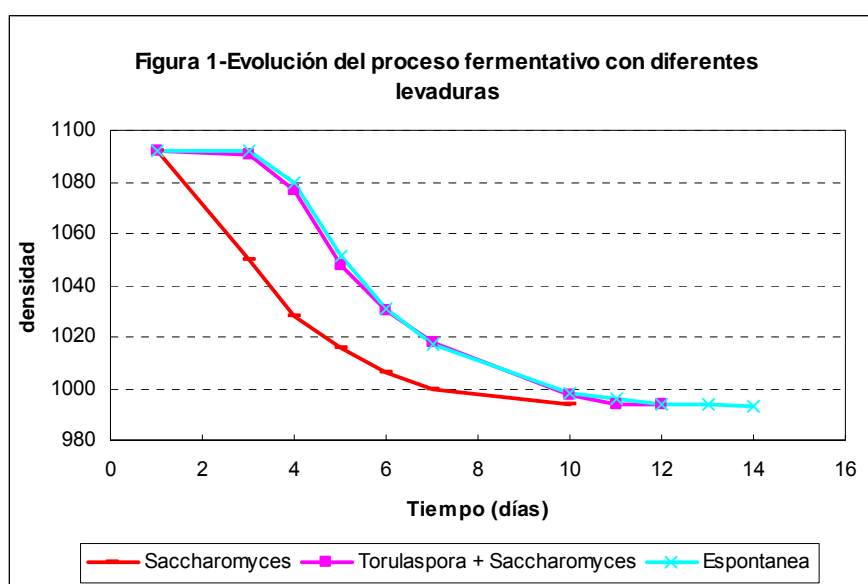
Los parámetros químicos básicos de los mostos y vinos (grado alcohólico, azúcares reductores, acidez total, acidez volátil, pH, ácido tartárico, ácido málico, potasio, sulfuroso libre, sulfuroso total, azúcares, IPT 280 nm, D.O. 420 nm, coordenadas CIELab, turbidez, NFA) se determinaron según los métodos oficiales (Reglamento CE 479/2008) o usuales. Los compuestos volátiles fermentativos se determinaron por Cromatografía de Gases (Ortega *et al.*, 2001).

La valoración sensorial de los vinos fue llevada a cabo por un panel de catadores expertos. En la ficha de cata empleada se valoraron las fases visual, olfativa (intensidad y calidad), gustativa (intensidad y calidad) y armonía, con puntuaciones decrecientes al aumentar la calidad. Además, se incluyeron descriptores cualitativos de los atributos sensoriales de las diferentes fases en una escala de intensidad de 1 a 10.

Para el estudio estadístico de los resultados se aplicó el análisis de varianza conocido como ANOVA, mediante el programa estadístico SPSS versión 15.0. En caso de existir diferencias significativas, $p > 0.05$, se utilizó el test de Tukey para la separación de medias.

Resultados

La cinética de fermentación fue ligeramente más rápida con levaduras *Saccharomyces* que en la inoculación secuencial y en los depósitos con la flora espontánea, ambas bastante similares (Figura 1). En el primer caso la duración del proceso fue de 10 días, mientras que en los otros el inicio se retrasó hasta el tercer día y concluyó sin ningún problema en 12 y 14 días respectivamente.



Los resultados del análisis químico de los vinos (Tabla 2) únicamente mostraron diferencias significativas relacionadas con la levadura empleada en los siguientes parámetros: extracto seco, potasio, acidez volátil, e IPT 280 nm.

Los contenidos más elevados de extracto seco y potasio y la menor acidez volátil se obtuvieron con la levadura *Saccharomyces*. El empleo secuencial de *Torulaspora* y *Saccharomyces* condujo a vinos con menor extracto y acidez volátil más elevada, similares a los obtenidos con la flora espontánea. Asimismo, con la inoculación secuencial el contenido de polifenoles totales fue el más bajo, y los vinos presentaron un color amarillo ligeramente menor al resto (DO 420 nm y coordenada b^*), aunque sin diferencias significativas.

Tabla 2. Composición química de los vinos elaborados con diferentes levaduras

Parámetros	<i>Saccharomyces</i>	<i>Torulospora + Saccharomyces</i>	Espontánea	G.S.
Grado (%vol)	12,9	12,9	12,85	NS
Extracto seco (g/l)	22,5 a	20,6 b	20,8 b	*
pH	3,26	3,28	3,20	NS
Acidez total (g/l)	7,05	6,46	6,56	NS
Acido tartárico (g/l)	3,23	2,98	2,98	NS
Acido málico (g/l)	2,44	1,93	1,82	NS
Potasio (mg/l)	746 a	709 ab	683 b	**
Acidez volátil (g/l)	0,30 b	0,46 a	0,52 a	**
Azúcares (g/l)	< 2,65	< 2,65	< 2,65	NS
D.O. 420 nm	0,056	0,050	0,065	NS
IPT 280 nm	7,24 ab	7,08 b	7,85 a	*
CIELab a*	-0,43	-0,42	-0,39	NS
CIELab b*	3,90	3,65	4,45	NS
CIELab L*	98,95	99,2	98,7	NS

G.S.: (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001 y NS no significativo

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según el test de Tukey

En cuanto a la composición volátil de los vinos (Tabla 3), con el empleo secuencial de *Torulospora* y *Saccharomyces* la concentración de alcoholes superiores fue similar a la fermentación espontánea, y ambas ligeramente inferiores a la obtenida con levaduras *Saccharomyces*. Las principales diferencias significativas afectaron al contenido de acetatos de isoamilo y de 2-feniletilo, que fueron claramente superiores en los vinos inoculados con levaduras *Saccharomyces*; asimismo, en dichos vinos se obtuvieron valores más elevados de otros compuestos (ácido isovalérico, succinato de dietilo, metionol y acetoina) y más bajos de 1-hexanol y metanol. La composición volátil de carácter fermentativo de los vinos obtenidos mediante inoculación secuencial de *Torulospora* y *Saccharomyces* fue bastante similar a la observada en el caso de la fermentación espontánea.

Las diferencias observadas en la composición de los vinos fueron apreciadas a nivel sensorial por los catadores (Figura 2). El vino procedente de la inoculación con levaduras *Saccharomyces* fue el mejor evaluado, especialmente por su intensidad y calidad gustativa y su armonía. En cuanto a los descriptores sensoriales (Figura 3), en este vino se percibieron con mayor intensidad las notas aromáticas características de la variedad Tempranillo blanco (floral, fruta verde, cítrica y tropical) y en boca destacó por su persistencia y equilibrio. La calidad sensorial más baja correspondió al vino obtenido con la flora espontánea, debido a sus características visuales y aromáticas (notas oxidación). La inoculación secuencial proporcionó vinos considerados de una calidad intermedia, con buenas características aromáticas, destacando los aromas de fruta de hueso y tropical, pero algo peor valorados a nivel gustativo por su elevada acidez y menor persistencia y equilibrio.

Tabla 3. Composición volátil (ppm) de los vinos elaborados con diferentes levaduras

Compuesto	Saccharomyces	Torulospora + Saccharomyces	Espontánea	G.S.
Σ Alcoholes Sup	286	230	237	NS
Acetato isoamilo	10,96 a	5,08 b	4,67 b	**
Acetato hexilo	0,144	0,147	0,139	NS
Acetato 2-feniletilo	0,508 a	0,280 b	0,250	**
Σ Acetatos	11,61 a	5,50 b	5,06 b	**
Propionato etilo	0,023	0,021	0,019	NS
Etil-3-hidroxi-butarato	0,313	0,420	0,530	NS
Isobutarato etilo	0,020	0,030	0,021	NS
Butirato etilo	0,237	0,257	0,202	NS
Hexanoato etilo	0,588	0,533	0,435	NS
Octanoato de etilo	0,448	0,567	0,458	NS
Decanoato de etilo	0,058	0,035	0,046	NS
Σ Esteres	1,681	1,862	1,712	NS
Acido propanoico	9,87	9,56	14,77	NS
Acido isobutírico	3,54	4,05	2,75	NS
Acido Butírico	2,97	2,84	3,56	NS
Acido isovalérico	2,31 a	1,24 b	0,893 b	**
Acido hexanoico	4,67	4,67	4,04	NS
Acido octanoico.	2,61	3,57	4,23	NS
Acido decanoico	0,147	0,212	0,294	NS
Σ Acidos	26,11	26,14	30,54	NS
1-Hexanol	0,615 b	0,981 a	0,955 ab	**
cis 3-hexenol	0,340	0,326	0,348	NS
Lactato etilo	3,031	2,561	2,247	NS
Succinato dietilo	0,496 a	0,299 ab	0,208 b	*
Methionol	0,720 a	0,459 ab	0,369 b	**
Acetoína	5,137 a	0,851 b	0,831 b	**
Diacetilo	0,727	0,527	0,533	NS
Acetaldehído	1,20	1,66	1,17	NS
Butirolactona	0,760	1,456	1,247	NS
Metanol	31,3 b	60,5 a	44,9 ab	*

G.S.: (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001 y NS no significativo

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según el test de Tukey

Figura 2. Valoración sensorial de los vinos elaborados con diferentes levaduras

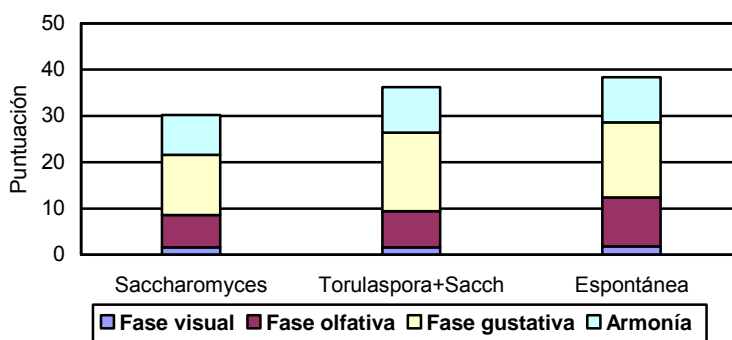
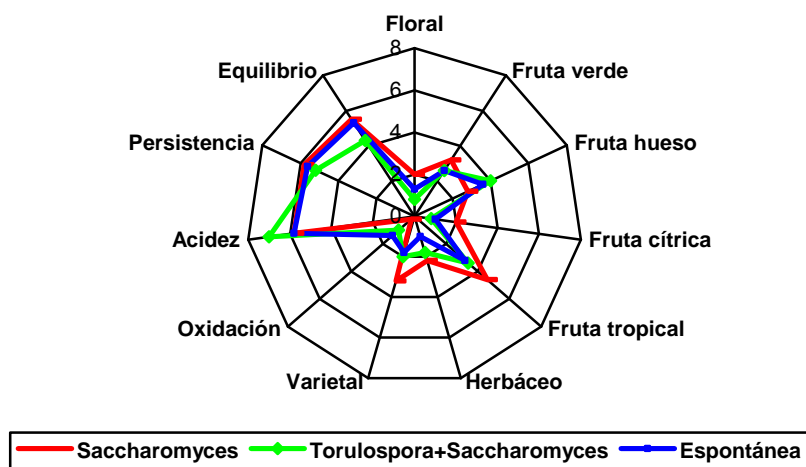


Figura 3. Descriptores sensoriales de los vinos elaborados con diferentes levaduras



CONCLUSIONES

Los datos presentados en esta guía sobre la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* en enología, tanto de forma individual como mediante inoculación secuencial con *Saccharomyces*, demuestran que este tipo de cultivos constituyen una clara y prometedora alternativa a las levaduras convencionales para la obtención de vinos diferenciados.

En las distintas comunidades se han realizado ensayos con diferentes variedades de uva y con distintas levaduras no-*Saccharomyces*, la mayoría de la especie *T. delbrueckii*. Los resultados obtenidos difieren dependiendo de diversos factores como la variedad de uva empleada, el tipo de vinificación, y cepa de levaduras y secuencia de inoculación. Aún así, se han puesto de manifiesto una serie de hechos comunes que nos permiten sacar las siguientes conclusiones:

Las 7 primeras hacen referencia a las investigaciones sobre inoculación secuencial de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*.

1. La **velocidad de fermentación** era **más lenta** en las fermentaciones inoculadas de forma secuencial con una levadura no-*Saccharomyces* seguida de una *Saccharomyces* que en las fermentaciones inoculadas con *S. cerevisiae*.
2. La práctica de inoculación secuencial permite un **acabado correcto** de la fermentación dando lugar a vinos secos con menos de 2.0 g/l de azúcares.
3. Los controles microbiológicos demostraron que la levadura *T. delbrueckii* inoculada **se implantó** con éxito sobre las levaduras presentes en el mosto, estando presentes incluso en la fase final de fermentación. Sin embargo, la cepa de *S. cerevisiae* inoculada a continuación no se implantó como era de esperar, siendo la fermentación controlada por *Saccharomyces* presentes en el mosto.
4. Los **vinos** obtenidos mediante inoculación secuencial presentaron **menor contenido en alcohol**, pero **mayor contenido en glicerol**.
5. No se encontraron diferencias sobre los parámetros de color.
6. A nivel de **compuestos aromáticos** los vinos elaborados con inoculación secuencial presentaron mayor concentración de algunos acetatos y feniletanol relacionados con aromas florales y afrutados.

7. A nivel **sensorial** los vinos elaborados mediante inoculación secuencial se caracterizaron por tener **mayor intensidad aromática y persistencia en boca** siendo, en general, mejor valorados por los catadores.

Los trabajos realizados sobre otras levaduras no-*Saccharomyces* son más escasos y, por tanto, los resultados menos concluyentes. Entre ellos, cabe destacar:

8. La utilización de levaduras encapsuladas ***Schizosaccharomyces pombe*** permite **reducir** de forma significativas la concentración de **ácido málico** en el vino.
9. La utilización de ***Pichia kluyveri*** de forma secuencial con *S. cerevisiae* no da lugar a diferencias en los parámetros básicos y de color del vino, ni a nivel sensorial. Sin embargo, se observa una reducción en el contenido de ésteres del vino.
10. Los vinos elaborados con inoculación secuencial de ***Kluyveromyces*** y *S. cerevisiae* presentaron mayor intensidad colorante, IPT y antocianos. Sensorialmente el vino elaborado con *Kluyveromyces* fue mejor valorado.
11. La levadura ***Hansenula anomala*** no se implantó como era de esperar. Aún así, los vinos con inoculación secuencial presentaron mayores valores de glicerol, compuestos fenólicos totales (A_{280}) y taninos, pudiendo contribuir al cuerpo y estructura del vino final, aunque no se diferenciaron a nivel sensorial.
12. ***Metschnikowia pulcherrima*** estaba presente desde su inoculación hasta que se añade la segunda levadura. Aunque no se vieron diferencias a nivel analítico, a nivel sensorial *Metschnikowia* fomenta el carácter varietal de los vinos.