

La importancia de las levaduras en la fermentación alcohólica del vino

Resultados del estudio de 5 años sobre la composición de la microflora en las fermentaciones espontáneas de la bodega del CIDA

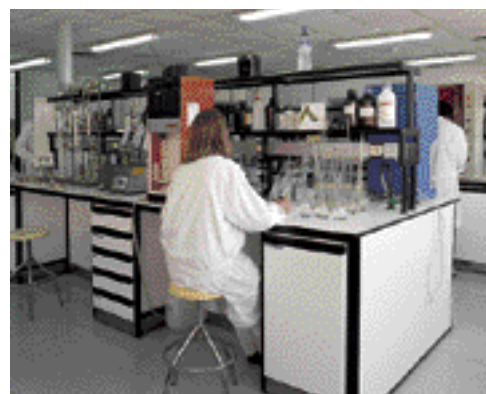
El equipo investigador realiza un proyecto de selección de levaduras para la elaboración de vinos tintos en colaboración con varias bodegas de Rioja

P. Santamaría, S. Epifanio, P. Garijo y R. López.

Centro de Investigación y Desarrollo Agrario (CIDA)

A. R. Gutiérrez. Universidad de La Rioja.

(Extracto del artículo "Ecology of spontaneous fermentation in one winery during five consecutive years" publicado en la revista *Letters in Applied Microbiology*, 29, 411-415, 1999.)



Laboratorio de la Sección de Viticultura y Enología.
Cámara Oscura

El vino es esencialmente el producto de la fermentación alcohólica, proceso mediante el cual los azúcares de la uva se transforman en etanol y otros productos secundarios debido a la acción de las levaduras. La fermentación espontánea del mosto de uva se lleva a cabo por la flora indígena de levaduras que acompaña a la vendimia y la existente en el ecosistema de la bodega. En este proceso está implicada la acción secuencial de diferentes géneros y especies de levaduras. Durante las primeras etapas de la fermentación, se desarrollan levaduras indígenas con bajo poder fermentativo: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* y *Pichia*. Cuando la concentración de etanol se va incrementando, aparecen levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, más resistentes al etanol y que son las responsables del final de fermentación (Fleet y Heard 1993). Por otra parte, la composición de la flora de levaduras puede variar con las condiciones climáticas (Parrish y Carrol 1985), la variedad de uva (Schütz y Gafner 1994) y la tecnología de vinificación (Charoenchai y col. 1998; Epifanio y col. 1999).

Dentro de la especie *Saccharomyces cerevisiae* existe una gran diversidad genética, clones distintos, con una capacidad fermentativa diferente (Vezinhet y Pineau 1990; Guillamón y col. 1996), cuya constancia se ha puesto en evidencia en los últimos años gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular que permiten diferenciar levaduras a nivel clonal.

Desde hace algún tiempo se han realizado numerosos estudios sobre la ecología de las levaduras vínicas, con el fin de estudiar si la fermentación espontánea está conducida por un alto o por un bajo número de clones de *Saccharomyces cerevisiae* y si estos clones permanecen estables en una bodega de un año a otro (Despaigne 1991; Frezier y Dubordieu 1992; Vezinhet y col. 1992). Los resultados obtenidos según zonas son diferentes. Estos estudios tienen gran interés en orden a establecer la existencia de cepas pertenecientes a un ecosistema concreto (zona, bodega, denominación de origen) y también para llevar a cabo programas de selección de levaduras autóctonas,

que podrían usarse como inóculos en las vinificaciones realizadas en una zona determinada.

El objeto del presente trabajo ha sido el estudio de la ecología de fermentaciones espontáneas en una bodega durante 5 años consecutivos, a fin de determinar las diferencias entre campañas en la composición de la microflora y su influencia sobre la cinética de la fermentación alcohólica.

Materiales y métodos

Vinificaciones: se realizaron fermentaciones espontáneas (sin inoculación de levaduras) de mosto blanco de la variedad Viura en las campañas de 1994, 1995, 1996, 1997 y 1998 en la bodega experimental del CIDA, cuya actividad se inició en 1994. Se sulfitaron los mostos antes del inicio de la fermentación (60 mg/l) y ésta se llevó a cabo a temperatura controlada de 18°C. Las fermentacio-

nes se realizaron en depósitos de 100 litros de acero inoxidable. El número de depósitos controlados fue de doce en 1994, diez en 1995, seis en 1996, y siete en 1997 y 1998.

Aislamiento e identificación de levaduras: se procedió a la toma de muestras de todos los depósitos en dos etapas de la fermentación: tumultuosa y fase final. Las muestras se sembraron en cloranfenicol glucosa agar, utilizando el método de diluciones decimales y se incubaron a 28°C durante dos días. Se examinaron las placas que contenían entre 30 y 300 colonias, y se aislaron al azar diez colonias de cada depósito, en cada una de las dos etapas de la fermentación alcohólica (Fleurent y col. 1993). Los datos de todos los depósitos de cada año se trataron en su conjunto. De esta manera, se dispuso de 240 cepas de levaduras en 1994, 200 en 1995, 120 en 1996 y 140 en 1997 y 1998.

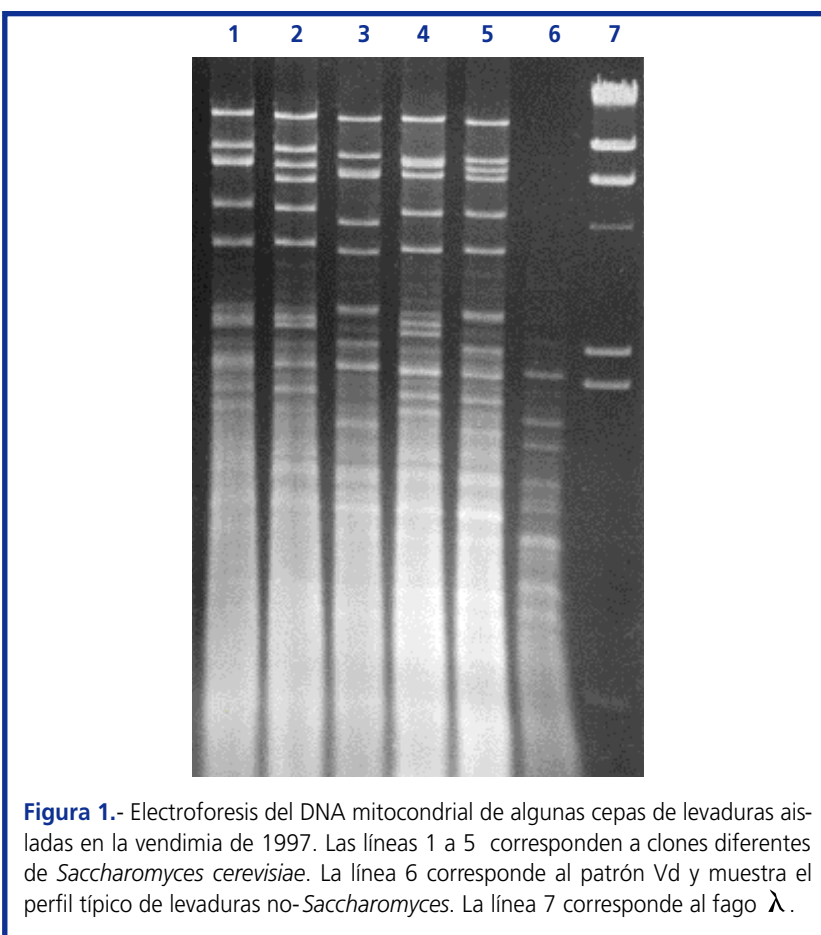


Figura 1. Electroforesis del DNA mitocondrial de algunas cepas de levaduras aisladas en la vendimia de 1997. Las líneas 1 a 5 corresponden a clones diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*. La línea 6 corresponde al patrón Vd y muestra el perfil típico de levaduras no-*Saccharomyces*. La línea 7 corresponde al fago λ .

TABLA 1.
PATRONES DE SACCHAROMYCES Y FRECUENCIA TOTAL EN CADA VENDIMIA ESTUDIADA

| 1994 Clon | % | 1995 Clon | % | 1996 Clon | % | 1997 Clon | % | 1998 Clon | % |
|-------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|------------------------------|----|-------------------|----|
| I _a | 11 | I _b | 10 | I _c | 1 | I _d | 4 | I _e | 59 |
| II _a | 7 | II _b | 3 | II _c | 56 | II _d | 13 | II _e | 4 |
| III _a | 16 | III _b | 1 | III _c | 1 | III _d | 15 | III _e | 9 |
| IV _a | 2 | IV _b | 1 | IV _c | 1 | IV _d | 6 | IV _e | 4 |
| V _a | 2 | V _b | 13 | V _c | 1 | V [*] _d | 21 | V _e | 6 |
| VI _a | 8 | VI _b | 4 | VI _c | 13 | VI [*] _d | 4 | VI _e | 4 |
| VII _a | 4 | VII _b | 13 | VII _c | 6 | VII _d | 8 | VII _e | 1 |
| VIII _a | 30 | VIII _b | 1 | VIII _c | 3 | VIII _d | 2 | VIII _e | 1 |
| IX _a | 1 | IX _b | 2 | IX _c | 2 | IX _d | 3 | IX _e | 6 |
| X _a | 2 | X _b | 3 | X _c | 4 | X _d | 1 | X _e | 1 |
| XI _a | 2 | XI _b | 5 | XI _c | 1 | XI _d | 4 | XI _e | 1 |
| XII _a | 1 | XII _b | 2 | XII _c | 2 | XII _d | 6 | XII _e | 1 |
| XIII _a | 2 | XIII _b | 3 | XIII _c | 1 | XIII _d | 3 | XIII _e | 1 |
| XIV _a | 6 | XIV _b | 1 | XIV _c | 1 | XIV _d | 1 | XIV _e | 1 |
| XV _a | 2 | XV _b | 1 | XV _c | 1 | XV _d | 1 | XV _e | 1 |
| XVI _a | 1 | XVI _b | 6 | XVI _c | 1 | XVI _d | 1 | | |
| XVII _a | 3 | XVII _b | 10 | XVII _c | 1 | XVII _d | 1 | | |
| | | XVIII _b | 6 | XVIII _c | 1 | XVIII _d | 1 | | |
| | | XIX _b | 6 | XIX _c | 3 | XIX _d | 1 | | |
| | | XX _b | 1 | | | XX _d | 2 | | |
| | | XXI _b | 4 | | | XXI _d | 1 | | |
| | | XXII _b | 4 | | | XXII _d | 1 | | |

* Cepas No-Saccharomyces.

- Los datos son medias entre la fase tumultuosa y la fase final en 12 depósitos en 1994, 10 en 1995, 6 en 1996 y 7 en 1997 y 1998.

Cada una de las 840 colonias aisladas se identificó en base a su DNA mitocondrial (Querol y col., 1990). Este análisis permite diferenciar las levaduras en distintos niveles:

- a nivel de género: *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*.
- a nivel de especie: *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*.
- a nivel de clon: Diferenciando cepas dentro de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

La **figura 1** es un ejemplo de los resultados obtenidos. Las carreras 1 a 5 corresponden a diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. La carrera 6 muestra un perfil de una cepa no-*Saccharomyces* y la 7 es un fago λ.

Los diferentes clones de levaduras obtenidos en cada campaña, mediante el análisis de DNA mitocondrial, se designaron con números romanos. Los subíndices a, b, c, d, e corresponden a las vendimias de 1994, 1995, 1996, 1997 y 1998, respectivamente.

Análisis de los vinos: los análisis de los vinos en cuanto a azúcares reductores y acidez volátil se realizaron según los métodos oficiales de la CEE (1990).

Resultados y discusión: todas las colonias aisladas, tanto en fermentación tumultuosa como en la fase final de la misma, pertenecieron al género *Saccharomyces*, a excepción de algunos clones de levaduras procedentes de la campaña de 1997. En este año, como posteriormente se comprobará, las fermentaciones fueron muy problemáticas.

El número de clones diferentes detectados en cada campaña y su frecuencia de aparición variaron de un año a otro (Tabla 1). Los años en los que aparecieron un menor número de clones distintos

(1994, 1996 y 1998) hubo una cepa de levadura dominante durante la fermentación alcohólica. Así, en 1994, el clon VIII_a se encontró presente con una frecuencia del 30%; en 1996, el clon II_c y en 1998, el I_e fueron los dominantes con porcentajes de 56% y 59%, respectivamente. Esta circunstancia no se dio en las dos campañas restantes, donde se encontraron un elevado número de clones, pero ninguno de ellos fue el que mayoritariamente dirigió la fermentación.

Estos resultados diferentes en función de la campaña analizada -un alto

TABLA 2.
CLONES IDÉNTICOS AISLADOS EN DIFERENTES CAMPAÑAS Y SU FRECUENCIA DE APARICIÓN
(patrones situados en la misma línea son idénticos)

| 1994 Clon | % | 1995 Clon | % | 1996 Clon | % | 1997 Clon | % | 1998 Clon | % |
|-------------------|----|-------------------|----|--------------------|----|-------------------|---|-------------------|----|
| II _a | 7 | | | | | VIII _d | 2 | | |
| III _a | 16 | XVII _b | 10 | | | VII _b | 8 | | |
| IV _a | 2 | | | | | X _d | 1 | | |
| V _a | 2 | XI _b | 5 | | | | | | |
| VI _a | 8 | | | | | | | II _e | 4 |
| VIII _a | 30 | I _b | 10 | VIII _c | 3 | IV _d | 6 | V _e | 6 |
| XIV _a | 6 | II _b | 3 | V _c | 1 | | | XIII _e | 1 |
| XV _a | 2 | | | II _c | 56 | | | VI _e | 4 |
| XVI _a | 1 | XIII _b | 3 | | | | | I _e | 59 |
| | | XVI _b | 6 | VII _c | 6 | I _d | 4 | | |
| | | XIX _b | 6 | IX _c | 2 | IX _d | 3 | | |
| | | | | XIII _c | 1 | | | XV _e | 1 |
| | | | | XVIII _c | 1 | XII _d | 6 | | |

número de cepas en bajos porcentajes o un menor número con una de ellas dominante- ya habían sido reflejados en otros trabajos. Querol y col. (1994) compararon la dinámica de las poblaciones de levadura en dos bodegas, observando cómo en una de ellas había una cepa de levadura dominante mientras que en la otra se presentaba una sucesión de clones diferentes en baja proporción. Sin embargo, Versavaud y col. (1995) detectaron, en todas las vinificaciones que estudiaron, que las fermentaciones eran conducidas por una o dos cepas y que éstas representaban más del 50% del total de la población. Las dos situaciones se han encontrado en este estudio, dependiendo del año analizado.

Cuando se compararon los clones de las cinco campañas, se observó la existencia de 13 cepas que se repitían en más de una añada, aunque sólo una lo hizo todos los años (Tabla 2). El clon VIII_a de 1994 es el mismo que los clones I_b, VIII_c, IV_d y V_e correspondientes a los años 1995, 1996, 1997 y 1998. Algo similar ocurrió con la cepa XIV_a de 1994, que apareció todos los años a excepción de

TABLA 3.
DATOS MEDIOS DE ALGUNOS PARÁMETROS DE LOS VINOS ELABORADOS.

| Parámetros | Campaña | | | | |
|---------------------------|---------|------|------|-------|------|
| | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 |
| Azúcares reductores (g/l) | 1.93 | 1.98 | 2.52 | 16.78 | 2.02 |
| Acidez Volátil (g/l) | 0.28 | 0.39 | 0.47 | 2.56 | 0.60 |

1997 que fue una vendimia problemática. Las proporciones en las que aparecieron estos clones comunes mostraron una gran variabilidad en función del año. Así, el patrón VIII_a, que en 1994 tenía una frecuencia de aparición del 30%, no alcanza niveles superiores al 10 % en los demás años de estudio. Lo mismo se detectó con el clon I_b de 1996 y el I_c de 1998, que fueron los dominantes en esos años, mientras que en el resto de las campañas en que estuvieron presentes, lo hicieron en una baja proporción. Los restantes patrones comunes a varias campañas aparecieron en bajas proporciones.

Así, y para la bodega del Centro de Investigación, no es posible afirmar que haya cepas típicas de *Saccharomyces cerevisiae* que jueguen un importante papel en todas las vinificaciones. Es de destacar que esta bodega, en donde se ha

llevado a cabo el estudio, empezó a elaborar vino en 1994, y que la creación de un ecosistema propio puede requerir un mayor período de tiempo.

Algunos autores (Sabate y col. 1998) han sugerido que un programa de selección de levaduras debería basarse sólo en aquellas levaduras que aparecieran como dominantes en algunas vinificaciones, o que estuvieran presentes en sucesivas campañas dentro de un ecosistema concreto. A nuestro entender, este criterio no es suficiente, ya que los resultados obtenidos muestran que sólo unas pocas cepas de levaduras son comunes a lo largo de varios años (con una amplia diversidad clonal) y que las especies que aparecen como dominantes en un año pueden desaparecer completamente en otro. El criterio expuesto anteriormente para un programa de se-



Bodega experimental del CIDA donde se ha realizado el ensayo.
Cámara Oscura

TABLA 4.
EVOLUCIÓN DE DIFERENTES CLONES DE LEVADURA (%) DURANTE LAS VINIFICACIONES DE 1997

| Cepas | Fermentación tumultuosa | Final fermentación | Total |
|-------|-------------------------|--------------------|-------|
| I | 4 | 4 | 4 |
| II | 9 | 17 | 13 |
| III | 18 | 12 | 15 |
| IV | 6 | 6 | 6 |
| V* | 42 | - | 21 |
| VI* | 8 | - | 4 |
| VII | 4 | 12 | 8 |
| VIII | 3 | 1 | 2 |
| IX | 2 | 4 | 3 |
| X | 2 | - | 1 |
| XI | - | 8 | 4 |
| XII | 1 | 11 | 6 |
| XIII | - | 6 | 3 |
| XIV | - | 2 | 1 |
| XV | - | 2 | 1 |
| XVI | - | 2 | 1 |
| XVII | - | 2 | 1 |
| XVIII | - | 2 | 1 |
| XIX | - | 2 | 1 |
| XX | 1 | 3 | 2 |
| XXI | - | 2 | 1 |
| XXII | - | 2 | 1 |

* Cepas No-*Saccharomyces*.

lección podría suponer una pérdida de un amplio potencial genético y la eliminación de cepas que podrían ser muy útiles en determinadas condiciones de vinificación.

La campaña de 1997 fue muy problemática en muchas zonas vitícolas españolas debido en gran parte a problemas de paradas de fermentación. La bodega del CIDA no fue una excepción. La tabla 3 muestra las medias de los azúcares residuales y de la acidez volátil de los vinos cuyas fermentaciones se estudiaron en este trabajo. Como puede observarse, los vinos elaborados en 1997 no acabaron sus fermentaciones y su acidez volátil fue demasiado alta.

Esta situación poco frecuente también se reflejó en los datos microbiológicos obtenidos en 1997. Levaduras no pertenecientes a la especie *Saccharomyces* fueron las que dominaron en fermentación tumultuosa (Tabla 4). Los patrones V y VI (no-*Saccharomyces*) presentaron frecuencias del 42% y del 8%, respectivamente. Ambos clones desaparecieron en la fase final de la fermentación y fueron reemplazados por un elevado número de clones pertenecientes al género *Saccharomyces*. La presencia de cepas no-*Saccharomyces* como levaduras predominantes en 1997 podría explicar la parada de fermentación y los datos anormales en cuanto a los análisis de los vinos.

Conclusiones

- El número de cepas de levadura diferentes y su frecuencia de aparición varía de una campaña a otra.
- Algunas cepas de levaduras se repiten en años consecutivos, pero su porcentaje varía de un año a otro. Tan sólo una de ellas estuvo presente en los cinco años estudiados.

Como consecuencia de este trabajo, podemos decir que en los años objeto de estudio no es posible afirmar que haya cepas de *Saccharomyces cerevisiae* representativas del ecosistema de la bodega del CIDA, quizás debido a que sus instalaciones se estrenaron en 1994, año en que comenzó este estudio.

En la actualidad se está llevando a cabo en el Centro de Investigación y

Desarrollo Agrario un proyecto de selección de levaduras para la elaboración de vinos tintos. Para su desarrollo se cuenta con la colaboración de varias bodegas comerciales de la D.O.Ca Rioja, algunas de ellas centenarias. El estudio de la ecología de las fermentaciones durante cuatro años consecutivos en esas bodegas colaboradoras nos permitirá ampliar este trabajo y comprobar la existencia o no de cepas de levaduras características.

BIBLIOGRAFÍA

Charoenchai, C.; Fleet G.H. and Henschke P. (1998) Effects of temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeast. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 283-288.

Despaigne, F. (1991) Étude de l'écologie des levures en fermentation spontanée. Contrôle du levurage par électrophorèse en champs pulsé. Application à la vinification en rouge. *Revue Française d'Oenologie*. 132, 31-37.

Epifanio, S.; Gutiérrez, A.R.; Santamaría, P. and López R. (1999) The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 50, 2, 219-224.

Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993) Yeast: growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G.H. Fleet (Ed.). pp. 27-54. Harwood Academic Publishers. Switzerland.

Fleurent, S.; Dulau, L.; Valet-Gaucher, D.; Thomas, Y. and Degré, R. (1993) Implantation controls of wine yeast strains using PCR. *American Journal of Enology and Viticulture*. 44, 354.

Frezier, V. and Dubordieu, D. (1992) Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *American Journal of Enology and Viticulture*. 43, 375-380.

Guillamón, J.M. (1996) Estudio ecológico de la fermentación alcohólica mediante la utilización

de marcadores moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Guillamón, J.M.; Barrio, E. and Querol, A. (1996) Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Systematic and Applied Microbiology*. 19, 122-132.

Parrish, M.E. and Carroll, D.E. (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*. 12, 3-31.

Querol, A.; Barrio, E. and Ramón, D. (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2948-2953.

Querol, A.; Barrio, E. and Ramón, D. (1994) Population dynamics of wine yeast strains in natural fermentation. *International Journal Food Microbiology*. 21, 315-323.

Sabate, J.; Cano, J.; Querol, A. and Guillamón, J.M. (1998) Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Letters in Applied Microbiology*. 26, 452-455.

Versavaud, A.; Courcoux, P.; Roulland, C.; Dulau, L. and Hallet, J.N. (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 3521-3529.