Levaduras *Saccharomyces cerevisiae* principales responsables de la fermentación alcohólica.

Las levaduras en la industria enológica

Conjugar el efecto beneficioso de la inoculación de levaduras sin que los vinos pierdan tipicidad es uno de los retos futuros en este campo de investigación

Texto y fotografías: **Rosa López, Pilar Santamaría y Patrocinio Garijo**. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDA)
Ana Rosa Gutiérrez. Universidad de La Rioja

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 del mosto se lleva a cabo por la flora indígena de levaduras presentes en el mosto. Las levaduras indígenas con baja capacidad fermentativa pertenecientes a los géneros *Kloeckera*, *Candida* y *Hanseniaspora* y en menor medida *Hansenula*, *Rhodotorula* y *Pichia*, crecen durante las primeras etapas del encubado, pero cuando la concentración de etanol aumenta en el medio, las levaduras más tolerantes al mismo, pertenecientes al género *Saccharomyces*, completan la fermentación. Sin embargo, numerosos estudios han informado de la importante contribución de estas especies de levaduras de bajo poder fermentativo, a la composición organoléptica de los vinos.

De cualquier modo, son las levaduras del género *Saccharomyces* y concretamente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, la que es considerada como levadura principal, porque por sí sola es capaz de conducir hasta el final el proceso de la fermentación. Pero dentro de la especie *Saccharomyces cerevisiae* existe una gran diversidad genética a nivel clonal, es decir levaduras con comportamientos enológicos distintos. Esta diversidad clonal sólo ha podido verificarse científicamente cuando se han aplicado al estudio de las levaduras técnicas de biología molecular. Hasta hace no más de 15 ó 20 años, cuando sólo se utilizaban técnicas morfológicas y fisiológicas, no era posible distinguir entre los distintos clones de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Hoy en día se están aplicando en el campo de la microbiología enológica técnicas de biología molecular, que han permitido hacer estudios muy interesantes sobre ecología, distribución y diversidad de levaduras.

Por lo tanto, durante la vinificación participa una población microbiana compleja, que ahora conocemos muy bien. Pero esto no siempre ha sido así: hasta el año 1858, en el que Pasteur demostró que la fermentación alcohólica sólo es posible con la actuación de las levaduras, y concretamente cuando éstas viven sin aire, la vinificación se atribuía a una especie de descomposición espontánea de la materia orgánica.

Ahora bien, aunque sepamos que las levaduras son necesarias para que haya fermentación, nos podemos preguntar ¿de dónde vienen, cómo llegan al mosto?, porque lo cierto es que cuando la uva entra en la bodega y con ella llenamos un depósito, en muy pocas horas comienza a fermentar y, por lo tanto, las levaduras ya están ahí. Actualmente se conoce que existen dos vías de inoculación del mosto con levaduras.

En primer lugar, la uva que entra en la bodega lleva adherida a la pruina, la capa cerosa que protege las bayas, una población microbiana importante compuesta por levaduras, bacterias y mosquitos. El tipo de levaduras que lleva la uva pertenece al grupo de levaduras de bajo poder fermentativo; muy pocas veces se ha encontrado en la uva levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, es difícil pensar que con la carga microbiana que lleva la uva se complete una fermentación.

En segundo lugar, a través de los materiales de la bodega (despalilladora, estrujadora, tuberías, depósitos...). A medida que el mosto va tomando contacto con los diferentes materiales de la bodega, las levaduras que han permanecido durante meses en formas de resistencia sobre estas superficies, pasan al mosto y comienzan a multiplicarse y a fermentar. Esta segunda vía de inoculación aporta al mosto principalmente levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, es decir, levaduras capaces de completar una fermentación.

Por lo tanto, actualmente se considera que una fermentación espontánea se desarrolla desde un punto de vista microbiológico de la siguiente forma: cuando comienza el encubado se produce un inicio de fermentación por levaduras

no-*Saccharomyces* que provienen principalmente de la uva y, a continuación (en 1 ó 2 días), son las levaduras del género *Saccharomyces*, cuyo principal origen es la propia bodega, las únicas protagonistas de la fermentación. Este esquema de fermentación se ha descrito en todas las partes del mundo, y también los datos de participación de cada tipo de microorganismo: así sabemos que las levaduras del género *Saccharomyces* suponen más del 95% de todas las levaduras que participan en una fermentación.

Fermentación inoculada

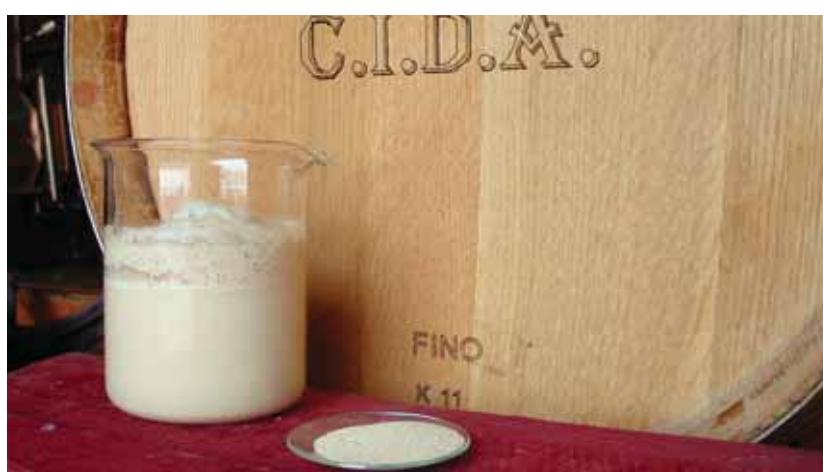
Pero además del modelo de fermentación descrito, que podríamos llamar fermentación espontánea, existen también las llamadas fermentaciones inoculadas; es decir, aquellos casos en los que, además de las levaduras propias de la uva y la bodega, se adicionan otras levaduras externas.

La utilización de inóculos de levaduras seleccionadas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* se basa en la gran diversidad clonal existente dentro de esta especie y que se evidencia en diferentes comportamientos enológicos de las cepas: unas fermentan más rápido, otras generan más acidez volátil, otras producen más aromas en el vino...; es decir, diferencias con una repercusión muy importante en las características del vino y en el proceso de elaboración. Precisamente estas diferencias en el comportamiento de las levaduras hacen que algunos años, en los que la flora indígena no es muy adecuada, el

resultado de la vinificación no sea el deseado. Además, si las levaduras que participan cada año son diferentes, darán lugar a diferencias entre los vinos que una bodega obtiene cada campaña. Estas serían las dos razones iniciales que justificaron la inoculación cuando se empezó a emplear esta técnica: evitar heterogeneidad entre campañas y regularizar la fermentación evitando el problema de las paradas.

Sin embargo, en la actualidad, la siembra se ha convertido en una herramienta tecnológica más y la utilización de levaduras comerciales se emplea para responder a problemas técnicos concretos. Actualmente se desarrollan programas de selección de levaduras, basados en criterios muy concretos que permitan obtener cultivos adecuados para elaborar vinos tintos de mucho color, vinos tintos de menos color pero más aromáticos, vinos blancos muy aromáticos, para elaborar vinos de elevado grado alcohólico, vinos muy ácidos, para refermentar vinos parados...

Las primeras levaduras seleccionadas para vinificación se utilizaron en Francia en 1930 por el Instituto Laclaire en forma de suspensiones líquidas. Su utilización forma parte de las técnicas enológicas habituales en países de enología reciente (USA, Australia, Sudáfrica, etc.). Aceptar este control biológico de la fermentación tardó más tiempo en países con mayor tradición vitivinícola, aunque hoy se acepta de forma generalizada en todos los países de Europa y Sudamérica.



Hidratación de Levaduras Secas Activas (L.S.A.)

L.S.A. autóctona seleccionada en el CIDA de La Rioja.

Tradicionalmente, los programas de selección de levaduras de vinificación se han llevado a cabo entre cepas naturales, generalmente dentro de las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*, con algunas excepciones marcadas por las características particulares de los mostos. Estos programas de selección clonal están basados en el aislamiento en diferentes etapas de la fermentación de un elevado número de cultivos puros, que una vez caracterizados taxonómicamente, se estudian desde el punto de vista enológico. El criterio a la hora de seleccionar una levadura es que ésta se adapte a la materia prima original, a las condiciones tecnológicas disponibles y a las características del producto final que queremos obtener.

A pesar de que la inoculación de levaduras es relativamente nueva en la forma (levaduras secas activas pertenecientes a un único clon), la finalidad de la misma (adicionar levaduras a mostos deficientes) se ha practicado desde hace muchos años mediante los tradicionales "pies de cuba". La nueva técnica supone una mayor garantía acerca de la naturaleza y número de microorganismos añadidos, y su utilización produce un comienzo rápido y un desarrollo regular de la fermentación alcohólica, así como una transformación más completa de los azúcares.

Cuando se siembran los depósitos, se adicionan levaduras previamente seleccionadas en un número elevado y en un estado fisiológico activo, a fin de asegurar su dominio sobre la flora indígena. Pero, para inocular correctamente, los depósitos se deben seguir unos principios operativos básicos y no es infrecuente detectar inoculaciones mal efectuadas en las bodegas. El primer aspecto que hay que considerar antes de proceder a la inoculación, se refiere a la elección de la cepa de levadura: es fundamental elegir la levadura adecuada a las condiciones en que se va a producir la fermentación y a las características del vino que se pretende obtener. Una vez elegida la cepa, los puntos esenciales en la preparación del inóculo son el tiempo y la temperatura de hidratación de la levadura seca. El tiempo (20-30 minutos) sería el que

necesitan las células para recuperar el agua intracelular y pasar de un estado de latencia a un estado activo. La temperatura del agua empleada en la hidratación debe estar comprendida entre 35-40°C. Además, aspectos como dosis de inóculo, volumen de agua empleada y condiciones de conservación de las L.S.A., especificados en el envase por la casa comercial, también deben controlarse.

Pero, a pesar de las evidentes ventajas que supone la inoculación, ésta no es una técnica unánimemente aceptada en todas las zonas vitivinícolas ni por todos los productores de vinos. Es indudable que la inoculación confiere a la vinificación un mayor control del proceso. Sin embargo, los detractores de la inoculación cuentan con argumentos de peso en contra de la misma:

- pérdida de tipicidad y complejidad de los vinos obtenidos, y
- el temor de que la siembra suponga la pérdida irrecuperable de cepas autóctonas de sus ecosistemas debido a la permanencia y dominio de la cepa añadida a lo largo del tiempo.

Tipicidad

La tipicidad de los vinos de una región viene determinada, entre otros factores, por los microorganismos que están adaptados a esa zona y que se han mantenido a lo largo del tiempo. En este sentido, la inoculación con cepas muy diferentes podría modificar las características de los vinos. Es evidente que si los mismos cultivos comerciales se emplean en diferentes zonas vitivinícolas, existe el riesgo de cierta uniformización de los productos obtenidos y con ello cierta pérdida de tipicidad. Para solucionar este problema, se vienen desarrollando en los últimos años programas de selección entre las levaduras naturales de cada región.

Por otra parte, los vinos obtenidos mediante la participación de varias levaduras diferentes, tanto no-*Saccharomyces*



como clones distintos de *Saccharomyces*, serán más complejos y con más matices que aquellos en los que sólo participa un microorganismo, como sería el caso de los mostos inoculados con levaduras comerciales.

También se ha estudiado el efecto que tiene la inoculación sobre el ecosistema de la bodega donde se aplica. Se ha detectado que la cepa adicionada permanece en la bodega en los años posteriores a la inoculación y en ocasiones disminuye o anula la presencia de cepas autóctonas. En otros casos, sin embargo, la cepa adicionada apenas modifica el ecosistema inicial y su presencia es mínima. Es posible que estas diferencias se deban a la distinta naturaleza tanto de las cepas empleadas como inóculo como de las cepas de la bodega.

Para intentar conjuntar el efecto beneficioso de la inoculación sin perder tipicidad y modificar lo menos posible el ecosistema de la bodega, una de las alternativas que se plantea es la coinoculación: inóculos formados por una mezcla de levaduras autóctonas, tanto *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces*. Sin embargo, esta técnica no se practica actualmente en el ámbito industrial porque no se ha podido asegurar hasta ahora la participación proporcional de los distintos microorganismos y existe el riesgo de que uno domine y anule la presencia del resto.

Por lo tanto, es necesario optimizar estos "nuevos" sistemas de inoculación con el fin de mejorar el control de la fermentación manteniendo la complejidad de los vinos; y si además las cepas empleadas son autóctonas también se mantendría la tipicidad.

Es muy posible que en el futuro los enólogos prefieran utilizar mezclas de cepas autóctonas que reflejen la biodiversidad y las características distintivas de una región. Pero para el uso óptimo de estos inóculos, es necesario conocer previamente la diversidad de las levaduras, su distribución geográfica, su ecología, su metabolismo, así como las interacciones que tienen lugar entre ellas.