

Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas

Ignacio Belda. Eva Navascués. Alejandro Alonso.
Domingo Marquina. Antonio Santos.

Departamento de Microbiología-III. Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais, 12. 28040-Madrid
ignaciobelda@ucm.es enavascues@agrovin.com raalonso@ucm.es
dommarq@ucm.es ansantos@ucm.es

Resumen: la industria enológica persigue la búsqueda continua de cepas de levadura para el desarrollo óptimo de sus procesos de fermentación dirigidos. El aislamiento de cepas autóctonas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se impone como una opción muy favorable que nos permite complementar las ventajas del uso de levaduras seleccionadas como inóculos frente a los procesos de fermentación espontánea, con las propiedades más apreciadas de éstas aportadas por la microbiota autóctona asociada a ellas. En la selección de cepas de *S. cerevisiae* para su uso en procesos dirigidos de fermentación se hace necesaria la caracterización de las propiedades enológicas más relevantes, tanto fermentativas, como tecnológicas y sensoriales.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*. Elaboración de vino. Fermentación espontánea/dirigida. Levaduras autóctonas.

MICROBIOLOGÍA DEL PROCESO DE VINIFICACIÓN

Recientes estudios afirman que el origen de la elaboración de **vino** se remonta a las más antiguas civilizaciones mediterráneas (año 7000 a.C.) (Terral *et al.*, 2010). A pesar de ello, el concepto de levadura como microorganismo responsable de llevar a cabo la fermentación no fue desarrollado hasta finales del siglo XIX con los trabajos de Pasteur y otros investigadores, que revelaron por primera vez la actividad microbiana que subyace detrás del proceso de **fermentación**. Con el conocimiento de que las levaduras eran las responsables de la biotransformación del mosto (compuesto principalmente por glucosa y fructosa) en alcohol y dióxido de carbono, la vinificación comenzó a ser un proceso controlable desde la viña hasta el embotellado (Chambers y Pretorius, 2010).

Más tarde, con el avance de las técnicas microbiológicas, Müller-Thurgau (1890) introdujo el concepto de **fermentación inoculada** con cultivos puros de levaduras seleccionadas. Como resultado, la calidad y la cantidad de vino producido fueron ampliamente mejoradas (Rodríguez, 2007).

Las levaduras, en la actualidad, tienen función en muchos procesos tecnológicos e industriales. En las fermentaciones vínicas interviene un gran número de especies de levaduras a lo largo de todo el proceso, sin embargo son las del género *Saccharomyces*, y en particular *Saccharomyces cerevisiae*, las que lo llevan a término (Török *et al.*, 1996).

El vino puede definirse como la bebida obtenida de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de la uva o su mosto. Se trata de un producto variable que, aunque se ajusta en todos los casos a esta definición, muestra una gran heterogeneidad dependiendo de:

- La uva: variedad de *Vitis vinifera* de la cual procede, grado de maduración y estado fitosanitario.
- Proceso tecnológico de elaboración: referido tanto a las instalaciones bodegueras como a los tratamientos enológicos empleados en el mosto o el vino terminado.
- Agentes fermentativos: fundamentalmente, las levaduras que llevan a cabo la transformación. Pueden proceder de la **microflora natural** presente en el hollejo de la uva (fermentaciones espontáneas) o de inóculos seleccionados en el caso de fermentaciones biológicas controladas, en las que se conoce la naturaleza y fisiología de las especies y/o cepas que propician el proceso de vinificación.

Conforme avanza el conocimiento sobre el vino, a través de la funcionalidad de sus levaduras y su posible control biotecnológico, han surgido nuevas líneas de investigación aplicada que pretenden mantener, en una escala de trabajo industrial, el equilibrio biológico inherente a la naturaleza del proceso de vinificación. Todo ello mediante un exhaustivo conocimiento de sus bases fisiológicas y bioquímicas (Fleet, 2008).

De los 100 géneros de levaduras, representados por unas 700 especies, tan solo 13 géneros están relacionados con los procesos de vinificación: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* (y su anamorfo *Kloeckera*), *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Kurtzman y Fell, 1998).

La microbiota que encontramos inicialmente en un mosto que va a ser fermentado depende de factores propios tanto de la uva como de la bodega. El método de recogida de la uva y su transporte, así como su temperatura, condición fitosanitaria y estado de maduración afectan a la flora microbiana propia de la uva. En cuanto a la influencia de la bodega en la microbiota del mosto, la adición de sulfitos, los tratamientos enzimáticos, el método de clarificación y, sobre todo, la adición de cultivos iniciadores determinan también su población (Pretorius *et al.*, 1999; Pretorius, 2000).

Durante la **fermentación espontánea** de los mostos se produce una sustitución secuencial de distintas especies de levaduras (Fig. 1). Inicialmente, cuando el grado alcohólico es bajo, predominan las levaduras apiculadas, productoras de bajo grado alcohólico que pueden producir importantes concentraciones de ácidos y otros compuestos volátiles. Predominan los géneros *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces* y *Pichia (Hansenula)* (Fleet y Heard, 1993). Estas levaduras aseguran el inicio de la fermentación aunque son muy sensibles al anhídrido sulfuroso, de manera que su participación es reducida cuando las vendimias han sido muy sulfitadas.

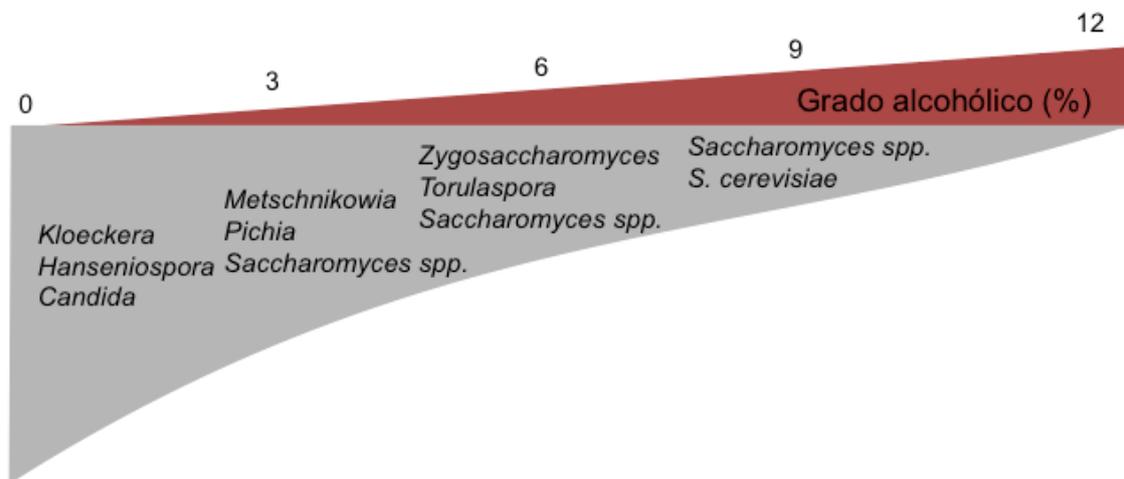


Figura 1. Esquema representativo de la dinámica de poblaciones en un proceso espontáneo de fermentación.

La presión selectiva a lo largo del proceso fermentativo (disminución gradual de los nutrientes y aumento de la concentración de alcohol en el medio, principalmente) determina la sucesión de las poblaciones microbianas en el vino. Se favorece el dominio de aquellas especies que presentan el metabolismo fermentativo más eficiente, principalmente *S. cerevisiae*, junto con una mayor resistencia al grado alcohólico. Por ello, esta especie suele ser la que lleva a cabo la mayor parte del proceso fermentativo (Pretorius, 2000).

En un proceso de vinificación la contribución de una levadura a las características organolépticas finales del vino puede deberse a diferentes aspectos (Henschke, 1997; Swiegers *et al.*, 2005): la liberación de etanol y otros solventes al medio que favorecen la extracción de los componentes aromáticos contenidos en la uva, la producción de una gran variedad de metabolitos aromáticos (alcoholes, ésteres, aldehídos, compuestos volátiles sulfurados, etc.) o la liberación de enzimas capaces de transformar compuestos aromáticamente neutros de la uva (los denominados precursores) en compuestos aromáticos.

La importancia de la función de las levaduras y su influencia en la composición química de los vinos queda probada a través del estudio de fermentaciones que, siendo llevadas a cabo por diferentes cepas de *S. cerevisiae* y utilizando una misma variedad de

mosto, muestran una gran variabilidad en los compuestos generados (Fig. 2). Este hecho indica que la calidad final de un vino es el resultado de la interacción entre la levadura y el mosto de uva (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012; Loscos *et al.*, 2007; Swiegers *et al.*, 2007; Ugliano *et al.*, 2006). Así, el empleo de diferentes cepas de *S. cerevisiae* permite obtener vinos con diferentes composiciones químicas (variaciones en la producción de glicerol, etanol o ácido acético) (Regodón *et al.*, 2006), así como perfiles sensoriales y aromáticos distintos (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012).

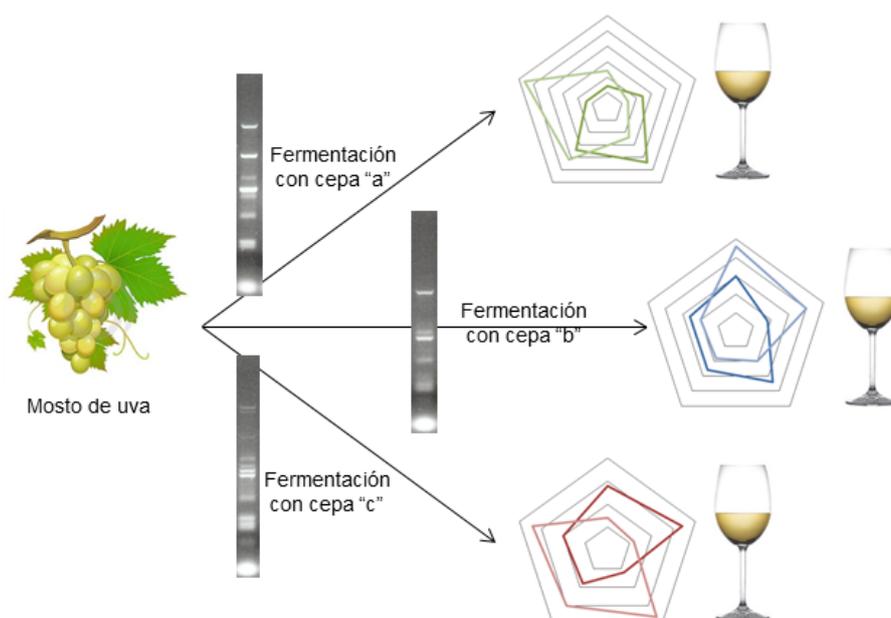


Figura 2. Influencia de las distintas cepas de *S. cerevisiae* empleadas como inóculo en la composición química y las propiedades sensoriales del vino.

Fermentaciones espontáneas Vs. Fermentaciones dirigidas

Desde sus orígenes, el vino se ha elaborado a través de la microbiota natural presente en la superficie de la uva y asociada a las superficies de las instalaciones de la bodega (tanques, conducciones, barricas, etc.) (Pretorius, 2000). Hasta finales del siglo XIX, en las bodegas se prescindía del uso de cultivos puros de levadura como inóculo en las fermentaciones. El botánico y enólogo Müller-Thurgau fue el que, en 1890, introdujo el método de inocular el mosto con levaduras iniciadoras y años más tarde, a mediados de la década de 1960, aparecieron en el mercado las primeras **Levaduras Secas Activas (LSA)** como inóculos para vino (del inglés, ADWY, "Active Dry Wine Yeast").

Hoy en día existe toda una industria dedicada a la búsqueda, caracterización, producción y comercialización de **cultivos seleccionados** de *S. cerevisiae* como inóculos para procesos controlados de fermentación. En las fermentaciones dirigidas debe garantizarse la dominancia del inóculo seleccionado respecto a las especies nativas presentes en el mosto natural. Para ello es necesario alcanzar tasas de inóculo entre $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ ufc/mL (Fugelsang, 1997). Estos valores pueden verse incrementados si las condiciones de los mostos son particularmente restrictivas.

Las fermentaciones espontáneas son cada vez menos frecuentes en la industria del vino debido a las exigencias que el mercado impone en términos de reproducibilidad y trazabilidad del proceso de elaboración. Sin embargo, aún hoy existen bodegas que asumen los riesgos asociados a las fermentaciones espontáneas, con las consecuentes variaciones entre fermentaciones de la misma vendimia y por supuesto entre las de diferentes añadas. La razón de optar por estas fermentaciones naturales se debe a la creencia de que los vinos obtenidos utilizando las levaduras asociadas a los propios viñedos cuentan con un estilo distintivo y un toque de calidad. Parece lógico pensar que un vino obtenido con una mezcla de diferentes levaduras dará como resultado un vino con unas características sensoriales complejas y diferenciadas. Generalmente estos vinos se caracterizan por un aumento en la cantidad de ciertos compuestos que influyen en el aroma (glicerol y otros polioles), producidos por las levaduras indígenas a través de la fermentación gliceropirúvica, que tiene lugar en las fases iniciales de la fermentación (Flanzy, 2003).

Sin embargo, en un proceso de producción de vino a gran escala se debe asegurar que el proceso de fermentación sea seguro y reproducible, de modo que el producto obtenido presente ciertas propiedades organolépticas y un grado de calidad preestablecido. Esto sólo es posible mediante el empleo de levaduras seleccionadas que presenten las características apropiadas para la obtención de un vino de calidad (Pretorius, 2000).

En el proceso de selección de levaduras como iniciadoras de fermentación se deben tener en cuenta, además de unas características fermentativas apropiadas, una total adaptación a las características del mosto, así como a los requerimientos técnicos de la bodega en cuestión (instalaciones, pretratamientos, etc.). La selección de cepas de levadura procedentes de viñedos de la zona permite mantener las cualidades de las fermentaciones espontáneas de la zona, con la seguridad y reproducibilidad que requieren las fermentaciones industriales (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012). Un proceso de selección adecuado no solo garantizará un proceso de fermentación exitoso, si no que contribuirá a la producción de vinos con características sensoriales marcadas y diferenciadas propias de cada región vitivinícola.

SELECCIÓN DE LEVADURAS DE VINIFICACIÓN

El predominio de las especies de *Saccharomyces* y su especial relevancia en el éxito del proceso de vinificación ha provocado que la tecnología de los cultivos iniciadores se desarrollara, en inicio, exclusivamente en torno a estas especies (Degre, 1993). A la hora de innovar en cuanto a nuevas cepas iniciadoras de fermentación existen dos posibilidades: la selección natural de nuevas cepas y la mejora genética de las ya existentes. La selección natural implica la búsqueda de levaduras directamente en las uvas y viñedos, así como en las fermentaciones espontáneas. Lógicamente, posterior al aislamiento, es necesario un proceso de caracterización enológica que asegure un buen comportamiento de cara a su uso (Fleet, 2008).

La otra posibilidad pasa por la ingeniería genética. Ésta permite modificar un microorganismo para mejorar sus propiedades o para eliminar aquellas que pudieran ser perjudiciales (Giudici *et al.* 2005; Pretorius 2000). Sin embargo, la normativa legal en términos del uso de técnicas recombinantes de ADN en la industria alimentaria exige etiquetado. Esto, sumado a la oposición generalizada en los consumidores al consumo de productos producidos por **Organismos Modificados Genéticamente** (OMG) ha determinado la actual escasez de estos organismos en la industria alimentaria y en especial en la del vino (Schuller y Casal, 2005).

Dentro del uso de levaduras seleccionadas, actualmente parece reconocerse que los mejores resultados se obtienen con levaduras autóctonas, es decir, aisladas y seleccionadas de los mostos y vinos de la misma región en la que posteriormente van a ser empleadas (Capece *et al.*, 2010, Lopes *et al.*, 2002). De esta manera, sumamos a las propiedades más apreciadas de las fermentaciones espontáneas, los beneficios del uso de levaduras seleccionadas.

La selección de cepas autóctonas se lleva a cabo analizando un gran número de cultivos puros aislados de fermentaciones espontáneas de mostos de la región vitivinícola correspondiente. Aquellas cepas que, una vez aisladas y usadas como inóculo en fermentación, presenten las mejores características enológicas, podrán ser seleccionadas (Suárez-Lepe, 2007). Estas características, utilizadas como criterios de selección pueden dividirse en tres bloques (Fig. 3).

Propiedades fermentativas	Propiedades tecnológicas	Propiedades sensoriales
Inicio rápido de fermentación	Estabilidad genética	Baja formación de H ₂ S
Alta eficiencia fermentativa	Tolerancia al SO ₂	Baja producción de acidez volátil
Tolerancia al etanol	Escasa producción de acetaldehído	Producción de glicerol
Rendimiento alcohólico moderado	Escasa producción de espuma	Consumo de ácido málico
Rango óptimo de temperatura	Capacidad de floculación	Producción de ésteres volátiles fermentativos
Producción de biomasa moderada	Factor killer	Rotura de precursores glicosídicos y tiólicos
	Escasa demanda de nitrógeno	Facilidad de autólisis (liberación de manoproteínas)

Figura 3. Propiedades valorables como criterios de selección de cepas de levadura con propiedades enológicas óptimas.

Aislamiento de cepas de *S. cerevisiae*

En el proceso de fermentación de los vinos la densidad disminuye conforme los azúcares del mosto se convierten en alcohol etílico. La evolución de los valores de densidad puede relacionarse inversamente con el grado alcohólico que adquiere el vino en la fermentación. Podemos considerar que a partir de valores de concentración

alcohólica de 3-4 % de etanol, aproximadamente, la población de levaduras está fundamentalmente compuesta por *S. cerevisiae* (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012; Pretorius, 2000). La realización de una selección ecológica, a estos tiempos avanzados de fermentación permite obtener aislamientos que, con seguridad, pertenezcan a la especie *S. cerevisiae*. Además, la persistencia o nivel de implantación de las cepas conforme avanza la fermentación es un factor positivo para su selección. Esta es otra ventaja de la selección ecológica a tiempos avanzados de fermentación que garantiza una buena implantación y la persistencia de la cepa en procesos dirigidos de fermentación.

Existen diferencias “intra-viñedo” entre las poblaciones de levaduras que pueden ser aisladas del mosto o vino en fermentación de diferentes parcelas del mismo viñedo. Estas diferencias también han sido encontradas entre fermentaciones de mostos idénticos llevadas a cabo en tanques diferentes (Setati *et al.*, 2012). Por ello, para llevar a cabo un aislamiento significativo de la población de cepas de levaduras, es interesante el estudio de diferentes fincas y fermentaciones de una misma bodega.

Identificación de levaduras a nivel de especie y caracterización intraespecífica de cepas de *S. cerevisiae*

Como se ha comentado anteriormente, la realización de aislamientos a tiempos de fermentación avanzados, cuando la concentración de etanol en el medio es superior al 4%, garantiza en gran medida que esos aislamientos pertenezcan a la especie *S. cerevisiae*. Sin embargo, existen técnicas moleculares que nos permitirían aseverar la especie de dichos aislamientos.

Actualmente, el sistema de identificación de levaduras a nivel de especie que ofrece mayor fiabilidad es la secuenciación de los dominios D1-D2 del ADNr 26S. Se trata de dos cortas regiones próximas al extremo 5' del gen y evolutivamente muy conservadas (Fig. 4). Cuando al secuenciar esta región encontramos una homología igual o superior al 99% con secuencias depositadas en bases de datos (Kurtzman y Robnett, 1998), una levadura puede ser identificada como perteneciente a una especie determinada.

Cabe citarse también el análisis de polimorfismos de restricción de la región 5,8S-ITS (RFLP-5,8-ITS) como método de identificación de levaduras a nivel de especie. Esta técnica consiste en amplificar por PCR la región del ADNr 5.8S-ITS, esto es el gen 5.8S y las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 (Fig. 4). Una vez amplificada esta región, el producto de PCR es digerido con distintas enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos separados por electroforesis en geles de agarosa para determinar su tamaño. Por tanto se estudia el patrón obtenido para cada caso.

Mediante esta técnica y en función de los tamaños obtenidos con cada enzima es posible identificar a nivel de especie un gran número de levaduras diferentes. Para las especies pertenecientes al género *Saccharomyces* el tamaño del amplicón corresponde a 850 pb. Con el objetivo de simplificar el método de identificación, se puede recurrir, únicamente, a tres digestiones con las enzimas de restricción *HaeIII*, *ScrFI* y *Accl* (González *et al.*, 2006).

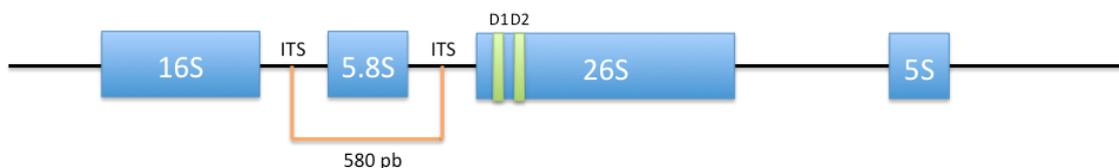


Figura 4. Esquema de la organización típica de los genes ribosomales en levaduras, usados para su identificación a nivel de especie por técnicas de PCR.

Una vez identificada una levadura como perteneciente a la especie *S. cerevisiae* se hace necesaria una técnica que nos permita distinguir los diferentes individuos a nivel de cepa. Entre las técnicas más empleadas pueden destacarse el análisis del polimorfismo de restricción del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt) (Vezinhet *et al.*, 1990; Lopes *et al.*, 2006), el estudio de patrones de amplificación generados por amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) (Williams *et al.*, 1990), la amplificación de elementos interdelta (Legras y Karst 2003) o la amplificación de zonas repetitivas del genoma (microsatélites y minisatélites) (Lieckfeldt *et al.*, 1993).

Caracterización enológica de cepas de levadura vínicas

Una vez identificadas las distintas cepas de levadura *S. cerevisiae* se hace necesario el análisis de sus propiedades fermentativas, así como del resto de características de interés enológico (Suárez-Lepe, 2007). Como ya se comentó anteriormente, podríamos definir tres bloques de propiedades a tener en cuenta: propiedades fermentativas, propiedades tecnológicas y propiedades sensoriales (Fig. 3).

Para la valoración de estos parámetros es necesario llevar a cabo un trabajo, a escala de laboratorio, que permita determinar con rigor las propiedades enológicas de las distintas cepas de levadura estudiadas. Para ello se realizan a cabo [microvinificaciones](#) (fermentaciones a escala de laboratorio) usando mosto de uva como medio de cultivo a diferentes temperaturas de fermentación en función del tipo de vinificación para el que vayan a ser destinadas las levaduras seleccionadas. Para la valoración de otras propiedades tecnológicas o parámetros sensoriales como puedan ser el factor *killer* o la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) es necesario realizar ensayos específicos al margen de las microvinificaciones.

El aislamiento de cepas de fermentaciones espontáneas en bodega garantiza ya la existencia de algunas de esas propiedades, como pueda ser la tolerancia al etanol o la resistencia al SO₂. La realización de un proceso de “selección ecológica” de las levaduras, aislando a éstas exclusivamente de fermentaciones cuyo desarrollo e impresiones finales de cata hayan sido buenas facilitará una desviación del aislamiento hacia cepas que, con mayor probabilidad, presentes buenas propiedades enológicas.

Para la selección de cepas de levadura para su uso como inóculos en procesos de vinificación han de caracterizarse las propiedades fisiológicas con mayor impacto en el desarrollo de las fermentaciones.

- Consumo de azúcares: El agotamiento de los azúcares presentes en el mosto es un criterio imprescindible para la selección de una cepa de levadura vínica. Las levaduras han de ser capaces de consumir en un tiempo razonable los azúcares del mosto, garantizando que el proceso de vinificación llegue a término. Para el estudio del [consumo de azúcares](#) se valoraran las concentraciones de glucosa y fructosa residuales en las microvinificaciones llevadas a cabo por las distintas cepas.
- Rendimiento alcohólico: El [rendimiento alcohólico](#) es una propiedad a tener muy en cuenta para la elección de la levadura que sea adecuada a las particularidades de cada fermentación vínica. Se define el rendimiento alcohólico como el consumo de azúcares (medido en g/l) requerido por una cepa de levadura para la producción de un 1% de alcohol etílico. Así, levaduras con rendimientos alcohólicos bajos requerirán un alto consumo de azúcar para la producción de etanol, siendo idóneas para vendimias muy maduras con un alto contenido en azúcares o en la elaboración de vinos con contenido alcohólico moderado. Por el contrario, las levaduras con un rendimiento alcohólico alto serán las de elección para la fermentación de vendimias con baja concentración de azúcar, ya que serán capaces de producir la cantidad de etanol deseada con menores recursos fermentables.
- Producción de ácido acético: La generación de una excesiva [acidez volátil](#) en procesos de vinificación, compuesta en un 90% por ácido acético, va en detrimento de la calidad organoléptica del producto final, generando vinos con gusto avinagrado. Por ello, se buscan cepas que muestren valores de producción de acidez volátil reducidos (0,2-0,4 g/l).
- Actividad sulfito reductasa: La formación de H₂S en fermentación es el origen de los problemas de reducción en vinos. Su aparición genera problemas en las propiedades organolépticas del producto, confiriendo a éste olores desagradables asociados a huevos podridos. Son las levaduras, fundamentalmente *S. cerevisiae*, las principales responsables de la aparición del H₂S en los vinos (Acree *et al.*, 1972; Giudici y Kunkee, 1994; Jiranek *et al.*, 1995). Por ello, se hace necesaria la búsqueda de cepas que generen cantidades mínimas o nulas de H₂S durante la fermentación.

La valoración de la producción de ácido sulfhídrico puede realizarse por varios métodos. Los más habituales son: la detección en agar Biggy o el uso de acetato de plomo como detector del (H₂S) en el gas de cabeza de fermentaciones en recipientes cerrados (Linderholm *et al.*, 2008)

- Factor *killer*: El [fenotipo killer](#) en una cepa de levadura vínica otorga a ésta una ventaja competitiva en procesos industriales frente a las cepas sensibles de su misma u otras especies. La ausencia de factor *killer* en las levaduras iniciadoras en procesos de fermentación controlados puede poner en peligro la implantación de las mismas durante el proceso de vinificación. Por ello, la

búsqueda de levaduras productoras de toxina *killer*, se suma al resto de parámetros analizados para la selección de levaduras con propiedades enológicas óptimas.

Para la determinación del factor *killer* de las levaduras se realizan pruebas de inhibición del crecimiento de la levadura estudiada frente a una cepa control con fenotipo sensible a la toxina *killer* (Marquina *et al.*, 2002).

- **Metabolismo del nitrógeno:** En el estudio de cepas vínicas de levadura los análisis de parámetros relacionados con el nitrógeno se realizan a modo de control de un correcto metabolismo fermentativo. Niveles bajos de **Nitrógeno Fácilmente Asimilable** (NFA) en los vinos resultantes de la fermentación realizada por una determinada cepa suelen ir ligados a buenos datos de azúcares residuales en el vino (consumo de azúcares). Por el contrario, podemos encontrar valores altos de NFA residual en fermentaciones cuyas levaduras no han sido capaces de agotar el total de azúcares en el mosto (vinificaciones inacabadas) o bien, en fermentaciones en las que ha habido un exceso de lisis celular.

Una excesiva demanda de recursos nitrogenados puede llegar a ser un inconveniente en fermentaciones con mostos pobres en nutrientes obligando al suministro de elevadas cantidades de complementos nutricionales. Por ello, en los procesos de selección se destacan aquellas cepas cuyos consumos de nitrógeno en fermentación son moderados.

- **Metabolismo del ácido málico:** El comportamiento de las distintas cepas de levadura respecto al metabolismo del **ácido málico** es un factor importante a tener en cuenta en un proceso de selección autóctona de levaduras, en función de la situación geográfica de la región vitivinícola en la que éstas vayan a ser utilizadas. Así, en regiones cálidas como pueda ser la gran mayoría de la península ibérica, y en concreto la región de cuyos mostos se han extraído las levaduras de este estudio, la falta de acidez en los vinos es un problema que se traduce en una rápida evolución de los vinos una vez embotellados. Por ello, en este tipo de regiones, la búsqueda de cepas de levadura respetuosas con el contenido inicial en ácido málico del mosto tiene especial interés.

Los ensayos de microvinificación pueden realizarse a diferentes temperaturas de fermentación. Las fermentaciones a 28°C, como temperatura preferente de crecimiento de las levaduras nos permiten conocer las propiedades potenciales de las cepas analizadas. Paralelamente pueden analizarse temperaturas inferiores (16-20°C), como temperatura habitual de fermentación en vinos blancos o rosados para conocer el comportamiento de las cepas aisladas a la temperatura de fermentación en este tipo de vinos.

Una vez caracterizadas estas propiedades enológicas básicas, ha de valorarse la capacidad de las diferentes cepas de levadura *S. cerevisiae* para la liberación de

compuestos aromáticos derivados de su metabolismo. La actividad metabólica de las levaduras tiene una implicación directa en la generación de compuestos odorantes en el vino que determinará el perfil aromático del producto final. De los tres bloques de aromas que podemos identificar en la elaboración de un vino, aromas varietales, aromas fermentativos y aromas terciarios o de envejecimiento, las levaduras tienen relación con los dos primeros. Los aromas varietales son aquellos que proceden de la uva y que en ella se encuentran conjugados en forma no olorosa (glicosilados, unidos a aminoácidos como la cisteína, etc.). La actividad enzimática de las levaduras, tanto *S. cerevisiae* como otras especies de diferente género (*Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, por ejemplo) es responsable de la hidrólisis de estos conjugados permitiendo la liberación de compuestos aromáticos como terpenos, alcoholes o aldehídos.

Para la valoración de la liberación en fermentación de estos compuestos y de los componentes del aroma secundario o fermentativo derivados de la fermentación alcohólica y maloláctica se hace necesario su identificación y cuantificación por métodos de cromatografía de gases. Mediante técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS) es posible valorar el perfil de compuestos volátiles presentes en un vino. Con la aplicación adicional de una técnica de olfatometría (GC/O) sumada a la cromatografía de gases podremos identificar los compuestos de la muestra relevantes para el aroma (Fig. 5).

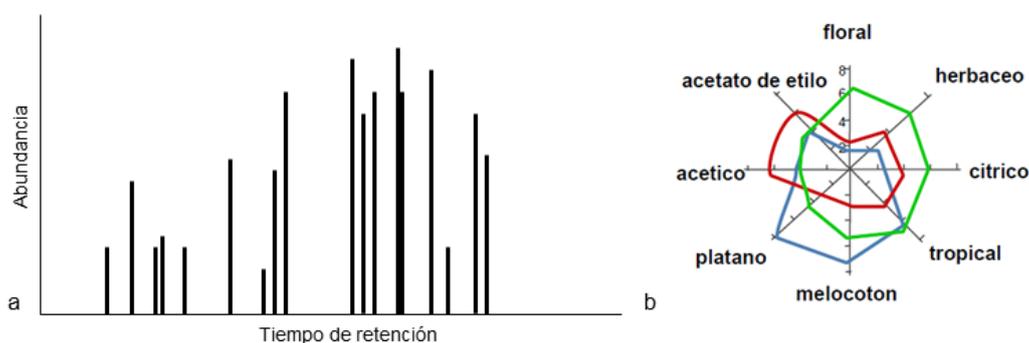


Figura 5. A. Representación gráfica del patrón de compuestos volátiles obtenido por cromatografía GC/MS. B. Diagrama de “araña” en el que se representa la percepción de diferentes compuestos aromáticos volátiles separados por cromatografía de gases y detectados por olfatometría.

Como conclusión, podemos decir que una vez caracterizadas las propiedades enológicas de una amplia variedad de cepas de *S. cerevisiae*, las particularidades de los mostos y vinos de cada bodega determinarán la elección de una u otra cepa, en función de las características distintivas que quiera ofrecer cada enólogo otorgando su toque de distinción al producto que saldrá al mercado. El aislamiento y estudio de cepas de levaduras autóctonas permite sumar a los beneficios del uso de levaduras seleccionadas en términos de seguridad en el desarrollo de la fermentación, las propiedades más apreciadas de las fermentaciones espontáneas de cada región, en las que la microbiota levaduriforme asociada otorgaba a los vinos de cada región características propias genuinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acree, T. E.; Sonoff, E. P. y Splittstoesser, D. F. 1972. Effect of yeast strain and type of sulfur compound on hydrogen sulfide production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 23: 6-9.
- Álvarez-Pérez, J. M. Campo, E.; San-Juan, F.; Coque, J. J.; Ferreira, V. y Hernández-Orte, P. 2012. Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chemistry*, 133: 284-292.
- Capece, A.; Romaniello, R.; Siesto, G.; Pietrafesa, R.; Massari, C.; Poeta, C. y Romano, P. 2010. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 187-192.
- Chambers, P. J. y Pretorius, I. S. 2010. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*, 11: 914-920.
- Degre R. 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*, pp. 421-448. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Flanzy, C. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. Segunda edición. A. Madrid Vicente Ediciones (Madrid, 2003).
- Fleet, G. H. 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8: 979-995.
- Fleet, G. H. y Heard G. M. 1993. Yeast-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*, pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Fugelsang, K. C. *Wine Microbiology*. Chapman and Hall (New York, 1997).
- Giudici, P. y Kunkee, R.E. 1994. The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 107-112.
- Giudici, P.; Solieri, L.; Pulvirenti, .M. y Cassanelli, S. 2005. Strategies and perspectives for Genetic improvement of wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 622-628.
- González, S. S.; Barrio, E.; Gafner J. y Querol, A. 2006. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 6: 1221-1234.

- Henschke, P. A. 1997. Wine yeast. In: Zimmermann, F.K.; Entian, K.D. (Eds.). *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*. pp. 527-560. Technomic Publishing, Lancaster.
- Jiraneek, V.; Langridge, P. y Henschke, P. A. 1995. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 461-467.
- Kurtzman, C. P. y Fell, J. 1998. *The Yeast, A Taxonomic Study*. Cuarta edición Elsevier Science Amsterdam.
- Kurtzman, C. P. y Robnett, C. J.. 1998. Identification and phylogeny of Ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 331-371.
- Lieckfeldt, E.; Meyer, W. y Börner, T. 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, 33: 413-425.
- Linderholm, A. L.; Findleton, C. L.; Kumar, G.; Hong, Y. y Bisson, L. F. 2008. Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1418-1427.
- Lopes, C. A.; van Broock, M.; Querol, A. y Caballero, A. C. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 608-615.
- Lopes, C. A.; Lavalle, T. L.; Querol, A. y Caballero, A. C. 2006. Combined use of killer biotype and mtDNA RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89: 147-56.
- Loscos, N.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J. y Ferreira, V. 2007. Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6674-6684.
- Marquina, D.; Santos, A. y Peinado, J. M. 2002. Biology of killer yeast. *International Microbiology*, 5: 65-71.
- Pretorius I. S.; Van der Westhuizen T. J. y Augustyn O. P. H. 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20: 61-74.
- Pretorius, I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the Ancient art of winemaking. *Yeast*, 16: 675-729.

- Regodón, J. A.; Pérez-Navado, F. y Ramírez, M. 2006. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 151-157.
- Rodríguez, M. E. 2007. *Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas*. Universidad de Cádiz. Cádiz.
- Schuller, D. y Casal, M. 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68: 292-304.
- Setati, M. E.; Jacobson, D.; Andong U. C. y Bauer, F. 2012. The Vineyard Yeast Microbe, a Mixed Model Microbial Map. *PLOS ONE*, 7: doi:10.1371/journal.pone.0052609.
- Suárez-Lepe, J. A. Control Biológico en la fermentación de vinos tintos. Jornada técnica dedicada a analizar el crecimiento y reproducción de levaduras en vinos tintos y a la actividad fermentativa simultánea (Monforte, Galicia. Noviembre, 2007). http://mediorural.xunta.es/fileadmin/arquivos/investigacion/evega/suarez_lepe_monforte.pdf
- Swiegers, J. H.; Bartowsky, P. A.; Henschke, P. A. y Pretorius, I. S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11; 139-173.
- Swiegers, J. H.; Capone, D. L.; Pardon, K. H.; Elsey, G. M.; Sefton, M. A.; Francis, I. L. y Pretorius I. S. 2007. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast*, 24: 561-574.
- Terral, J. F.; Tabard, E.; Bouby, L.; Ivorra, S.; Pastor, T.; Figueiral, I.; Picq, S.; Chevance, J. B.; Jung, C.; Fabre, L.; Tardy, C.; Compan, M.; Bacilieri, R.; Lacombe, T. y This, P. 2010. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105: 443-445.
- Török, T.; Mortimer, R. K.; Romano, P.; Suzzi, G. y Polsinelli, M. 1996. Quest for wine yeast - an old story revisited. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 303-313.
- Ugliano, M.; Bartowsky, E. J.; McCarthy, J.; Moio, L. y Henschke, P. A. 2006. Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6322-6331.
- Veinhet, F.; Blondin, B. y Hallet, J.N. 1990. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32.

Williams, J. G.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.

Recibido: 10 enero 2013.

Aceptado: 17 febrero 2014.