

# ¿ Puede *Saccharomyces cerevisiae* por sí misma marcar diferencias en el grado alcohólico del vino según la cepa empleada ?

## La respuesta es no.

Antonio Palacios<sup>\*y\*\*</sup>; Charlotte Augustin<sup>\*\*\*</sup>; Fabiola Soto<sup>\*\*\*\*</sup>; Françoise Raginel<sup>\*\*\*\*\*</sup>, Anne Ortiz-Julien<sup>\*\*\*\*\*</sup>

\* Lallemand, 26360 Fuenmayor, La Rioja.; \*\* Universidad de la Rioja. Logroño, La Rioja.; \*\*\* Sarco. Bordeaux, France; \*\*\*\* Laffort, Rentería, País Vasco. \*\*\*\*\* Lallemand I&D, Toulouse, Francia.

### Introducción:

Es muy importante tener en cuenta el estado de madurez de la uva a la hora de elaborar vinos de calidad. Es un elemento dependiente de las condiciones climáticas de cada vendimia en particular, lo que puede conducir a veces a desequilibrios entre la madurez técnica (azúcar, acidez y pH), la madurez aromática (acumulación de precursores aromáticos varietales) y la madurez fenólica (grado de polimerización de los compuestos fenólicos, como los taninos). Consecuentemente dependiendo del clima, estos índices de maduración pueden ir avanzando de forma equilibrada y simultánea, lo que condicionaría a una maduración óptima de la uva. Sin embargo, cuando acontecen veranos excesivamente calurosos, el desfase entre madurez azucarada y madurez fenólica puede ser enorme, acumulándose grandes cantidades de azúcar con baja acidez y taninos no suficientemente maduros.

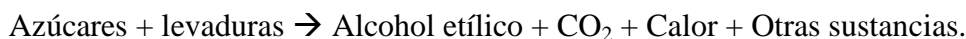
La tendencia actual es conseguir vinos bien maduros y con taninos sabrosos y dulces, lo que obliga a vendimiar las uvas con una madurez azucarada muy avanzada, ya que la madurez fenólica, casi siempre va con retraso respecto a la madurez técnica. Esto provoca que muchas uvas de la masa total de la vendimia estén sobre maduras y en algunos casos pasificadas, lo que se traduce posteriormente en aromas de fruta cocida o aromas demasiado dulces y empalagosos. O por el contrario, si atendemos principalmente a la madurez técnica, puede darse el caso de vendimias todavía verdes en su composición fenólica, pero con suficiente azúcar y acidez, con lo que se obtendría un vino con aromas herbáceos y vegetales, además de revelarse los taninos como ácidos y agresivos en boca por su falta de madurez. Además, los cambios climáticos y la mejora de las prácticas en la viticultura moderna, participan en la misma tendencia de producción de vinos con grados alcohólicos más elevados. Por otra parte, la riqueza en alcohol de los vinos plantea problemas sociales y de marketing. Los hábitos de consumo cambian debido a la evolución en los estilos de vida. Los consumidores también demandan vinos hedónicos, redondos y con texturas suaves.

Es necesario entonces disponer de herramientas enológicas que permitan fermentar uvas con buena madurez fenólica y que aporten una menor graduación alcohólica. ¿Son entonces las levaduras seleccionadas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* por sí mismas una de éstas herramientas?. Vamos entonces a intentar responder a esta pregunta.

### **El metabolismo de la fermentación alcohólica:**

La fermentación alcohólica es el proceso por el que los azúcares contenidos en el mosto se convierten en alcohol etílico. Para llevar a cabo este proceso es necesaria la presencia de levaduras. En la actualidad, el uso de levaduras comerciales en forma de Levadura Seca Activa (LSA) es una práctica habitual cada vez más utilizada en bodega para la elaboración de vinos de calidad.

El proceso simplificado de la fermentación alcohólica es el siguiente:



Los rendimientos moleculares de la reacción son:



Donde 1 gramo de glucosa genera 0,51 gramos de etanol y 0,49 gramos de carbónico.

A parte del etanol y el carbónico, también se forman otras sustancias generadas en la fermentación alcohólica, estas son: glicerol, ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, acetaldehído, ácido succínico, acetoína, diacetilo, 2-3 butanodiol (butilenglicol), alcoholes superiores, ésteres, acetatos, vinil-fenoles y etil-fenoles principalmente.

### **Productos del metabolismo de los azúcares por la levadura:**

De forma resumida, se presentan a continuación los productos principales y los subproductos que se generan cuando se transforma el azúcar del mosto y otros componentes al ser metabolizados por las levaduras fermentativas:

- **Etanol**: El etanol representa el producto principal de la fermentación alcohólica. Es corriente admitir que un grado de etanol (1% vol.) en fermentación alcohólica representa un consumo comprendido entre 16,5 y 17 gramos por litro de azúcares reductores (glucosa o fructosa) dependiendo de las condiciones.
- **Carbónico**: representa el segundo producto principal de la fermentación alcohólica. Según las cepas utilizadas en condiciones enológicas, se puede considerar un rendimiento medio de 0,4 a 0,5 gramos de CO<sub>2</sub> por gramo de azúcares fermentados.
- **Glicerol**: Las concentraciones finales en condiciones enológicas de glicerol, varían de 5 a 11 g/L según la cepa de levadura. La producción de glicerol sirve a *Saccharomyces cerevisiae* para hacer frente a las fuertes presiones osmóticas, abandonando la célula posteriormente por difusión pasiva a través de la membrana.
- **Ácidos orgánicos**: desde la fermentación alcohólica se forman ácidos orgánicos que pueden ser liberados al medio. Una gran parte de ellos derivan por un funcionamiento limitado del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El ácido

succínico representa, como el glicerol, uno de los subproductos mayoritarios de la fermentación alcohólica.

- **Alcoholes superiores y ácidos cetónicos**: La mayor parte de estos compuestos derivan de los aminoácidos asimilados durante la fermentación alcohólica. El grupo amino es eliminado por transaminación y el ácido cetónico es enseguida descarboxilado para convertirse en un aldehído, conduciendo a la formación de un alcohol superior que posee un carbono menos que el aminoácido de origen.
- **Ésteres**: son producidos por reacciones enzimáticas donde entra en juego los derivados acil grasos del Coenzima A y los alcoholes libres.
- **Acetoína, 2,3-butanodiol y diacetilo**: La acetoína es un compuesto originado durante la fermentación alcohólica y se forma en condiciones muy reductoras, transformándose finalmente en butanodiol.
- **Crecimiento y biomasa**: durante la fase de crecimiento exponencial, las levaduras se multiplican durante 6 ó 7 generaciones, generando una población máxima de  $120-130 \times 10^6$  células por mililitro. Esta biomasa solo representa 3 gramos de peso seco por litro.

#### **Datos bibliográficos disponibles:**

Respecto a la bibliografía existente en relación al tema tratado, podemos citar un trabajo de Rankine publicado en 1953 en la revista Australian Journal of Applied Science, “quantitative differences in products of fermentation”, donde se sostiene que pueden existir diferencias en el rendimiento en alcohol dependiendo de las cepas, pero estas diferencias son mucho menos importantes que los efectos externos dependiendo de las condiciones de fermentación empleadas en bodega. La temperatura, por ejemplo, puede hacer variar hasta un 70% el ratio de una cepa, igualmente la concentración inicial de azúcar, aunque en menor medida. De la misma forma que la producción de acidez volátil es igualmente dependiente de la temperatura, así como la producción de glicerol depende de la concentración de azúcar.

Radler y Schütz en 1982 realizan un estudio de la producción de glicerol por varias cepas del género *Saccharomyces*. Este trabajo fué publicado en la revista American Journal of Enology and Viticulture, donde se constató que existía una correlación entre el glicerol producido y la concentración en azúcar, pero una vez más, este fenómeno era mucho menos dependiente de la cepa de levadura que de las condiciones externas de vinificación aplicadas en bodega.

Bertolini *et al.*, en 1996 publican un trabajo acerca de la producción de alcohol por cepas de levaduras criotolerantes del género *Saccharomyces*, confirmando el hecho que las cepas criotolerantes del género *Saccharomyces (ex-uvarum)*, verdaderas *Bayanus* en la actualidad, producen menos alcohol, pero resulta muy poco significativo las diferencias cuantificadas en etanol. Además, éstas cepas tienen una capacidad fermentativa muy baja y han sido retiradas del mercado.

Millan y Ortega publican en 1988 un trabajo que hace referencia a la producción de etanol por cepas non-*Saccharomyces* (*Torulaspóra delbuckii*) con un rendimiento azúcar/etanol aparentemente inferior a levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. De este trabajo se concluye que es posible disminuir globalmente el rendimiento en etanol gestionado por esta especie en la fase prefermentativa, aunque esto puede acarrear algunos problemas en términos del desarrollo de poblaciones de levaduras fermentativas, nutrición, colonización y posibles desviaciones organolápticas.

Souza Oliveira *et al.* publicaron en 2004 un estudio de criterios de selección de levaduras para la obtención de cachaza en la revista World Journal of Microbiology & Biotechnology, donde probaron 24 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en comparación con otras especies diferentes (*Candida apicola*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *Hanseniospora occidentalis*, *Pichia subpelliculosa* y *Schizosaccharomyces pombe*). La producción de etanol por parte de las levaduras era uno de los criterios importantes de selección tenidos en cuenta. La gran mayoría de levaduras pertenecientes a *S. cerevisiae* mostraron los mismos rendimientos en alcohol (próximos a un rendimiento alto de 91,7%), mientras que los géneros *Candida*, *Hanseniospora* y *Schizosaccharomyces* mostraron capacidad mucho más baja en el rendimiento de etanol, produciendo contenidos más altos de glicerol y ácidos orgánicos.

### **Parte experimental:**

El principal objetivo del estudio es saber si existen posibles diferencias en la obtención de alcohol durante la fermentación de mostos inoculando levaduras seleccionadas comerciales disponibles en el mercado.

Para verificar los rendimientos en alcohol de las levaduras seleccionadas comerciales, se han realizado microvinificaciones en un volumen de 1,1 L, fermentando en dos condiciones diferentes (simulación de vinificación en blanco y en tinto). En este trabajo se han utilizado levaduras procedentes de los 6 principales productores de levadura seca activa (LSA) a nivel mundial. Se han comparado 65 cepas diferentes de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en simulación de vinificación en tinto y 61 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en simulación de vinificación en blanco, haciendo un total de 113 cepas diferentes.

En ambas opciones se emplearon las levaduras según las recomendaciones de los productores. Utilizándose en condiciones de vinificación en blanco o en tinto según los criterios utilizados en la selección de las cepas y los criterios de aplicación de las fichas técnicas. Existen 12 cepas que se emplearon tanto en blanco como en tinto, ya que las recomendaciones de usos coincidían en ambas aplicaciones. Por esta razón, se han estudiado en total 115 cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente diferentes, que pueden representar más del 95% de las levaduras seleccionadas utilizadas en la industria enológica.

Las condiciones experimentales fueron realizadas en los laboratorios de I+D y control de calidad de Lallemand en Toulouse, Francia, siguiendo dos tipos de protocolos:

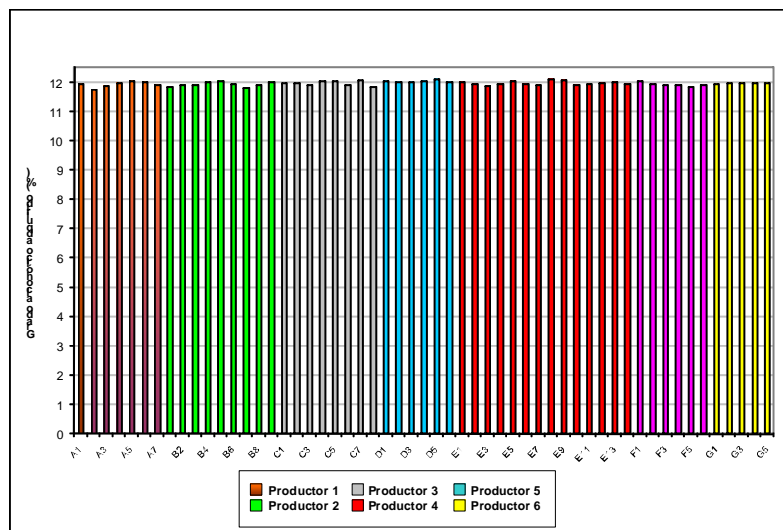
- Simulación de vinificación en blanco: Medio sintético MS300 (Bely *et al.*, 1991) con 200 g/L de azúcares iniciales, con un grado alcohólico potencial de 12° v/v, sin factores de crecimiento anaeróbicos para simular las condiciones en mostos muy clarificados y sin deficiencias en nitrógeno asimilable (400 mg/L de NFA). La temperatura de fermentación fue de 15°C.

- Simulación de vinificación en tinto: Medio sintético MS300 con 280 g/L de azúcar iniciales, con un grado alcohólico potencial superior a 16° v/v, sin deficiencias en nitrógeno asimilable (400 mg/L de NFA). Temperatura de fermentación de 28°C.

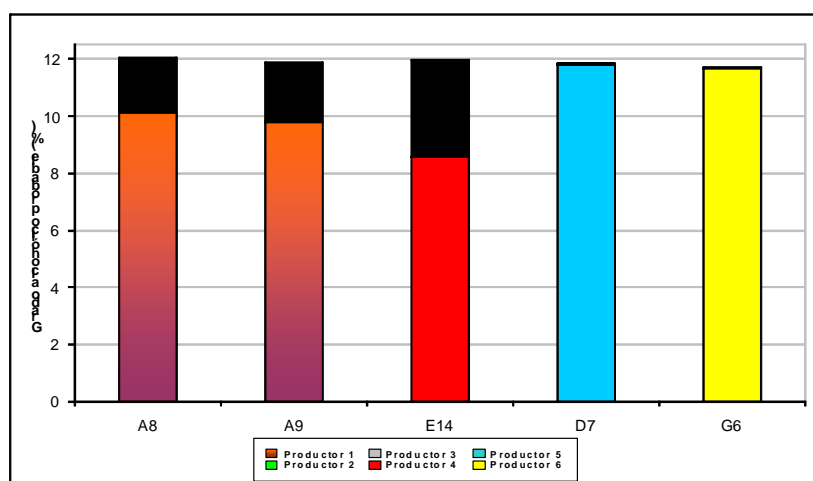
El grado alcohólico de los vinos obtenidos fue medido por infra-rojo (IR-INFRA 260, Bram/Luebbe), y los contenidos finales en azúcar residual (Glucosa y fructosa) por metodología enzimática.

Los resultados de graduación alcohólica obtenidos en los experimentos de vinificación en blanco (gráficos 1 y 2) muestran que 56 cepas fueron capaces de fermentar todos los azúcares, dejando el vino completamente seco. En este caso, la diferencia final de grado alcohólico mayor fue de 11,75 a 12,09° v/v, o sea de 0,34° v/v. En los resultados de vinificación en tinto (gráficos 3 y 4), debido a la alta concentración en azúcares inicial, hay cepas de levadura que no fueron capaces de fermentar completamente hasta el final. El valor mínimo en graduación alcohólica es de 16,55° v/v y el máximo 17,06° v/v, con una diferencia entre ellos de 0,51° v/v.

**Figura 1:** resultados de la graduación alcohólica (% v/v) de 56 cepas de levaduras seleccionadas *Saccharomyces cerevisiae* en vinificación en blanco que fueron capaces de fermentar todos los azúcares.

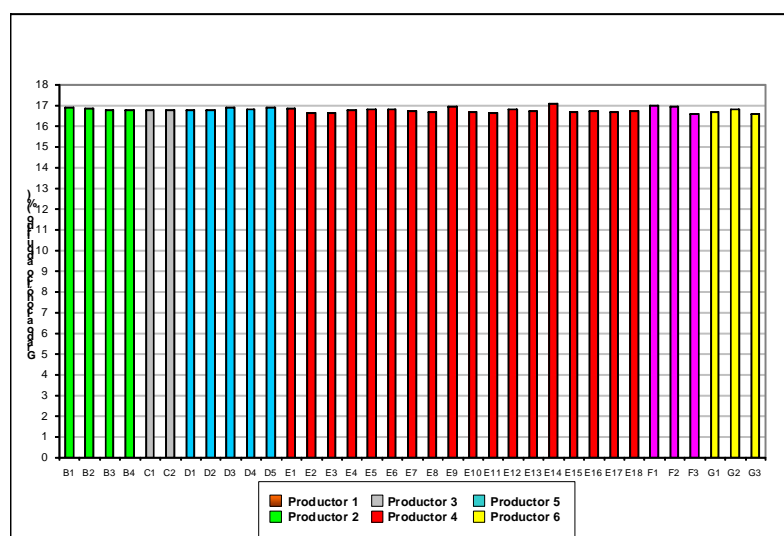


**Figura 2:** resultados de la graduación alcohólica (% v/v) de 5 cepas de levaduras seleccionadas *Saccharomyces cerevisiae* en vinificación en blanco que no fueron capaces de fermentar todos los azúcares (en negro se representa los grados potenciales en alcohol según el azúcar no fermentado).

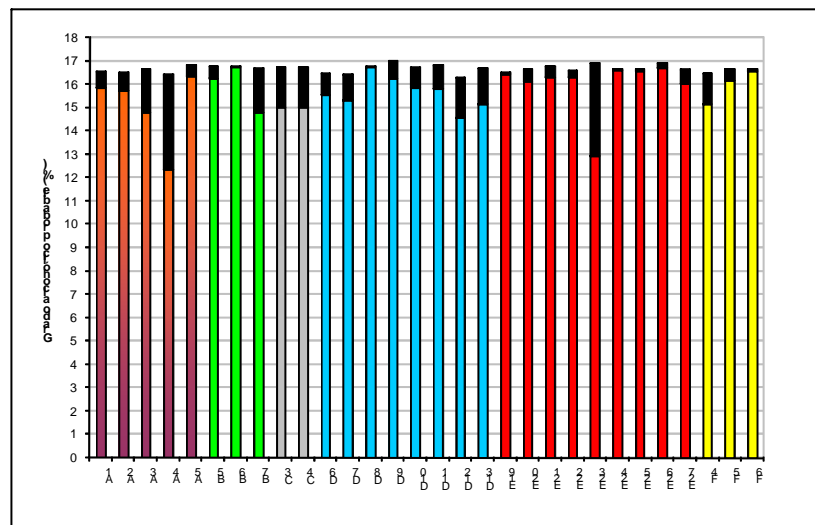


Las diferencias en graduación alcohólica pueden deberse más al margen de error del método analítico empleado para medir el etanol y los azúcares, que a las posibles diferencias entre rendimiento alcohólico de las diferentes cepas empleadas, que representan casi la totalidad de las existentes en el mercado de levaduras seleccionadas a nivel mundial. De hecho, en el método analítico empleado, el error máximo adyacente al método es de  $\pm 0,2^\circ$  v/v, o sea, hay un rango de  $0,4^\circ$  v/v, que son casi las diferencias encontradas entre las graduaciones alcohólicas finales de los vinos secos y entre el alcohol potencial final cuando se toman en cuenta los azúcares que quedaron sin fermentar, en los casos de fermentaciones no finalizadas, más los ya fermentados.

**Figura 3:** resultados de la graduación alcohólica (% v/v) de 35 cepas de levaduras seleccionadas *Saccharomyces cerevisiae* en vinificación en tinto que fueron capaces de fermentar todos los azúcares.



**Figura 4:** resultados de la graduación alcohólica (% v/v) de 30 cepas de levaduras seleccionadas *Saccharomyces cerevisiae* en vinificación en tinto que no fueron capaces de fermentar todos los azúcares (en negro se representa los grados potenciales en etanol según el azúcar no fermentado).



### **Discusión de los resultados, conclusiones y otras vías biológicas de interés:**

En el presente estudio se ha realizado la caracterización del rendimiento alcohólico de casi la totalidad de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* comerciales, procedentes de los principales productores de levaduras seleccionadas en forma de levadura seca activa (LSA) a nivel mundial. La parte experimental permite concluir que dicha especie no puede por sí misma, obtener graduaciones alcohólicas significativamente menores del grado potencial medio definido por la concentración azucarada inicial. Tampoco a partir de altas concentraciones iniciales de azúcares, como ilustran perfectamente las condiciones de vinificación en tinto del presente trabajo.

Debido a que la especie *Saccharomyces cerevisiae* no ofrece entonces diferencias significativas para la obtención de grados alcohólicos bajos mediante vía biológica, es necesario explorar otras vías biológicas para dicho fin. Lamentablemente, por el momento no están disponibles en el mercado, pero están siendo investigadas con prometedores avances aplicables en un futuro próximo. Entre otras, éstas pueden ser las más importantes:

- Utilización de levaduras no *Saccharomyces* de bajo rendimiento alcohólico
- Obtención de levaduras con bajo rendimiento en alcohol mediante hibridación.
- Obtención de levaduras con bajo rendimiento en alcohol mediante mutación y selección de mutantes.
- Obtención de levaduras con bajo rendimiento en alcohol mediante ingeniería genética (GMO).
- Obtención de levaduras con bajo rendimiento en alcohol mediante la utilización de inhibidores metabólicos.

### **Bibliografía:**

- Becker y Betz; (1972): Membrane transport as controlling pace-maker of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys Acta, N° 274, 584-597.
- Bely M.; Sablayrolles J.M. y Barre P.; (1991). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. J. Ferm. Bioeng. N° 70, 246-252.
- Bertolini L.; Zambonelli L.; Giudici P. y Castellari L.; (1996). Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. American Journal of Enology and Viticulture. Vol 47, N° 3, 343-345.
- Chuang L.F. y Collins E.B.; (1968). Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeasts. J. Bacteriol. N° 95, 2083-2089.
- Geiger E. y Piendl A.; (1975). Technological factors in the formation of acetolactate and acetohydroxybutyrate during fermentation. Brew Dig. N° 67, 50-63.
- Millan C. y Ortega J.M.; (1988). Production of ethanol, acetaldehyde, and acetic acid in wine by various yeast races: role of alcohol and aldehyde dehydrogenase. American Journal of Enology and Viticulture, Vol 39, N° 2, 107-112.
- Pena A., Cinco G., Gomez-Puyon A. y Tuena M.; (1972). Effect of pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem: Biophys. N° 153, 413-425:
- Radler F. y Schütz H.; (1982). Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. American Journal of Enology and Viticulture. Vol 33, N° 1, 36-40.
- Rankine B.C.; (1953). Quantitative differences in products of fermentation. Australian Journal of Applied Science. N° 4, 590-602.
- Ribéreau-Gayon J. y Peynaud E.; (1956). Investigations on the origin of secondary products of alcoholic fermentation. American American Journal of Enology and Viticulture. N° 7, 53-61.
- Rieger M. y Kapelli O.A.; (1983). The role of limited respiration in the incomplete oxydation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., N° 129, 53-61.
- Souza Oliveira, E.; Rosa, C.A.; Morgano, M.A. y Serra, E.; (2004). Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. World Journal of Microbiology & Biotechnoly, N° 20, 19-24.