

FERMENTACIÓN CONTROLADA MEDIANTE LA INOCULACIÓN SECUENCIAL DE UNA LEVADURA NO-SACCHAROMYCES Y DE UNA LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE, UNA HERRAMIENTA INNOVADORA PARA EL ENÓLOGO.

Céline RAYNAL¹, Forbes WARDROP², Olivier PILLET¹, Perrine LANGUET¹, José Maria HERAS³, Ann DUMONT² y Anne ORTIZ-JULIEN¹

¹ Lallemand SAS, 19, rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, Francia

² Lallemand Inc., 1620, rue Préfontaine, Montréal, H1W 2N8, Canadá

³ Lallemand Península Ibérica, C/Zurbano 71, Oficina 6, 28010 Madrid, España

1. Introducción

En el pasado, la fermentación era llevada a cabo por las levaduras salvajes presentes en la bodega, por ello la transformación de los azúcares en alcohol y la producción de compuestos aromáticos tenía lugar al azar, como resultado de un proceso aleatorio. Desviaciones aromáticas como el picado láctico, o problemas relacionados con el desarrollo de la fermentación eran frecuentes. La utilización de levaduras seleccionadas producidas en forma seca ha ido cambiando de forma gradual el control y la fiabilidad de las fermentaciones.

El estudio comparativo entre la ecología de las levaduras de las bodegas y del viñedo muestra claramente que las levaduras presentes en las uvas están sometidas a fenómenos naturales (maduración de la uva, variaciones meteorológicas), a la intervención del hombre y a los tratamientos fitosanitarios efectuados (Guerra *et al.*, 1999; Cabras y Angioni, 2000). También demuestra que las levaduras indígenas residuales no son las más adecuadas para la realización de la fermentación alcohólica. La utilización de inóculos seleccionados de *Saccharomyces* permite reducir las variaciones debidas al desarrollo de las poblaciones indígenas no controladas y asegurar un buen desarrollo de la fermentación alcohólica. Esto se traduce en una mejora de la calidad general de los vinos, al mismo tiempo que responde a exigencias tan actuales como la trazabilidad (Loiseau *et al.*, 1987) y la coherencia de los procesos de producción (Fleet *et al.*, 1993; Lambrechts y Pretorius, 2000).

Pero es importante considerar también la diversidad de la microflora de levaduras presente en los viñedos (Davenport, 1974, Mortimer y Polsinelli, 1999), en los mostos (Heard y Fleet, 1986; Ganga y Martinez, 2004; Torija *et al.*, 2001, Hierro *et al.*, 2006) así como durante las primeras fases de la vinificación (Zott *et al.*, 2008). La intervención de estos microorganismos de especies no-*saccharomyces* durante la fermentación alcohólica ha sido descrita en bibliografía (Ciani, 1997; Egli *et al.*, 1998; Soden *et al.*, 2000).

Durante la vinificación, es posible tomar ventaja de la diversidad cuantitativa y cualitativa de los productos o sub-productos de fermentación producidos por las levaduras no-*Saccharomyces* (Ciani y Ferraro, 1998; Ciani *et al.*, 1996; Ferraro *et al.*, 2000). Gracias a esta biodiversidad, el enólogo puede diferenciar aun más su vino revelando el potencial aromático de los mostos, tanto a nivel de intensidad como de complejidad (Egli *et al.*, 1998, Romano *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2009), pero sin perder las ventajas que ofrece el control mediante la adición de levaduras. Algunas levaduras no-*Saccharomyces*, a la luz de los nuevos resultados científicos, presentan hoy en día interesantes características para las condiciones actuales en la elaboración de vinos de calidad. Nuestras investigaciones sobre el

potencial aromático de las levaduras no-*Saccharomyces*, junto con la optimización de la producción de estas levaduras en forma seca, permiten hoy en día al enólogo reproducir de manera controlada la sucesión natural de especies que ocurren en una fermentación espontánea.

Estas nuevas herramientas combinan biodiversidad, seguridad y ventajas cualitativas.

2. Producción de un inóculo de *Torulaspora delbrueckii* de elevada viabilidad y vitalidad

2.1 ¿INTERÉS DE LA ESPECIE *TORULASPORA DELBRUECKII*?

Dentro de la biodiversidad natural presente sobre la uva y de los ecosistemas fermentativos, algunas especies han sido estudiadas de forma más específica a nivel de las fermentaciones enológicas por sus apreciados aportes organolépticos. Entre ellas podemos citar los géneros *Torulaspora*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* y otros (Belancic *et al.*, 2003; Ciani 1997; Ciani y Ferraro, 1998; Egli *et al.*, 1998; Mora *et al.*, 1990; Rosi *et al.*, 1994). *Torulaspora delbrueckii* ha demostrado ser interesante no sólo por revelar la tipicidad sensorial, sino también por la pureza de su perfil fermentativo (Ciani y Picciotti, 1995; Martínez *et al.*, 1990; Mauricio *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1991) y por su capacidad para corregir algunos defectos de los vinos como la acidez volátil (Languet *et al.*, 2005; Bely *et al.*, 2008). En la naturaleza la variabilidad es la norma, ya sea inter o intra especies (Renault *et al.*, 2009); la decisión de trabajar con una cepa de *Torulaspora delbrueckii* en particular fue tomada en colaboración con el INRA (Institut National de Recherche Agronomique, France), tras la realización de vinificaciones, seguimiento de la población de levaduras y análisis sensorial respetando todas las normas AFNOR (Association Française de Normalisation). (Languet *et al.*, 2005).

2.2 NIVEL DE SUPERVIVENCIA, CAPACIDAD DE MULTIPLICACIÓN Y PUREZA FERMENTATIVA DE *TORULASPORA DELBRUECKII*.

Se aplicaron diferentes estrategias para la producción de levaduras secas activas de la cepa Lallemant de *Torulaspora delbrueckii*, cepa 291 con el fin de aumentar el nivel de supervivencia en condiciones enológicas difíciles y amplificar su capacidad de multiplicación para que estas levaduras pudiesen implantarse en los mostos de uva.

En este ejemplo, se estudiaron las levaduras de *T. Delbrueckii* 291 resultantes de diferentes producciones y codificadas como "LSA TD1" y "LSA TD2" utilizando un mosto de uva de la variedad Viognier, cuyos análisis se presentan en la tabla 1. Este mosto presentaba una turbidez baja y contenía por tanto unas concentraciones mínimas de micronutrientes y de factores de supervivencia. Es decir, este mosto natural era un medio hostil para las levaduras no-*Saccharomyces* y para las levaduras en general. La temperatura de fermentación aplicada en estas fermentaciones fue de 20 °C.

A fin de poder comparar las capacidades de supervivencia de los inóculos no-*Saccharomyces*, se utilizó en paralelo una levadura seleccionada de *Saccharomyces cerevisiae* reconocida internacionalmente para su uso en vinificaciones en blanco; además, esta levadura testigo había sido producida según el proceso YSEO® (Yeast Security Optimization) y por tanto

presentaba las ventajas de los últimos avances en términos de proceso de producción; este inóculo fue codificado como "LSA SCYSEO®".

Azúcares g/L	Turbidez NTU	Nitrógeno asimilable mg/L	pH	Ac. tot. H ₂ SO ₄ g/L
215	42	150	3,65	2,50

TABLA 1. Análisis estándar del mosto de Viognier utilizado.

Las viabilidades de estos tres inóculos se presentan en la tabla 2. Hay que recordar que la viabilidad mínima que garantiza una fermentación segura es de 1×10^{10} ufc/g de levadura seca activa (LSA), por tanto todos los inóculos utilizados cumplían ampliamente estas normas de calidad.

LSA	LSA TD1	LSA TD2	LSA SCYSEO®
Viabilidad ufc/g	4×10^{10}	2×10^{10}	2×10^{10}

TABLA 2. Viabilidad de los diferentes inóculos.

El control de la viabilidad de las levaduras inoculadas y el recuento se efectuó 50 h después de alcanzar la velocidad máxima de fermentación (V_{max}). El recuento de las levaduras se realizó mediante siembra en un medio de agar Sabouraud adicionado con 0,055 g/l de azul de metileno para permitir la diferenciación morfológica. Este método fue previamente verificado y validado mediante análisis genético. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 1. Al mismo tiempo, se comparó la capacidad de multiplicación de los inóculos TD1 y TD2 o “vitalidad”. Los resultados se presentan en la figura 2. La fiabilidad del proceso para controlar la higiene de los vinos obtenidos se presenta en la tabla 3 que muestra los análisis estándares de los vinos obtenidos.

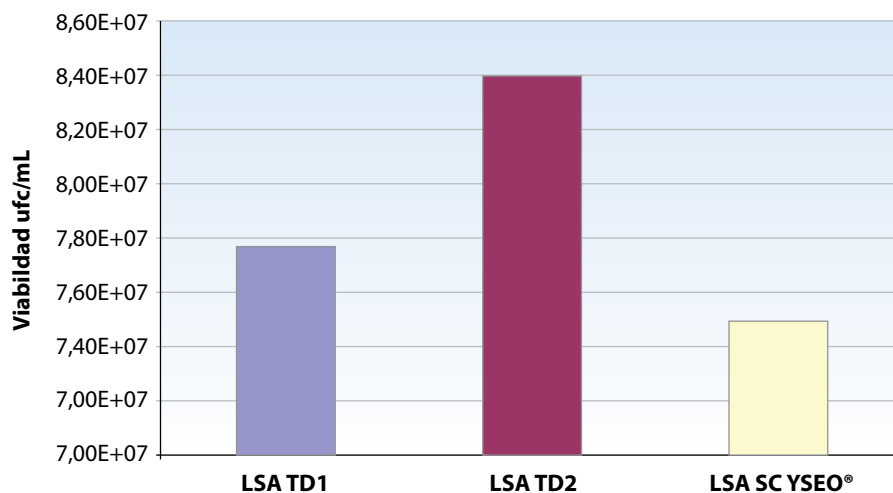


FIGURA 1. Viabilidad en el mosto ya en fermentación de los diferentes inóculos no-*Saccharomyces* y de una levadura *Saccharomyces* en función del proceso de producción aplicado.

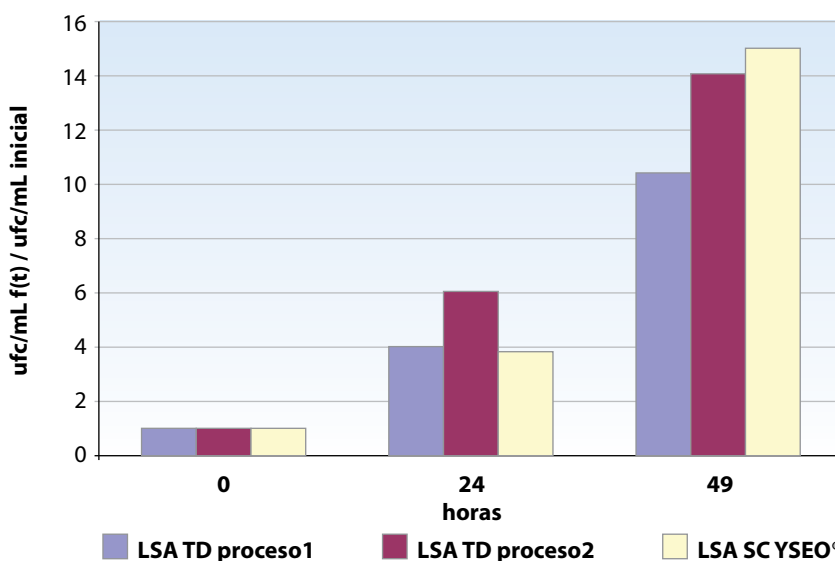


FIGURA 2. Vitalidad o capacidad de multiplicación de los diferentes inóculos, en función de los procesos de producción aplicados, durante las primeras 50 horas de fermentación

	GAV % vol	Gluc-fruct g/L	SO₂ tot mg/L	SO₂ libre mg/L	Ac. Volátil H₂SO₄ g/L	Ac. tot. H₂SO₄ g/L	pH
TD1, luego SC YSEO® en inoculación secuencial	12,72	0.0	14	6	0,17	2,50	3,73
TD2, luego SC YSEO® en inoculación secuencial	12,72	0.0	14	6	0,12	2.60	3,73
SC YSEO®	12,83	0.0	16	8	0,23	3,10	3,63

TABLA 3. Análisis estándar de los vinos Viognier.

Los resultados demuestran que según el proceso de producción aplicado a una misma cepa de levadura, tanto la viabilidad durante la inoculación como las capacidades de multiplicación o vitalidad pueden ser controladas. La LSA TD2 aparece como el producto más eficiente a nivel de vitalidad y viabilidad en comparación con LSA TD1. La independencia de *Torulaspota delbrueckii* 291 con respecto a las carencias de micronutrientes, es decir de esteroides debido a la baja turbidez, también es visible.

La viabilidad es importante para llevar a cabo una presión ecológica sobre las levaduras indígenas y permitir la implantación, pero la capacidad de multiplicación también es fundamental, ya que es durante la fase de multiplicación cuando las levaduras sintetizan los principales aromas fermentativos. Además, se ha demostrado que para contribuir al perfil sensorial de los vinos las levaduras no-*Saccharomyces* deben alcanzar una población importante, de alrededor de 10^6 - 10^7 células por mililitro (Heard y Fleet, 1986).

Nuestras adaptaciones de los procesos de producción permiten hoy en día producir levaduras no-*Saccharomyces* que responden a las exigencias de viabilidad y vitalidad de forma tan fiable como las levaduras secas activas de *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Estrategia de utilización de *Torulaspota delbrueckii* 291 en inoculación secuencial

Es comúnmente aceptado que la utilización de una levadura no-*Saccharomyces* en monocultivo no permite un acabado correcto y seguro de la fermentación (azúcares residuales < 2 g/l) con una duración de la fermentación que sea compatible con las exigencias de las actuales producciones vitivinícolas, garantizando al mismo tiempo la ausencia de defectos organolépticos. En condiciones enológicas, estas especies tienen una capacidad fermentativa limitada comparadas con las levaduras *Saccharomyces*, debido especialmente a su baja capacidad de multiplicación y a sus específicas necesidades de micronutrientes y de oxígeno (Mauricio *et al.*, 1991; Hansen *et al.*, 2001). A su vez, la levadura *Saccharomyces*, debido a su extremada adaptabilidad a las condiciones hostiles, es capaz de crecer y superar a las levaduras indígenas no-*Saccharomyces* (Fleet, 1993). Aunque ya había sido ampliamente descrito cómo la sucesión de poblaciones de levaduras, con una alternancia del predominio de levaduras no-*Saccharomyces* en la primera fase de la fermentación alcohólica y luego de

Saccharomyces, es fundamental para la complejidad aromática de los vinos (Zironi *et al.*, 1993, Ferraro *et al.*, 2000), quisimos validar esta teoría a través de un trabajo previo (Languet *et al.*, 2005). En el mismo se demostró que la sucesión de poblaciones de levaduras con esta cepa de *Torulaspota delbrueckii* 291 es necesaria para la obtención de un perfil sensorial más complejo. El resultado es una inoculación secuencial que evita que se produzca una competición entre las cualidades fermentativas y organolépticas de cada una de las especies.

Los primeros ensayos consistieron en optimizar la pareja de levaduras. Junto con la cepa *Torulaspota delbrueckii* 291 se estudiaron varias levaduras *Saccharomyces* en inoculación secuencial, utilizando diversas variedades de uva y en diferentes condiciones de fermentación. Entre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas en función de su correspondencia a unos criterios determinados, sólo una cepa mostró ser compatible con la cepa *T. delbrueckii* 291 a fin de obtener unos vinos con un perfil aromático distinto.

3.1 DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN SECUENCIAL.

Se utilizó un mosto sintético codificado como “MS300-FA-O2 GF”, que presentaba una carencia extrema de factores de supervivencia de tipo esteroides y un contenido de glucosa-fructosa de 200g/L. Además, fue inertizado mediante burbujeo directo con ALIGAL™ antes de la siembra del inóculo con LSA *T.delbrueckii* 291 y del inóculo testigo de *Saccharomyces* “LSA SC”, de forma que no había oxígeno disuelto en el mosto. Las condiciones de fermentación por tanto eran extremas y permitieron evaluar si la inoculación secuencial con las levaduras secas activas de *Torulasporea* y de *Saccharomyces* era compatible con este tipo de situación.

En vista de estas condiciones particulares, durante la rehidratación de las levaduras secas activas y siguiendo las recomendaciones del productor se utilizó un protector de levadura (Goferm Protect®).

Las velocidades de fermentación obtenidas con las dos modalidades en función del tiempo se presentan en la figura 3. El análisis estándar de los vinos obtenidos se ilustra en la tabla 4.

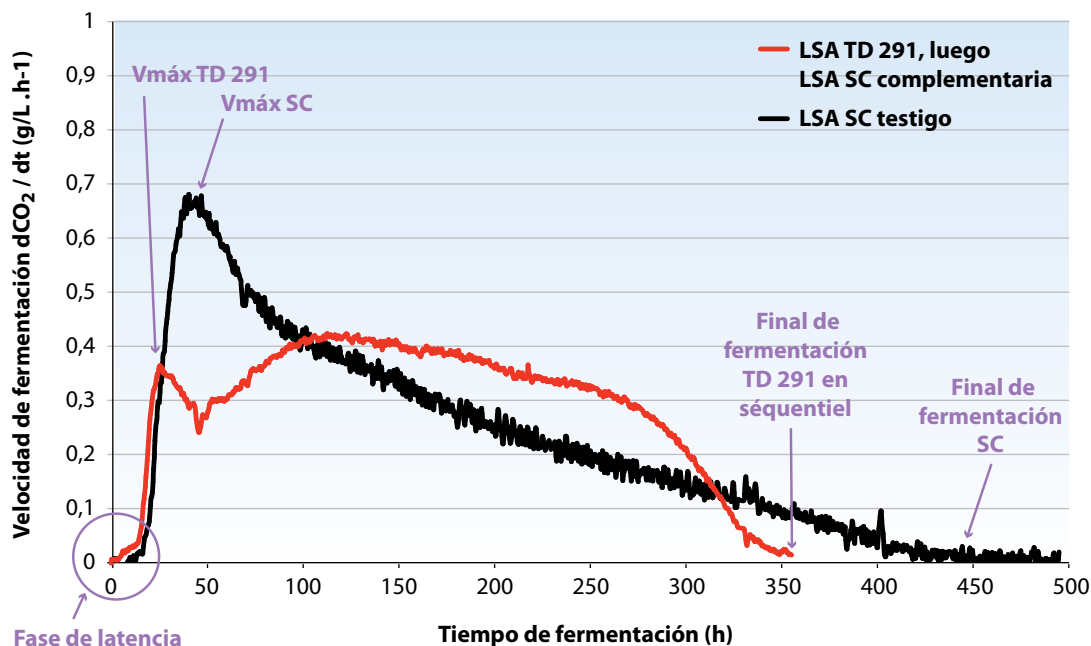


FIGURA3. Cinética de fermentación de la inoculación secuencial y de la inoculación clásica en un mosto con carencias.

Las cinéticas de fermentación obtenidas (Figura 3) muestran que la fase de latencia es extremadamente corta, tanto para la fermentación inoculada con LSA TD291 como para la fermentación testigo sembrada con LSA SC. La velocidad de fermentación máxima (V_{máx}) es menos importante en el caso de la modalidad “inoculación secuencial”, pero en la fase estacionaria la velocidad es prácticamente constante. El final de la fermentación es más rápido que el del testigo. La ausencia de un pico de fermentación durante la utilización de la inoculación secuencial permite también evitar un aumento térmico, a menudo asociado a la fermentación alcohólica.

	GAV % vol	Gluc-fruct g/L	SO ₂ tot mg/L	SO ₂ libre mg/L	Ac. Volátil H ₂ SO ₄ g/L	Ac. tot. H ₂ SO ₄ g/L	pH
TD291, luego SC YSEO® en inoculación secuencial	12,09	0,0	< 25	< 5	0,33	7,67	3,53
SC YSEO®	12,83	0,1	< 25	< 5	0,79	8,35	3,45

TABLA 4. Análisis estándar, vinos sintéticos MS300-FA-O2 GF.

Los análisis obtenidos muestran que la disminución de acidez volátil es de nuevo muy significativa (Tabla 4).

4. Caracterización de la pareja *Torulasporea delbrueckii* 291 / *Saccharomyces cerevisiae* en inoculación secuencial.

4.1. UTILIZACIÓN DE UN PROTECTOR PARA LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN INOCULACIÓN SECUENCIAL.

Se efectuaron varias fermentaciones con el fin de evaluar las capacidades fermentativas de la inoculación secuencial en condiciones extremas con respecto al oxígeno (condiciones simuladas de los blancos en nuestros ensayos), y de estudiar el interés de la adición de un protector durante la rehidratación de la levadura *S. cerevisiae*. Los resultados demuestran que en condiciones difíciles (mosto con carencias), es recomendable utilizar un protector de levaduras (del tipo Go-FermProtect®) para la levadura *Saccharomyces* (Figura 4)

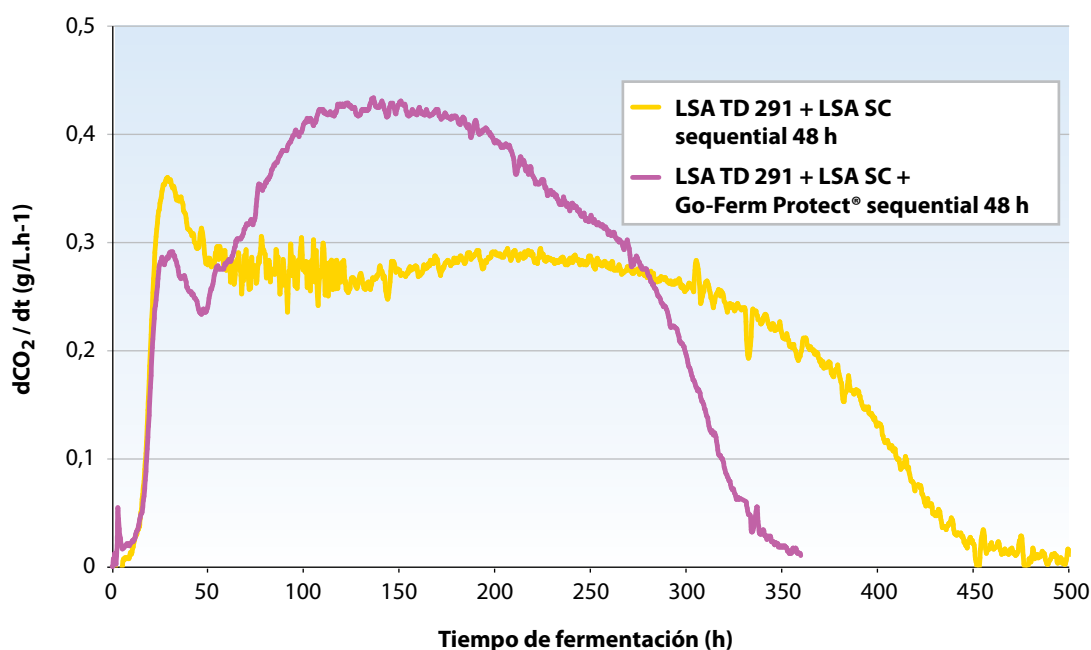


FIGURA 4. Cinética de fermentación con y sin protector de levadura durante la rehidratación de la levadura *S. cerevisiae* en inoculación secuencial con *T. delbrueckii* 291.

El efecto del protector de levadura se observa en la figura 4 a nivel de la velocidad de fermentación en fase estacionaria; en efecto, cuando se utiliza un protector para la rehidratación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la duración de la fermentación se reduce de un 25% con respecto a la fermentación testigo (sin utilización de protector). Este ahorro de tiempo representa una verdadera ventaja teniendo en cuenta que la duración de la fermentación generalmente es mayor cuando se vinifica utilizando la inoculación secuencial.

4.2 EVALUACIÓN DE LAS NECESIDADES DE NITRÓGENO DE LA PAREJA OPTIMIZADA Y UTILIZADA PARA LA INOCULACIÓN SECUENCIAL.

Se efectuaron fermentaciones en medio sintético carente de nitrógeno asimilable, con el fin de determinar las necesidades de nitrógeno durante la utilización de los 2 inóculos en inoculación secuencial. De acuerdo con Julien *et al.*, 2001, la duración de la fermentación en un medio

carente de nitrógeno es “proporcional” a los requerimientos de nitrógeno necesarios para mantener una velocidad de fermentación constante en este mismo medio. Se compararon levaduras que se caracterizaban por unos “requerimientos de nitrógeno bajos”, “medios” y “elevados” con la pareja de levaduras utilizada en la inoculación secuencial. Las cinéticas fermentativas nos permitieron clasificar *T. delbrueckii* 291 dentro del grupo de las levaduras con elevadas necesidades de nitrógeno.

4.3 NUTRICIÓN DE LA PAREJA DE LEVADURAS OPTIMIZADA PARA LA INOCULACIÓN SECUENCIAL.

Los resultados obtenidos en laboratorio, que muestran las elevadas necesidades de nitrógeno de la pareja de levaduras utilizada en inoculación secuencial, han sido confirmados por observaciones efectuadas durante ensayos a nivel industrial. Por tanto se estudiaron en laboratorio estrategias de nutrición adaptadas que, a continuación, fueron validadas mediante ensayos en bodega.

En laboratorio, el medio utilizado carecía de factores anaeróbicos (factores de supervivencia), simulaba una ausencia total de esteroides y lípidos, y los contenidos de nitrógeno asimilable eran de alrededor de 100 mg/l. La temperatura de fermentación se mantuvo constante a 20 °C y el contenido inicial de azúcares era de 220 g/l.

Se realizaron dos tipos de nutrición:

- Una adición de nutrientes denominados “complejos” para unos contenidos equilibrados de nitrógeno orgánico e inorgánico. Estos nutrientes contenían también vitaminas y levaduras inactivadas que son fuente de esteroides y de ácidos grasos insaturados (Fermaid® E).
- Una adición de nutrientes 100% orgánicos, que contenían nitrógeno sólo en forma de aminoácidos (Fermaid® O).

Estas 2 estrategias de nutrición se realizaron durante fermentaciones efectuadas con inoculación secuencial de las levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspora* 291.

En la Figura 5, se puede observar que una nutrición apropiada permite una reducción de la duración de la fermentación del 54% con un nutriente complejo y del 32% con un nutriente orgánico. El efecto es enorme en términos de seguridad fermentativa. Estos resultados concuerdan con las elevadas necesidades de nitrógeno descritas para esta pareja de levaduras.

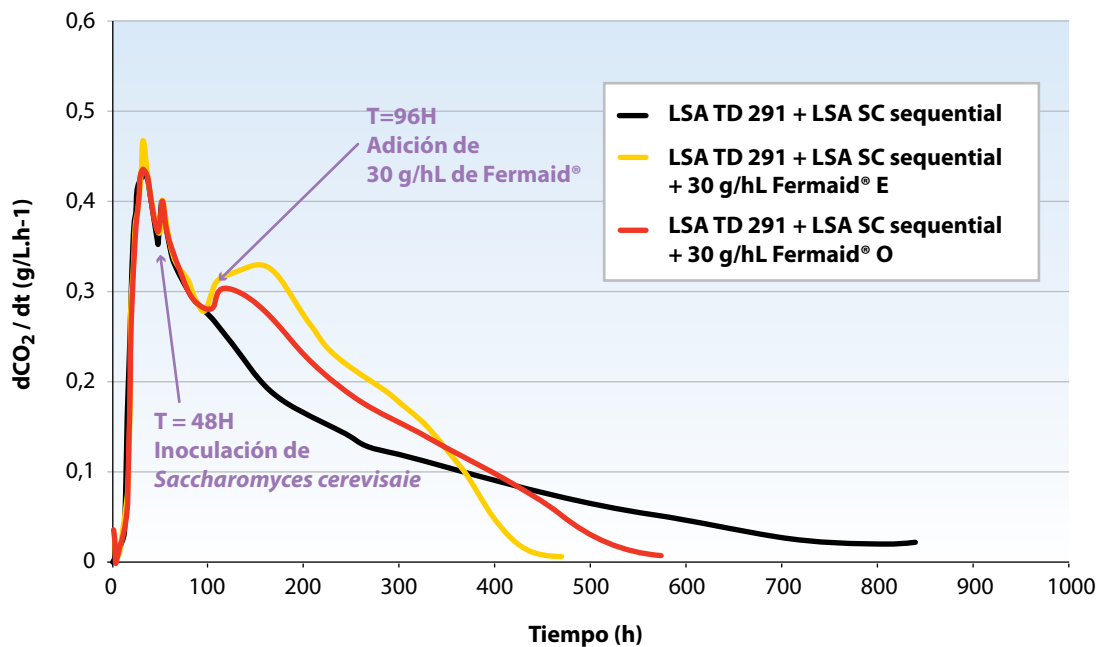


FIGURA 5. Cinética de fermentación con diferentes estrategias de nutrición para las levaduras utilizadas en inoculación secuencial.

4.4 UN ENFOQUE PROMETEDOR PARA LA DISMINUCIÓN DE LA ACIDEZ VOLÁTIL

Según los resultados de los ensayos de inoculación secuencial utilizando determinadas cepas de *T. delbrueckii* 291 para facilitar la fermentación de mostos de vendimias tardías, este proceso es particularmente útil no sólo para mejorar el perfil aromático del vino, sino también para disminuir la acidez volátil (AV), un problema frecuentemente asociado a este tipo de fermentación. En efecto, durante una serie de ensayos realizados en Sauternes, Francia, con un mosto de sémillon que presentaba un potencial alcohólico de 21,4%, el nivel de acidez volátil fue dos veces menor que el del lote inoculado según el método clásico (es decir 0,35 g/L en vez de 0,7 g/L).

5. Contribución sensorial de *Torulaspora delbrueckii* 291 en fermentación secuencial

5.1 COMPARACIÓN CON INÓCULOS CONVENCIONALES TIPO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Durante un ensayo realizado con un mosto chardonnay (Tabla 5) procedente de un viñedo situado en la región de “Appellation Contrôlée Mâcon Village”, en Francia, se obtuvieron diferencias mínimas a nivel de evolución de la fermentación alcohólica (Figura 6) entre la inoculación clásica con una levadura LSA *Saccharomyces cerevisiae* y la inoculación secuencial de *Torulaspora* 291 y *Saccharomyces* (Level2® TD).

	Testigo	Level2® TD
Glucosa + fructosa g/L	202	202
Acidez total H ₂ SO ₄ g/L	6,84	6,85
pH	3,26	3,25
SO ₂ libre mg/L	11	11
SO ₂ total mg/L	39	38
Ácido málico g/L	6,6	6,7
Nitrógeno asimilable mg/L	275	276
Turbidez	62	63

TABLA 5. Características del mosto Chardonnay

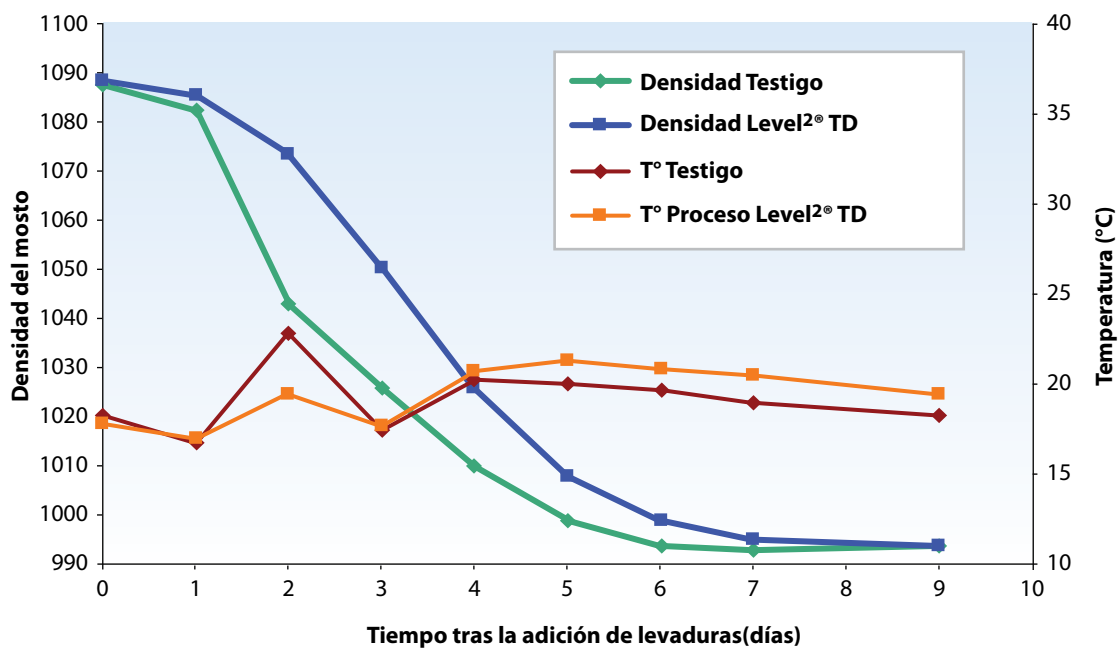
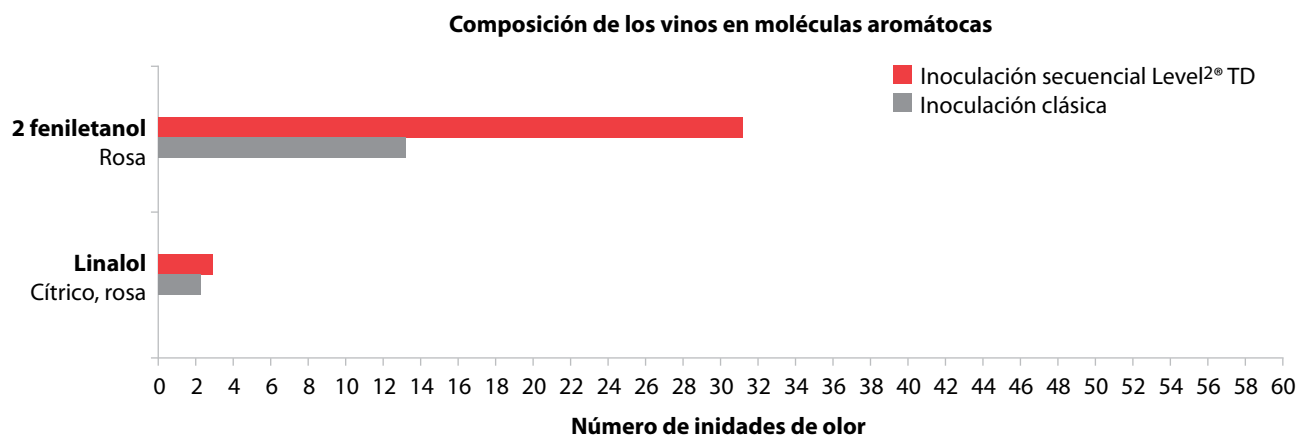
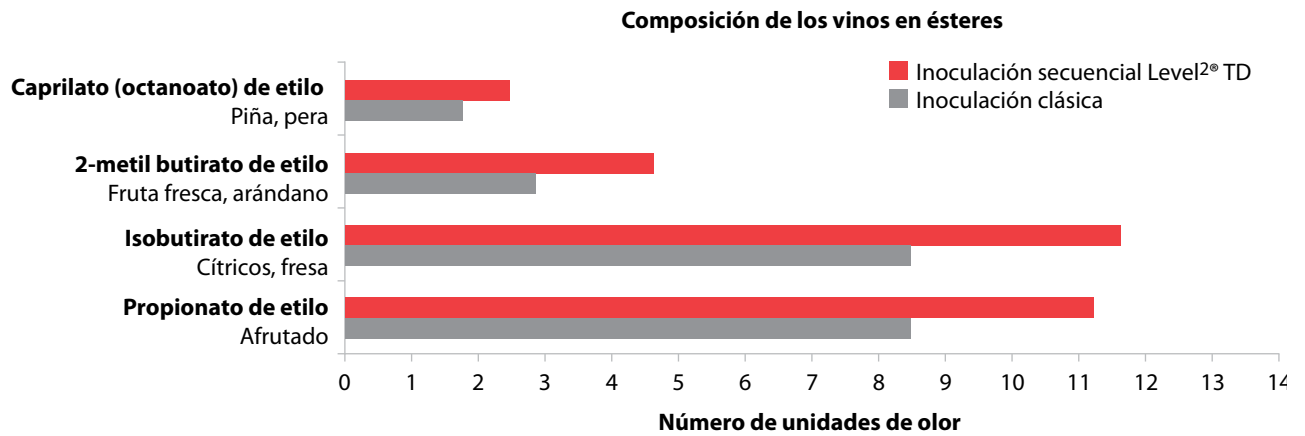


FIGURA 6. Cinética de fermentación de la inoculación secuencial y de la inoculación clásica en un mosto Chardonnay



FIGURAS 7A Y 7B. Chardonnay – número de unidades olfativas (cociente concentración/umbral de percepción) para diferentes moléculas aromáticas, en las dos modalidades.

Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el análisis de los compuestos aromáticos (véase las Figuras 7a y 7b)

Esteres – Al final de la FA, los contenidos de hexanoato de etilo y de butirato de etilo, que intensifican la nota frutal, eran significativamente más elevados en el vino del ensayo (tratado con inoculación secuencial) que en el vino testigo.

Terpenos – Al final de la FA, los contenidos de linalol (cítrico y rosa) y de 2-fenil-etanol (notas florales) eran más elevados en el lote fermentado con inoculación secuencial de dos levaduras.

Una vez concluida la FML, un jurado de consumidores expresó una preferencia neta por el vino tratado con inoculación secuencial (Figura 8), especificando que su complejidad aromática era superior a la del vino testigo. Según algunos miembros del jurado, el vino obtenido con la inoculación secuencial presentaba unas notas aromáticas positivas de “pastelería”, que no fueron percibidas en el vino testigo.

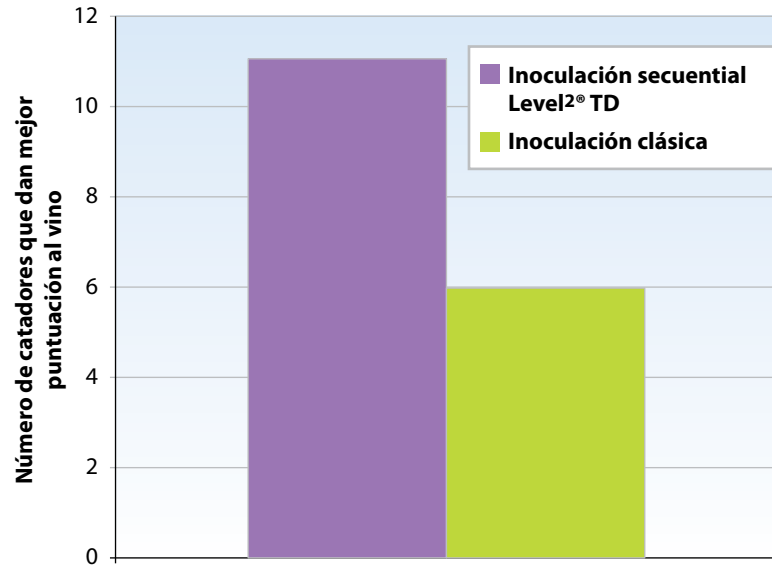
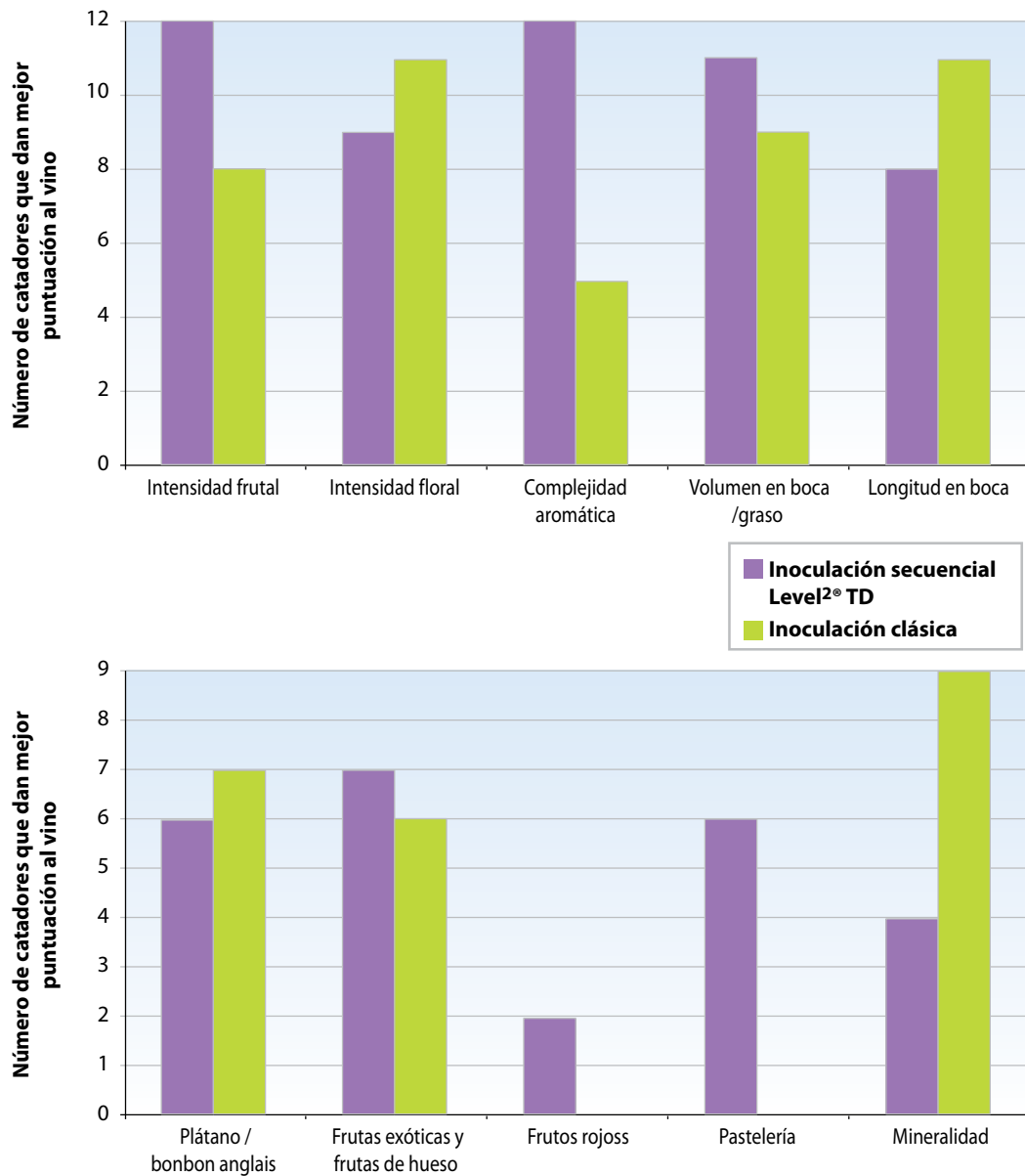


FIGURA 8. Evaluación comparativa de dos vinos por un jurado de consumidores tras la FML

Se evidenció una diferencia significativa entre los dos vinos catados por un jurado de consumidores (Figuras 9a y 9b). En particular el vino obtenido con inoculación secuencial fue percibido con una complejidad aromática superior. Es interesante notar que algunos de los catadores detectaron la presencia de una gama aromática de “pastelería” en este mismo vino mientras que ninguno la detectó en el vino testigo.



FIGURAS 9A Y 9B. Chardonnay – resultado del análisis sensorial descriptivo realizado por un jurado de consumidores no profesionales

5.2 COMPARACIÓN CON OTROS INÓCULOS NO CONVENCIONALES DISPONIBLES.

En este ejemplo se utilizaron tres inóculos (NSC1, NSC2, NSC3) que declaraban la presencia de levaduras no-*Saccharomyces*; se aplicó la inoculación clásica siguiendo las recomendaciones de hidratación y utilización de los diferentes productores y se comparó con la inoculación secuencial de las levaduras *Torulaspóra/Saccharomyces* producidas por nosotros (NSCTD2). La figura 10 presenta la viabilidad obtenida con los diferentes inóculos según el método descrito anteriormente. El predominio de las levaduras no-*Saccharomyces* obtenido para iniciar la fermentación alcohólica está representado por el porcentaje de levadura no-*Saccharomyces* (%NSC) presente con respecto a las levaduras totales vivas *Saccharomyces* (SC) y no-*Saccharomyces*.

En este ejemplo, el mosto utilizado era un ensamblaje de varios mostos. Los vinos obtenidos fueron analizados por un laboratorio independiente especializado en análisis aromáticas (Centro de aromas, Dictuc, Chile) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. (GC-MS). Se utilizó como estándar interno el 4-nonanol. Inmediatamente después de la conclusión de las fermentaciones los vinos fueron enviados al laboratorio para efectuar el análisis de los aromas, sin que hubiese ningún contacto con la madera.

Los resultados de la figura 10 demuestran que con las tres mezclas de levaduras no-*Saccharomyces* + *Saccharomyces*, no existe un predominio de las poblaciones no convencionales; la especie *Saccharomyces cerevisiae* presenta una dominancia clara en el momento de la inoculación en el mosto. Se puede por tanto asumir un efecto aromático muy débil (es decir nulo) de las levaduras no-*Saccharomyces* en los vinos obtenidos de esas fermentaciones.

Por el contrario, en el caso de la inoculación de sólo nuestra levadura *Torulaspota* al inicio de la fermentación, se observa más de un 90% de implantación. Esta fuerte implantación es posible gracias a la buena viabilidad del inóculo NSC TD2: $4,14 \times 10^{14}$.

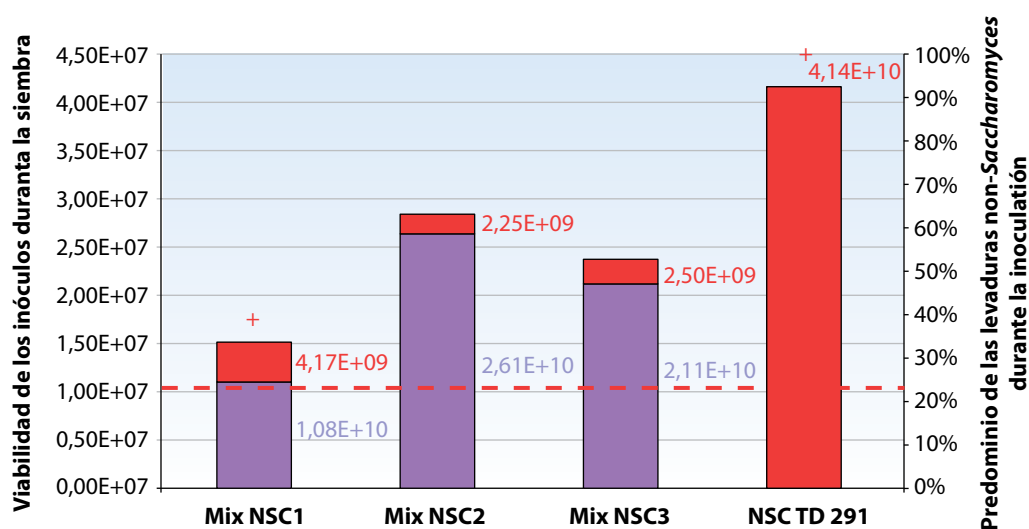


FIGURA 10. Viabilidad, en función del inóculo, de las levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* presentes y porcentaje de levaduras no-*Saccharomyces* viables.

En las figuras 11, 12 y 13 se presentan, respectivamente, los contenidos de derivados de vanilina, las concentraciones de terpenos y los contenidos de lactonas.

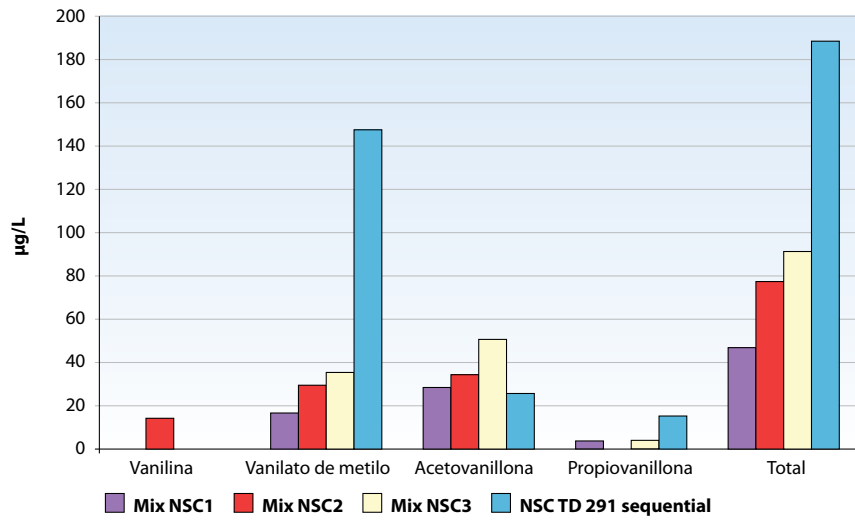


FIGURA 11. Contenido de derivados de vanilina.

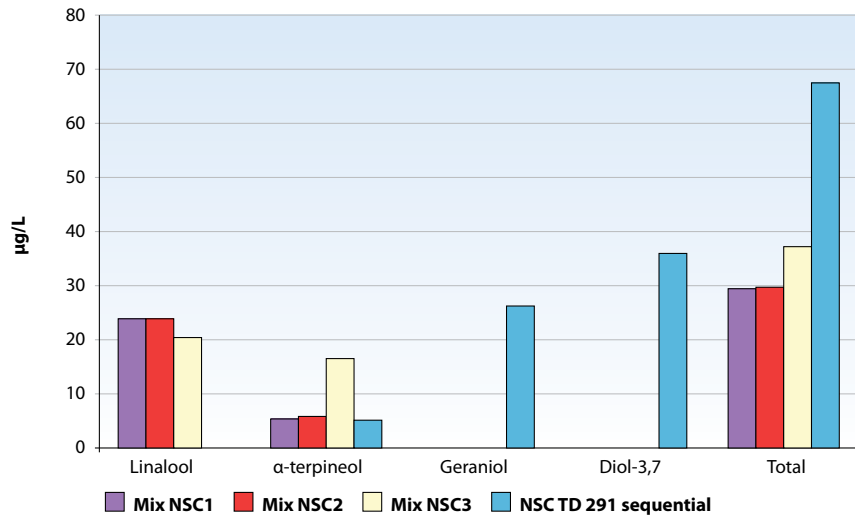


FIGURA 12. Contenido de terpenos.

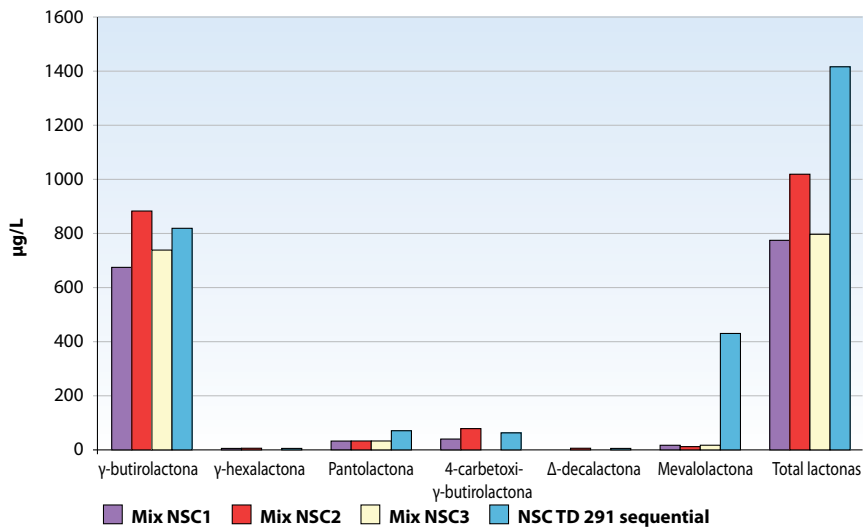


FIGURA 13. Contenido de lactonas.

Los análisis muestran, para todas las familias de compuestos aromáticos, unas concentraciones finales en los vinos significativamente superiores cuando la fermentación se realiza según el protocolo de inoculación secuencial de *Torulaspora* y *Saccharomyces*.

6. Conclusión

Nuestras investigaciones han conducido a la puesta a punto de una pareja de levaduras complementarias, Level2® TD, que se utiliza en inoculación secuencial. Se trata de una levadura no-*Saccharomyces* de la especie *Torulaspora delbrueckii* 291, combinada con una cepa específica de *Saccharomyces cerevisiae*. Gracias a las numerosas mejoras a nivel del proceso de producción, esta levadura seleccionada por Lallemand es inoculada en el mosto con una nivel de supervivencia de 1010 ufc/mL. A continuación, durante la fermentación alcohólica y tras una caída de densidad de 15 puntos, se inocula una levadura *Saccharomyces cerevisiae* específica por su complementariedad con la levadura *Torulaspora*, siguiendo el protocolo de rehidratación de las LSA.

Estos 5 años de investigación a nivel de laboratorio, y de desarrollo en condiciones de bodega, han confirmado el interés para el enólogo de esta aplicación.

Esta aplicación en inoculación secuencial permite efectuar fermentaciones alcohólicas seguras garantizando el consumo total de los azúcares. Pero el efecto más evidente de la sinergia de estos dos inóculos sigue siendo la complejidad y la intensidad aromática. Es esta alternancia de poblaciones de levaduras no-*Saccharomyces* y a continuación de levaduras del género *Saccharomyces*, como se ha observado en numerosos estudios sobre ecología de las levaduras de los sistemas fermentativos no inoculados, la que contribuye a la intensidad y complejidad de los vinos.

Las investigaciones efectuadas a nivel de procesos de producción de levaduras permiten la utilización hoy en día de un inóculo no-*Saccharomyces* en el mosto, con un nivel de supervivencia durante toda la primera fase de la fermentación superior al normalmente

obtenido con los inóculos *Saccharomyces*. De esta forma, mediante su utilización secuencial con una levadura *Saccharomyces* complementaria, el enólogo puede hoy reproducir, de forma segura y eficaz, la sucesión natural de predominio de poblaciones de levaduras.

Referencias

- Anfang, N., M. Brajkovich y M. R. Goddard. 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15(1):1-8.
- Bely, M., P. Stoeckle, I. Masneuf-Pomared y D. Dubourdieu. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122:312-320.
- Belancic, A., Z. Günata, M. J. Vallier y E. Agosin. 2003. β -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. *J. Agric. Food Chem.* 51:1453-1459.
- Bohlscheid, J., G. Specht, A. Ortiz-Julien, J. Maloney, B. Bertheau, C. Ross y C. Edwards. 2007. Application of a new yeast preparation for problem grape musts. *Journal of Wine Research* 18(3):173-185.
- Garcia, A., C. Carcel, L. Dulau, A. Samson, E. Aguera, E. Agosin y Z. Günata. 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriiji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *J. Food Sci.* 67:1138-1143.
- Charenchai, C., G. H. Fleet, P. A. Henschke y B. Todd. 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 3:2-8.
- Ciani, M. y G. Picciotti. 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotech. Letters* 17:1247-1250.

- Ciani, M., L. Ferraro. y F. Fatichenti. 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl. Env. Microbiol.* 62:128-132.
- Ciani, M. 1997. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Res. Devel. Microbiol.* 1:317-331.
- Ciani, M. y L. Ferraro. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85:247-254.
- Clemente-Jimenez, J. M., L. Mingorance-Cazorla, S. Martínez-Rodríguez, F. J. Las Heras-Vázquez y F. Rodríguez-Vico. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 98(3):301-308.
- Comitini, F., N. Di Pietro, L. Zacchi, I. Mannazzu y M. Ciani. 2004a. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology* 150:2535-2541.
- Comitini, F., J. De Ingeniis, L. Pepe, I. Mannazzu y M. Ciani. 2004b. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera* / *Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238:235-240.
- Davenport, R. R., 1974. Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis* 13:123-30.
- De Ingeniis, J., N. Raffaelli, M. Ciani y I. Mannazzu. 2009. *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1129-1134.
- Egli, C. M., W. D. Edinger, C. Mittrakul y T. Henick-Kling. 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.
- Etievant, P., 1991. Wine. In: *Volatile compounds in food and beverages*, ed. H. Maarse. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 483-546.
- Ferraro, L., F. Fatichenti y M. Ciani. 2000. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Bioch.* 35:1125-1129.
- Fleet, G. H. y G. M. Heard. 1993. Yeasts: Growth during fermentation. In: G. H. Fleet (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland, 27-54.
- Ganga, M. A. y C. Martínez. 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 96:76-83.
- Hansen, E. H., P. Nissen, P. Sommer, J. C. Nielsen y N. Ameborg. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Applied Microbiology* 91:541-547.
- Heard, G.M. y G. H. Fleet. 1986. Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Austr.* 38:22-25.
- Hierro, N., B. Esteve-Zarzoso, A. González, A. Mas y J. M. Guillamón. 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 72(11):7148-7155.
- Lambrechts, M. G. y I. S. Pretorius. 2000. Yeast and its importance to wine aroma review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21:97-129.
- Languet, P., A. Ortiz-Julien, E. Aguera, A. Samson et J. M. Salmon. 2005. Valorisation aromatique des moûts par l'utilisation séquentielle de levure d'espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. *Revue des Œnologues* 117:31-33.
- Loiseau, G., F. Vezinhet, M. Valade, A. Vertes, C. Cuinier y D. Delteil. 1987. Contrôle de l'efficacité du levurage par la mise en œuvre de souches de levures œnologiques marquées. *Revue française d'œnologie* 106:29-36.

- Martínez, J., F. Toledano, C. Millán y J. M. Ortega. 1990. Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from Pedro Ximenez grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food microbiology* 7:217-225.
- Martínez, C., C. Gertosio, A. Labbe, R. Pérez y A. Ganga. 2006. Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(4):407-411.
- Mauricio, J. C, S. Guijo y J. M. Ortega. 1991. Relationship between phospholipids and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(4):301-308.
- Mora, J., J. I. Barba y A. Mulet. 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(2):156-159.
- Moreno, J. J., C. Millán, J. M. Ortega y M. Medina. 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Ind. Microbiol.* 7(3):181-190.
- Mortimer, R. y M. Polsinelli. 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150(3):199-204.
- Plata, C., C. Millán, J. C. Mauricio y J. M. Ortega. 2002. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20(2):217-224.
- Renault, P., C. Miot-Sertier, P. Marullo, P. Hernández-Orte, L. Lagarrigue, A. Lonvaud-Funel y M. Bely. 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *International Journal of Food and Microbiology* 134(3):201-210.
- Rojas, V., J. V. Gil, F. Piñaga y P. Manzanares. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food and Microbiology* 86(1-2):181-188.
- Romano, P., C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso y A. Capece. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food and Microbiology* 86(1-2):169-180.
- Rosi, I., M. Vinella y P. Domizio. 1994. Characterization of β -glucosidase activity in yeast of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 77(5):519-527.
- Soden, A., I. L. Francis, H. Oakey y P. A. Henschke. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of chardonnay wine. *Austr. J. Grape Wine Res.*, 6(1):21-30.
- Torija, M. J., N. Rozès, M. Poblet, J. M. Guillamón y A. Mas. 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79(3-4):345-352.
- Viana, F., J. V. Gil, S. Genovés, S. Vallés y P. Manzanares. 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25(6):778-785.
- Viana, F., J. V. Gil, S. Vallés y P. Manzanares. 2009. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 135(1):68-74.
- Zironi, R., P. Romano, G. Suzzi, F. Battistutta y G. Comi. 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Letters* 15:235-238.
- Zott, K., C. Miot-Sertier, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel y I. Masneuf-Pomarede. 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125(2):197-203.