

# VINCULAR LA *METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA* Y LA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA UNA MÁXIMA REVELACIÓN DEL AROMA EN VINOS BLANCOS

---

**Maria Angelica GANGA<sup>1</sup>, Pedro CARRILES<sup>2</sup>, Céline RAYNAL<sup>4</sup>, José Maria HERAS<sup>3</sup>, Anne ORTIZ-JULIEN<sup>4</sup> and Ann DUMONT<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada (LAMAP), Universidad de Santiago de Chile

<sup>2</sup> Lallemand Chile, Av. Ricardo Lyon 400, Dept 68, Providencia, Santiago, Chile

<sup>3</sup> Lallemand España, C/ Zurbano 71, Oficina 6, 28010 Madrid, España

<sup>4</sup> Lallemand France, 19, rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, Francia

<sup>5</sup> Lallemand, 1620, rue Préfontaine, Montréal, QC, Canada H1W 2N8

## Introducción

En la producción de vino, las levaduras son las responsables de la transformación del azúcar del mosto de uva en etanol, dióxido de carbono y cientos de productos secundarios que, en su conjunto, contribuyen a las cualidades propias del producto (Fleet, 2003). Estos microorganismos pueden por lo tanto influir positiva o negativamente en las cualidades organolépticas del vino. En un inicio, las levaduras no-*Saccharomyces* prevalecen en el mosto porque la concentración de levaduras de tipo *Saccharomyces* es baja, pero llegan paulatinamente a predominar durante el proceso de fermentación alcohólica (FA) (Pretorius, 2000). Aunque las levaduras no-*Saccharomyces* fueron consideradas durante mucho tiempo como nocivas para las características organolépticas en el vino, en años recientes, se ha evidenciado que el uso de estas levaduras bajo condiciones controladas puede aportar características organolépticas más complejas, mejorando así la calidad del producto final (Ciani y Ferraro, 1998 y García et al. 2002).

Durante algunos años, el grupo de investigación del LAMAP de la Universidad de Santiago de Chile, en colaboración con Lallemand, ha estado trabajando en definir el potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para su uso en enología mediante el estudio de las enzimas (xilanasas, celulasas y glicosidasas, etc.) que secretan en el medio (Ganga y Martínez, 2004). Se ha podido determinar que una cepa de *Metschnikowia pulcherrima* (L1781, también conocida como Flavia™ MP346), aislada desde la región chilena del Maule, secreta naturalmente una enzima con actividad  $\alpha$ -arabinofuranosidasa en el medio de cultivo, lo que resulta muy interesante para la enología, especialmente para las uvas terpénicas.

## ¿Por qué es importante una enzima con actividad $\alpha$ -arabinofuranosidasa en enología?

Uno de los factores que más influye sobre el aroma característico de una variedad de uva es su etapa de maduración. Tanto los compuestos libres como los ligados se acumulan en las uvas durante este periodo (Günata et al., 1985 y Sánchez et al., 2007). Muchos compuestos aromáticos se encuentran presentes en las uvas, entre ellos los alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos y terpenos (Aznar et al., 2001). Sin embargo, los terpenos son los principales compuestos responsables del aroma característico de la fruta (Vilanova y Sieiro, 2006). Una gran parte

de los terpenos se encuentra en forma ligada a azúcares, impidiéndoles que formen parte del aroma del producto (Günata et al., 1988). Estos terpenos glicosilados pueden ser transformados en su forma libre por la acción hidrolítica de enzimas glicosidas (figura 1) (Günata et al., 1988). Los terpenos más destacados son: linalool, geraniol, nerol, citronerol y  $\alpha$ -terpineol (Marais, 1983 y Günata et al., 1985). La mayor parte de los residuos glicosídicos que acompañan los precursores aromáticos son de tipo arabinofuranosidos y glicosidos (Yanai y Sato, 2000). Por eso es que las enzimas con actividad  $\alpha$ -arabinofuranosidasa y  $\beta$ -glucosidasa cobran mucha importancia en la liberación de compuestos aromáticos volátiles. Como se ve en la figura 1, la primera enzima cataliza la hidrólisis del enlace entre la arabinosa y la glucosa, liberando el sustrato por la acción de la segunda enzima, la cual es capaz de hidrolizar la unión entre la glucosa y el terpeno, para luego formar parte del aroma (Günata et al., 1988).

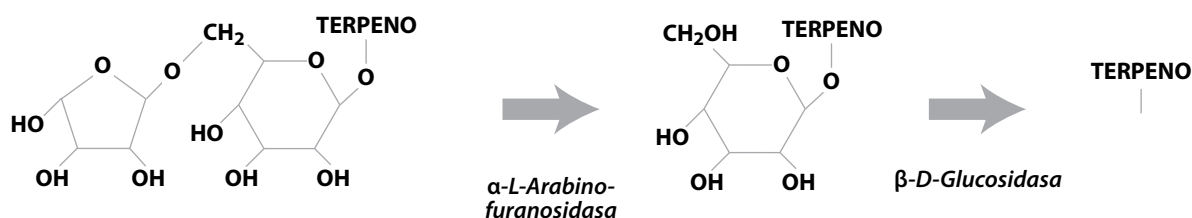


FIGURA 1. Acción secuencial de enzimas hidrolíticas sobre precursores aromáticos (Günata et al., 1988)

La levadura *M. pulcherrima* L1781 o la Flavia™ MP346 ha sido caracterizada por sus actividades enzimáticas. Esta cepa no-*Saccharomyces* muestra una alta actividad para la  $\alpha$ -arabinofuranosidasa. En enología, se ha estudiado su potencial para revelar aromas de variedades en asociación con la *S. cerevisiae*. Para el estudio que realizamos, hemos usado la *M. pulcherrima* Flavia™ MP346 producida por Lallemand en forma seca activa.

### Cuantificación de la actividad $\alpha$ -arabinofuranosidasa de la Flavia™ MP346

Se han realizado pruebas sobre la actividad  $\alpha$ -arabinofuranosidasa con la levadura seca activa Flavia™ MP346 y el aislado de *M. pulcherrima* MP 346 (cepario L1781 del LAMAP-USACH) de acuerdo al protocolo descrito por Günata et al. (1990). Una unidad (U) de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que consume 11  $\mu$ mol de p nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (pNPA) por minuto. El Cuadro 1 muestra los resultados.

<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Actividad específica [U/mg]
Seca (Lallemand)	0,22 <sup>a</sup>
Levadura control (cepario LAMAP-USACH)	0,23 <sup>a</sup>

Una letra o más entre los valores de una misma columna indica que existen diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95 %.

CUADRO 1. Definición de la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa

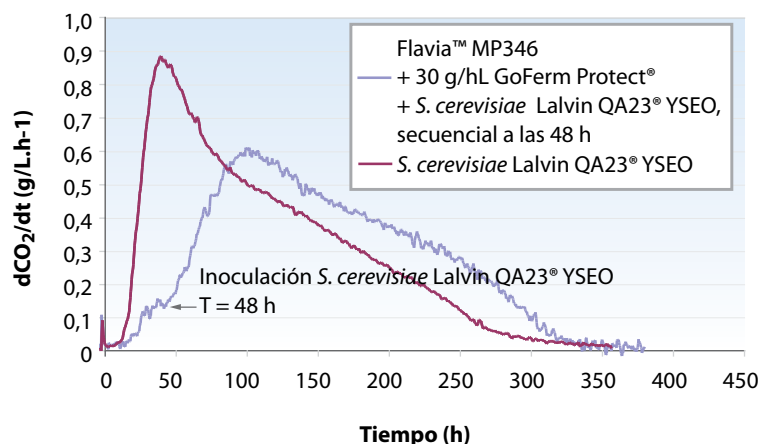
Una o más letras entre los valores de una misma columna indica que existen diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95 %.

Luego de contrastar las actividades obtenidas para ambos tipos de levadura, se puede observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la actividad del aislado seco y los microorganismos originales. Por ende, el proceso de secado no alteró la producción de actividad  $\alpha$  arabinofuranosidasa de la *M. pulcherrima*.

## La caracterización de Flavia™ MP346 en condiciones enológicas con inoculación secuencial

Para caracterizar la capacidad fermentativa de Flavia™, la forma comercial seca activa de *M. pulcherrima* MP346 en condiciones enológicas, se llevó a cabo una serie de fermentaciones en mosto sintético, luego validadas en diferentes mostos blancos.

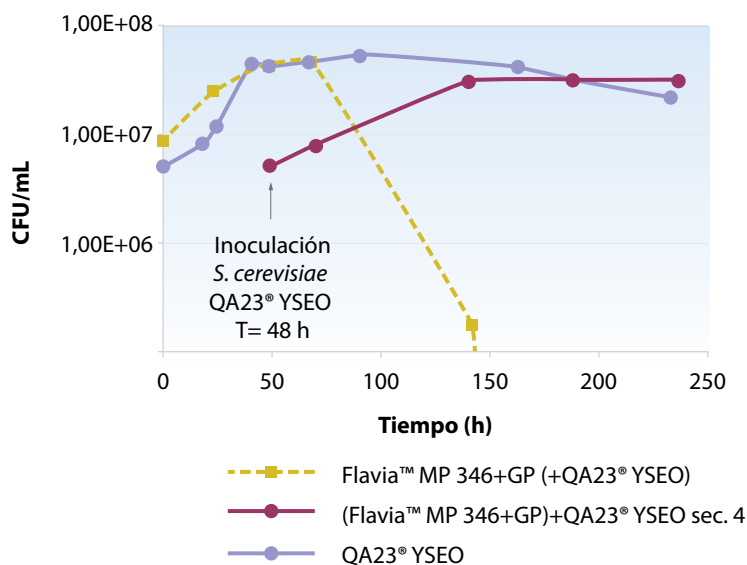
Se escogió una estrategia de inoculación secuencial para permitir la expresión completa de las especies no-*Saccharomyces* desde el principio de la fermentación, específicamente sus actividades enzimáticas, seguida por *S. cerevisiae* cuyo rol fue de asegurar la fermentación. En primer lugar, se inoculó Flavia™ MP346 en el mosto en dosis de 25 g/hL (en forma seca activa) y, 48 horas después, se agregó *S. cerevisiae* en el mosto en concentración de 25 g/hL. En la figura 2, se pueden observar las cinéticas de fermentación y comparar la velocidad de fermentación en la inoculación de *S. cerevisiae* con la inoculación secuencial de *M. pulcherrima* al principio, seguido de la inoculación de *S. cerevisiae* 48 horas después.



**FIGURA 2.** Cinéticas de fermentación de Flavia™ MP346 y *Saccharomyces cerevisiae* comparadas con *S. cerevisiae* sola en Sauvignon Blanc

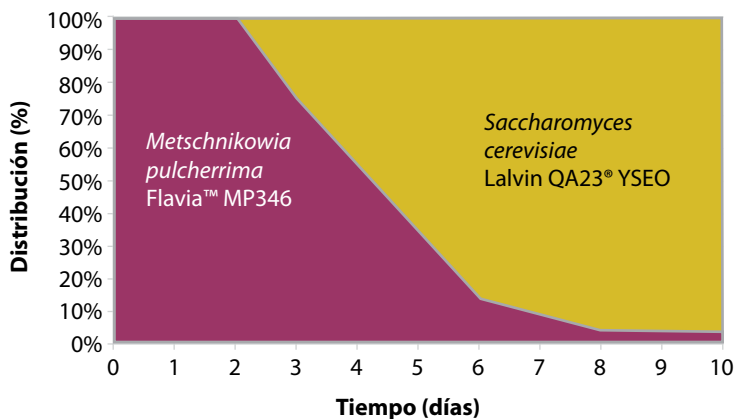
Los perfiles cinéticos son diferentes con una velocidad de fermentación máxima más baja en la inoculación secuencial si la comparamos con la inoculación sola de *S. cerevisiae*. También se observa un inicio de fermentación más lento debido a la actividad fermentativa más baja de *M. pulcherrima*. Sin embargo, los tiempos de fermentación son bastante parecidos y ambas fermentaciones consumen totalmente los azúcares.

La Figura 3 representa la población de ambas fermentaciones (secuencial y con una sola levadura) de las dos especies para la inoculación secuencial.



**FIGURA 3.** Populations of Flavia™ MP346 and *Saccharomyces cerevisiae* compared to *S. cerevisiae* alone in Sauvignon Blanc

Vale destacar la buena multiplicación de *M. pulcherrima* durante los dos primeros días de FA. Una vez que se inocula el medio con *S. cerevisiae*, se observa un día de cohabitación de ambas especies antes de que haya un declive drástico de *M. pulcherrima*, permitiendo la colonización completa del medio por *S. cerevisiae*. En la Figura 4, se puede apreciar la distribución de la población viable durante la FA.

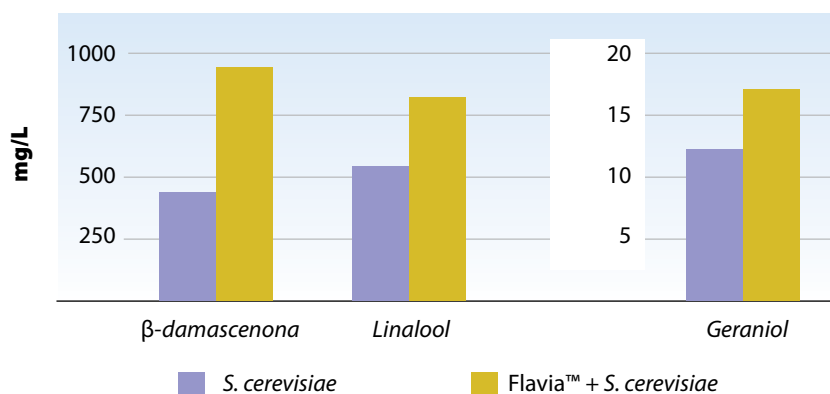


**FIGURA 4.** Distribución de la población viable durante la fermentación alcohólica, medidas por citometría de flujo

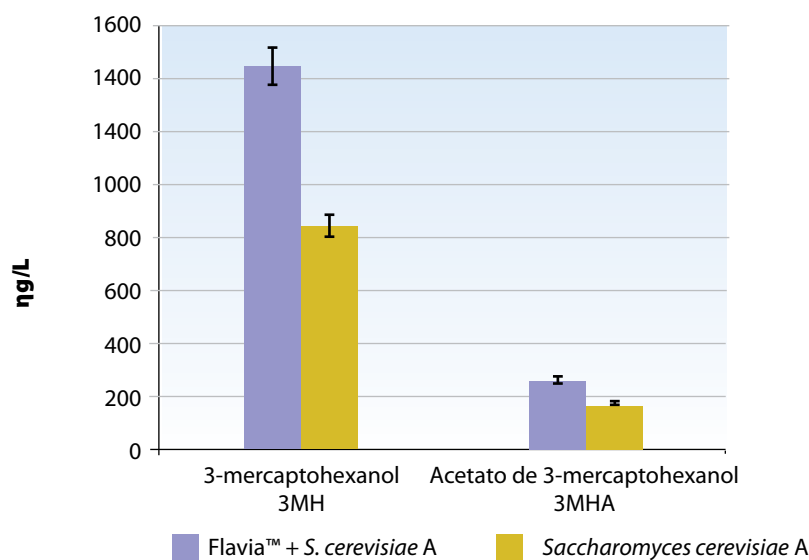
En un ensayo realizado con Flavia™ MP346 y Lalvin QA23® en mosto de Moscatel de Alejandría (2011), se inoculó una concentración de 25 g/hL (aproximadamente  $1 \times 10^7$  ufc/mL) de Flavia™ en el mosto, y después de 24 horas de incubación se inoculó con *S. cerevisiae* Lalvin QA23® (25 g/hL). El tiempo de inoculación de *S. cerevisiae* fue adaptado tras una investigación ulterior en condiciones de bodega. Así, la introducción de *S. cerevisiae* 24 horas después de la inoculación con Flavia™ MP346 proporcionó un resultado óptimo. Los vinos finales fueron sometidos a un panel de cata, durante el cual el 80 % de los enólogos expresó una mayor preferencia por el vino producido con los cultivos secuenciales. Este vino se caracterizó por un intenso aroma donde resaltan notas florales, piña y mercaptopentanona. En aras de confirmar los resultados del panel de cata, se analizaron los vinos por cromatografía de gases. Estos mostraron que la concentración de terpenos libres era mayor en la muestra que provenía de los cultivos con inoculación secuencial comparada con la del control, subrayándose

un mayor aporte de  $\beta$ -damascenona, linalool y geraniol, respectivamente responsables de las notas de tabaco, lavanda (Jackson, 1994) y potenciadores de sabores que realzan los aromas frutales (figura 5).

Estudios recientes demostraron la habilidad de las especies de levadura *Metschnikowia* de revelar ciertos tioles volátiles, particularmente los compuestos 3MH (Zott et al., 2011), responsables de las notas de toronja y cítricos en vinos blancos. Luego, se hicieron pruebas con Flavia™ MP346 en distintas variedades de uva conocidas por su alto contenido en precursores (Sauvignon Blanc y Colombard). El impacto positivo de la inoculación secuencial con Flavia™ MP346 fue efectivamente confirmado, con incrementos de producción de 3-mercaptohexanol (3MH) de aproximadamente 50 % en ciertos casos (figura 6).



**FIGURA 5.** Revelando compuestos terpenicos y nor-isoprenoides con Flavia™ MP346 (2011 Muscat)



**FIGURE 6.** Revelando tioles varietales con Flavia™. Ensayo en 2011 Colomard 2011

Una cata de Sauvignon Blanc de Portugal realizada con un grupo de 20 expertos (compradores de vinos, periodistas, enólogos y degustadores especializados) demostró que los vinos fermentados con Flavia™ MP346 fueron clasificados por su mayor intensidad y sus aromas agradables a cítricos (figura 7). En el análisis de sabores (figura 8), los vinos fueron clasificados con mayor calidad en boca e intensidad aromática, así como por su persistencia, sensación en boca, dulzor y una menor percepción agresiva. Se prefirió el vino fermentado con Flavia™ MP346 a los otros dos vinos (figura 9).

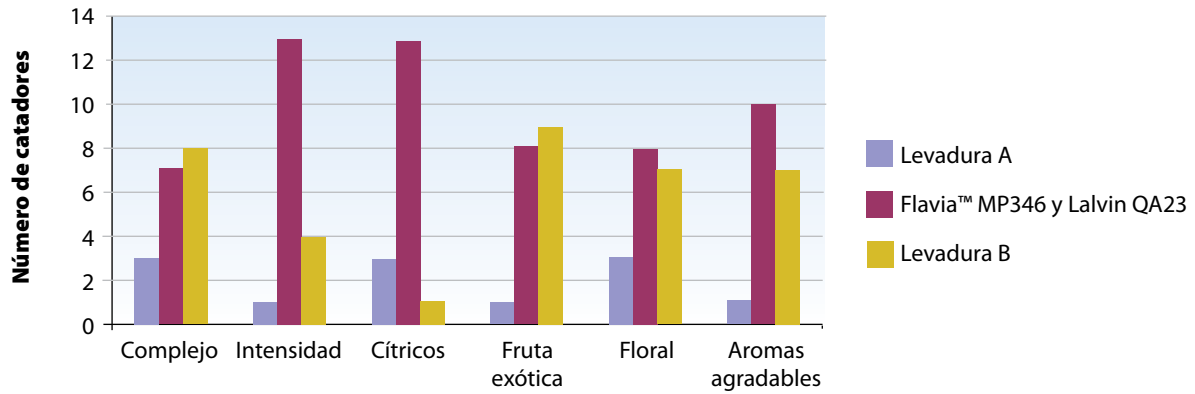


FIGURA 7. Análisis de aromas de un Sauvignon Blanc 2012 (Portugal) fermentado con tres levaduras distintas

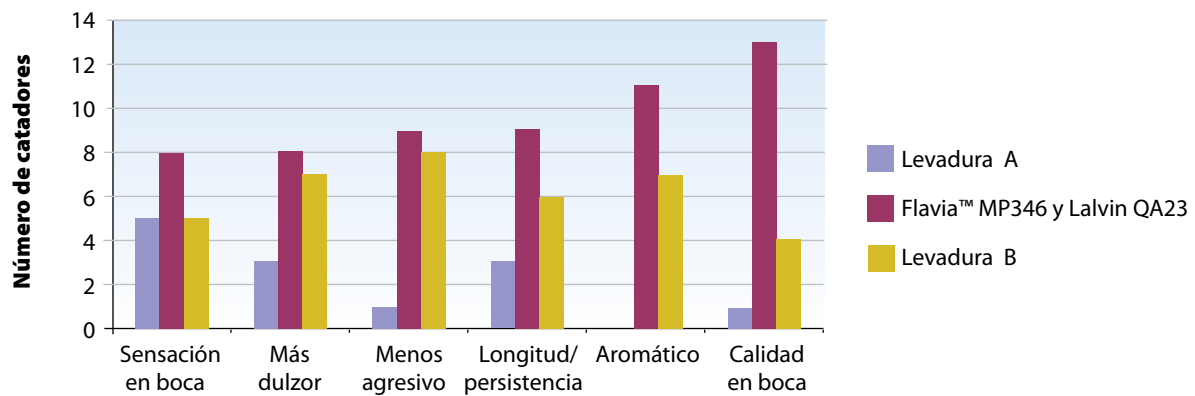


FIGURA 8. El análisis de sabores de un Sauvignon Blanc 2012 (Portugal) fermentado con tres levaduras distintas

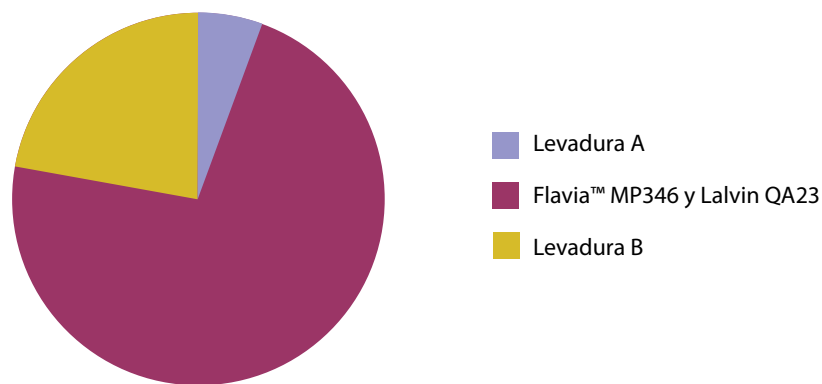


FIGURA 9. Prueba de preferencia para un Sauvignon Blanc 2012 (Portugal) fermentado con tres levaduras distintas

## Conclusiones

Este estudio demostró el potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para la enología. Si bien se sabe que la presencia de estas levaduras al inicio de la fermentación alcohólica proporciona aromas más complejos al producto final, se dificulta su uso en la elaboración del vino por la falta de control. Sin embargo, el uso de levaduras no-*Saccharomyces* en forma seca activa aumenta su eficacia y evita los riesgos.

El uso de Flavia™ MP346 en fermentación secuencial ha producido vinos más complejos en su aspecto organoléptico. Esta levadura actúa primero en los terpenos glicosidados presentes en forma natural en la uva y también es capaz de liberar tioles volátiles mientras permanece en el mosto. Ambos compuestos volátiles liberan aromas complejos y afrutados, calidad que buscan los consumidores más exigentes.

## Referencias

- Aznar, M., R. Lopez, J. F. Cacho, and V. Ferreira. 2001. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-Olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *J. Agric. Food Chem.* 49:2924-2929.
- Ciani, M., and 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.
- Ciani, M., and G. Picciotti. 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeast associated with wine-making. *Biotechnol. Lett.* 17:1247-1250.
- Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86(1-2):11-22.
- Ganga, M. A., and C. Martínez. 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 96:76-83.
- García, A., C. Carcel, L. Dulau, A. Samson, E. Aguera, and E. Agosin. 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a muscat wine. *J. Food. Sc.* 67:1138-1143.
- García, V., H. Vásquez, F. Fonseca, P. Manzanares, F. Viana, C. Martínez, and M. A. Ganga. 2010. Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. *Rev. Argen. Microbiol.* 42:226-229.
- Günata, Z., C. Bayonove, R. Baumes, and R. Cordonnier. 1985. Aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fraction of some white grape varieties. *J. Chromatogr.* 331:83-90.
- Günata, Y. Z., S. Bitteur, J. M. Brillouet, C. L. Bayonove, and R. Cordonnier. 1988. Sequential enzymic (sic) hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research.* 184:139-149.
- Günata, Z., J. M. Brillouet, S. Voirin, R. Baumes, and R. Cordonnier. 1990. Purification and some properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpene arabinofuranosylglucosides. *J. Agric. Food Chem.* 38:772-776.
- Jackson, R. 1994. *Wine Science: Principles and Applications*. Academic Press. USA.
- Marais, J. 1983. Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review. *South Afr. J. Enol. Viticul.* 4:49-58.
- Pretorius, I. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16:675-729.
- Sánchez, E., M. Díaz-Maroto, M. González, A. Soriano-Pérez, and M. Pérez-Coello. 2007. Aroma profile of wines from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening. *Food Control.* 18(5):398-403.
- Vilanova, M., and C. Sieiro. 2006. Determination of free and bound terpene compounds in Albariño wine. *J. Food Compos. Anal.* 19:694-697.
- Yanai, T., and M. Sato. 2000. Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 64:1181-1188.
- Zott, K., C. Thibon, M. Bely, A. Lonvaud-Funel, D. Dubourdieu, I. Masneuf-Pommerade. 2011. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* Dec 2; 151(2):210-5.