

EMPLEO DE LEVADURAS INMOVILIZADAS DE LA ESPECIE *Schizosaccharomyces pombe* EN LA ELABORACIÓN DE VINOS TINTOS

Ana Rosa Gutiérrez¹, Susana Sanz¹, Carmen Olarte¹, Antonio Palacios¹, Pilar Santamaría², Patrocinio Garijo², Rosa López²

¹ Departamento de Agricultura y Alimentación (CCT), Universidad de La Rioja. C/ Madre de Dios, 51, 26006 Logroño, (La Rioja). Tel. 941299727 e-mail: ana-rosa.gutierrez@unirioja.es

² Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico de La Rioja (CIDA). Ctra. de Mendavia-Logroño (NA 134, km. 88), 26071 Logroño (La Rioja).

Resumen:

En este trabajo se estudió la posibilidad de realizar la Fermentación maloalcohólica (FMA) conducida por levaduras inmovilizadas de la especie *Schizosaccharomyces pombe*, como una alternativa a la Fermentación Maloláctica (FML) llevada a cabo por bacterias lácticas. El estudio se desarrolló con una partida de uva tinta, en la que se intentó inducir la FMA tanto en el mosto como en el vino, es decir, antes y después de la fermentación alcohólica. En ninguno de los dos casos se llevó a cabo la fermentación maloalcohólica, a pesar de acondicionar los depósitos para favorecer el desarrollo de estas levaduras, y fueron las bacterias lácticas autóctonas las que degradaron el ácido málico. Al analizar las perlitas que contenían las levaduras después del ensayo, se detectó que se había producido una deshidratación de las mismas que impedían el intercambio con el medio, a pesar de que las levaduras del interior seguían vivas. Esta deshidratación se produjo probablemente por el excesivo contenido en polifenoles del líquido, puesto que las perlitas aparecían totalmente teñidas de rojo y con un diámetro reducido.

Palabras clave: *Schizosaccharomyces pombe*, Vino Tinto, Levaduras Inmovilizadas, Fermentación Maloláctica, Fermentación Maloalcohólica.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los procesos de elaboración de vinos de calidad tienden a evitar la presencia de compuestos con riesgo para la salud (aminas biógenas, carbamato de etilo,...), y a desarrollar y estabilizar la calidad aromática y organoléptica del producto. La fermentación maloláctica es una transformación microbiológica, beneficiosa en algunos casos, pero que puede causar alteraciones en este sentido: acumulación de sustancias tóxicas y desviaciones organolépticas [2]. Por tanto, para evitar este problema habría que ejercer un estricto control sobre la fermentación maloláctica o impedirla, y con ello anular la presencia de las bacterias lácticas durante la vinificación.

La desacidificación de los vinos y su estabilización al eliminar el ácido málico presente, puede llevarse a cabo además de por la FML, mediante la actuación de levaduras de la especie *Schizosaccharomyces pombe*, que realizan la fermentación maloalcohólica, transformando el ácido málico en etanol y CO₂. Sin embargo, estas levaduras no se han utilizado hasta hoy a nivel industrial porque si permanecen en el mosto durante un tiempo largo, provocan una disminución del carácter varietal y la aparición de sabores y aromas desagradables [8]. Por otro lado, la inoculación de los depósitos con microorganismos tiene el inconveniente de la pérdida de control sobre los mismos una vez que éstos se han adicionado al depósito. Sin embargo, el empleo de microorganismos inmovilizados en estructuras sólidas, que no se desintegran en el contacto con el mosto o el vino, y que permiten retirarlos del medio en cualquier momento, hace que el microorganismo esté bajo control en todo momento.

En los vinos blancos, la FML no es unánimemente aceptada por los enólogos porque induce un carácter vinoso y pérdida de afrutado, aspectos no deseados en la mayoría de los vinos blancos. El empleo de *Schizosaccharomyces* como alternativa a la FML para este tipo de vinos se ha experimentado en algunas zonas frías con resultados muy prometedores. En el caso de los vinos tintos, se pueden hacer diferentes consideraciones según el tipo de vino. Así, en los vinos destinados a crianza la presencia de las bacterias lácticas, a pesar de los riesgos, parece ser imprescindible, ya que el aporte de polisacáridos durante la plasmolisis celular mejora enormemente las características del vino. Sin embargo, en los vinos tintos de consumo joven, debe permanecer más el carácter de afrutado y pueden ser más ligeros, por lo que las características aportadas por la FML no son imprescindibles.

La utilización de *Schizosaccharomyces pombe* en forma inmovilizada, es la alternativa a la FML para vinos tintos que se estudió en este trabajo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se realizó a partir de uva tinta de la variedad tempranillo que fue procesada mediante estrujado, despallado y sulfitado en la bodega experimental del CIDA. Se llevaron a cabo dos vinificaciones (por triplicado) en depósitos de 25 litros: Testigo, y Tratado con levaduras de desacidificación. Los depósitos Testigo fueron sulfitados a razón de 30 mg/l de sulfuroso, se sembraron con LSA y se acondicionaron a 22°C. Los depósitos problema se sulfitaron a razón de 15 mg/l para no inhibir el desarrollo de las levaduras *Schizosaccharomyces pombe*, y fueron inoculados con la dosis correspondiente de levaduras inmovilizadas previa-



mente hidratadas e introducidas en bolsitas de tela de visillo esterilizada y que contenía un contrapeso para impedir que flotasen. Estos depósitos se mantuvieron a una temperatura de 17°C para retrasar el inicio de la fermentación alcohólica y permitir la degradación del málico por las levaduras de la especie *Schizosaccharomyces pombe* inmovilizadas. Todas las fermentaciones se siguieron mediante análisis diario de la densidad, el ácido málico y la temperatura.

Tras la fermentación alcohólica, los vinos testigo fueron mezclados y la mezcla se distribuyó en 6 depósitos de 15 litros y en 6 matraces de 2 litros. Dos envases de cada tipo se inocularon con *Schizosaccharomyces pombe* inmovilizadas, otros dos con bacterias lácticas comerciales y los dos restantes quedaron como testigos. Los depósitos se colocaron en una cámara de la bodega del CIDA a 20°C y los matraces se llevaron a un laboratorio de la Universidad de La Rioja, almacenándolos también a 20°C, y se mantuvieron en esas condiciones durante 1 mes. La evolución de los depósitos se siguió mediante análisis de los ácidos málico y láctico, y de las bacterias lácticas presentes.

3. RESULTADOS

Los tres intentos de inducir la Fermentación Maloalcohólica, tanto antes como después de la fermentación alcohólica, no tuvieron éxito, a pesar de acondicionar los depósitos para favorecer el desarrollo de estas levaduras.

En el ensayo llevado a cabo sobre mosto, el inicio de la fermentación alcohólica se retrasó 4 días en los depósitos inoculados con *Schizosaccharomyces pombe*, pero el contenido de ácido málico no se modificó durante este tiempo, ni tampoco durante el desarrollo de la fermentación. Estos resultados son contrarios a lo encontrado por otros autores [5,6], que emplearon estas levaduras inmovilizadas con éxito, tanto en mostos blancos como en tintos.

En los ensayos desarrollados sobre vino, se obtuvieron los mismos resultados en los depósitos y en los matraces. La fermentación maloláctica de los depósitos sembrados con bacterias comerciales se inició rápidamente y se completó en 10 días. Sin embargo, en los depósitos testigo y en los sembrados con *Schizosaccharomyces pombe*, tardó en arrancar 25 días y su duración fue similar que en los depósitos inoculados (Tabla 1). La acumulación en el medio de ácido láctico, así como el crecimiento de bacterias lácticas confirmó que en el depósito inoculado con *Schizosaccharomyces pombe*, fueron las bacterias y no las levaduras inmovilizadas los agentes de esta transformación. En otros trabajos se han encontrado resultados contradictorios al inocular estas levaduras en vinos. Algunos autores [3,7] demostraron el consumo total de ácido málico aún en ausencia de azúcares. Sin embargo, en otros trabajos se afirma que siempre es necesaria la presencia de azúcar para asegurar la actividad [1,4].

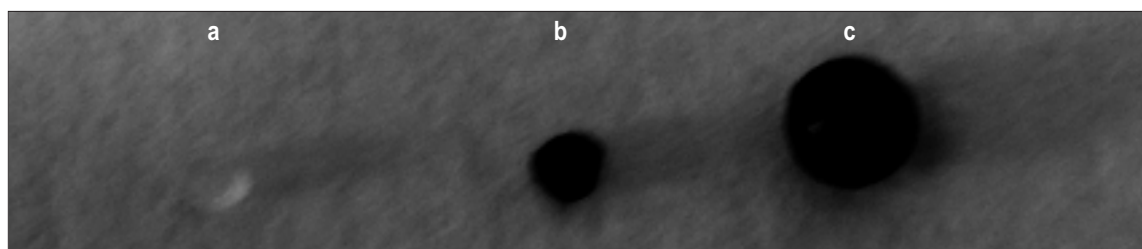
Tabla 1. Evolución de los ácidos málico, láctico y bacterias lácticas durante el ensayo de laboratorio

| Parámetros | Matraces | Fechas | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------|-------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | | 17/10 | 20/10 | 23/10 | 24/10 | 25/10 | 27/10 | 30/10 | 6/11 | 13/11 | 20/11 |
| A. MÁLICO (mg/l) | Testigo | 2.7 | - | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.4 | 1.4 | 0.2 |
| | <i>S. pombe</i> | 2.7 | - | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.4 | 0.8 | 0.3 |
| | <i>B. lácticas</i> | 2.7 | 2.6 | 1.8 | 1.4 | 1.0 | 0.4 | 0.1 | - | - | 0.1 |
| A. LÁCTICO (mg/l) | Testigo | 0.1 | - | - | - | - | - | 0.1 | 0.2 | 1.5 | 1.7 |
| | <i>S. pombe</i> | 0.1 | - | - | - | - | - | 0.1 | 0.2 | 1.6 | 1.7 |
| | <i>B. lácticas</i> | 0.1 | - | 0.3 | - | - | - | 1.1 | - | - | 1.8 |
| Bacterias Lácticas (ufc/ml) | Testigo | 4x10 ² | - | 13x10 ² | - | 14x10 ² | - | 120x10 ² | 15x10 ³ | 2x10 ⁵ | < 10 ⁵ |
| | <i>S. pombe</i> | 4x10 ² | - | - | - | 4x10 ² | - | 79x10 ² | 11x10 ³ | 1x10 ⁵ | < 10 ⁵ |
| | <i>B. lácticas</i> | 4x10 ² | - | 11x10 ⁵ | - | 11x10 ⁵ | - | 1x10 ⁵ | - | < 10 ⁵ | < 10 ⁵ |

Al analizar las perlitas que contenían las levaduras después de los ensayos, se detectó que se había producido una disminución en el diámetro de las mismas de aproximadamente cinco veces respecto al que tenían tras la hidratación inicial, y que además aparecían totalmente teñidas de rojo (Figura 1). La rotura de las perlitas mediante aplastamiento sobre suero fisiológico, y la siembra posterior del ex-

tracto en medio cloranfenicol Glucosa Agar, demostró que las levaduras del interior de las perlitas seguían vivas. Estos datos inducen a pensar que se produjo una deshidratación de las perlitas que impidió el intercambio con el medio, a pesar de que las levaduras del interior seguían vivas. Esta deshidratación se produjo probablemente por la presencia de polifenoles en el líquido.

Fig. 1. Aspecto de las perlitas antes de ser hidratadas(a), después de un ensayo (b) y tras rehidatarlas después de su uso (c)



4. CONCLUSIONES

La disminución de tamaño y la fijación de polifenoles sufrida por las perlitas de alginato que contenían las levaduras de la especie *Schizosaccharomyces pombe* han podido ser las causas de la no funcionalidad de estas levaduras y de la no realización de la fermentación maloalcohólica. Sería necesario estudiar el efecto de la carga polifenólica del líquido ejerce sobre la permeabilidad de las perlitas de alginato, y en definitiva sobre el acceso de las levaduras a los sustratos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. CIANI, M. 1995. **Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells. Evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles.** *J. Appl. Bacteriology*, 79 (6), 631-634
2. LONVAUD-FUNEL A., 2001. **Minireview. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria.** *FEMS Microbiol. Letters*, 199, 9-13.
3. MAGYAR, I.; PANYIK, I. 1989. **Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel.** *Am. J. Enol. Viti.* 40 (4) 233-240.
4. ROSINI G.; CIANI, M. 1993. **Influence of sugar type and level on malate metabolism of immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells.** *Am. J. Enol. Vitic.* 44 (1) 113-117
5. SILVA S.; RAMÓN-PORTUGAL F.; SILVA P.; ABREU S.; TEIXEIRA, M.F.; STREHAIANO, P. 2002. **Démalication de moûts blancs et rouges par des levures *Schizosaccharomyces pombe* incluses dans des billes d'alginate sèches.** *Rev. Française d'Oenologie* 196, 18-21
6. SILVA, S.; RAMON-PORTUGAL, F.; ANDRADE, P.M.; ABREU, S.; TEXEIRA, M.D.; STREHAIANO, P. 2003. **Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*.** *Am. J. Enol. Vitic.* 54(1), 50-55
7. TAILLANDIER P.; RIBA, J.P.; STREHAIANO 1988. **Malate utilization by *Schizosaccharomyces pombe*.** *Bio-technol. Lett.* 10, 469-472
8. THORNTON, R.J.; RODRIGUEZ, S.B. 1996. **Deacidification of red and white wines by a mutant of *Schizosaccharomyces malidevorans* under commercial winemaking conditions.** *Food Microbiol.* 13(6) 475-482