

El papel de la selección de levaduras en la elaboración del vino

JAVIER GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ DE PIÉROLA¹

*Universidad de Salamanca
javiergfdp@gmail.com*

RESUMEN

La elaboración del vino es un arte que se lleva practicando desde hace más de 4000 años y que actualmente se ha convertido en una ciencia que es capaz de mover miles de millones de euros al año. En este proceso, las levaduras tienen una vital importancia ya que son las responsables de la fermentación alcohólica que transforma el jugo de uva exprimido en vino. Sin embargo, no todos los vinos son iguales, ni siquiera parecidos, y por eso la utilización de una levadura u otra marcará la diferencia entre uno y otro. Actualmente existe un gran interés por la selección de levaduras que potencien las características del vino para su venta en forma de levadura seca activa. Es especialmente importante su utilización en la elaboración del vino de regiones con poca estabilidad, en cuanto a la calidad de sus vinos. Por tanto el objetivo de este trabajo es recoger las características que aportan ciertas levaduras al vino y que las hace válidas para ser elegidas por un enólogo, acercando también el término terroir y su azarosidad e introduciendo una visión a la ingeniería genética en el campo.

Palabras clave: vino, levaduras, fermentación alcohólica, terroir.

SUMMARY

Wine making is an art that has been practiced for over 4000 years and nowadays it has now become a science that moves millions of euros a year. In this process, yeasts have vital

¹ Javier GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ DE PIÉROLA, es estudiante de cuarto de Grado en Biología en la Universidad de Salamanca.

importance as they are responsible for the alcoholic fermentation because they transform the juice of the squeezed into wine. However, not all wines are the same, or even similar, and therefore the use of a yeast or another one will make the difference between one and the other. Currently there is a great interest in the selection of yeasts that enhance the characteristics of the wine for sale in form of active dry yeasts. Its use in winemaking is important in regions with little stability in the quality of their wines. Thus, the objective of this work is to collect the characteristics that certain yeast bring to the wine and make them valuable to be chosen by a winemaker. In addition, we will approach to terroir term and its serendipity introducing the actual views regarding the basis for the engineering in this field.

Key words: wine, yeasts, alcoholic fermentation, terroir.

1. INTRODUCCIÓN

Es un hecho que el consumo de alcohol es actualmente un hábito frecuente en la población mundial, pudiendo llegar a considerarse una enfermedad debido a su consumo excesivo y un beneficio para la salud si se toma con moderación en ciertas bebidas. Para llegar a comprender este hábito hay que remontarse hasta antes de la escritura, cuando nuestros ancestros buscaban las propiedades placenteras de las bebidas alcohólicas para despertar su creatividad.

Existen vínculos entre los grandes pasos del hombre, tales como la agricultura o el origen de la lengua y el alcohol². En el 7000 a.C. encontramos la primera evidencia de una bebida alcohólica en China, a base de un coctel de arroz, bayas de espino, uvas silvestres y miel³. En las montañas del Cáucaso y de Zagros, en la actual Georgia e Irán respectivamente, se comenzaron a cultivar las primeras uvas con el objeto de elaborar vino. Desde allí podemos seguir su evolución por todo el globo hasta estar ya completamente integrado en la dieta y la cultura griega para el 4000 a.C. Entre el 500- 100 a.C. se cultivaba en el sur de Europa, norte de África, China e India.

Pero no sería hasta finales del siglo XIX, momento en el que Louis Pasteur descubriera el papel de las levaduras en la fermentación alcohólica, cuándo se produciría la evolución en la elaboración del vino, pasando de ser un mero “arte

2 PRETORIUS, I.S., “Solving yeast jigsaw puzzles over a glass of wine: Synthetic genome engineering pioneers new possibilities for wine yeast research”, *EMBO Report* 18 (2017), nº 11, p. 1875-1884.

3 MCGOVERN, P.E., ZHANG, J., TANG, J., ZHANG, Z., HALL, G.R., MOREAU, R.A., NUÑEZ, A., BUTRYM, E.D., RICHARDS, M.P., WANG, C., “Fermented beverages of pre-and proto-historic China”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), nº 51 p. 17593-17598.

práctico” a una ciencia aplicada⁴. De esta forma, la elaboración del vino comenzó a requerir una trazabilidad adecuada con el objeto de que los enólogos modernos puedan crear un producto que satisfaga las exigencias de sus clientes y que se haga hueco en el mercado⁵. Según el Observatorio Económico del Mercado del Vino, este mercado mueve más de mil millones de euros cada semestre solo en España. El director de dicha institución, Rafael del Rey, aboga por la potenciación de la marca España y un impulso de los vinos de calidad. Es por ello que hoy en día existe tanto interés por el conocimiento de los procesos que hacen que el zumo de uva exprimido se transforme en vino. En este punto hay que entrar a valorar qué es lo que define a la bodega, la calidad a alto coste, ya sea por los requerimientos específicos o por el peligro de perder un lote, o la cantidad a bajo coste, que puede llegar a quitar identidad al producto.

El objetivo de este trabajo es revisar el papel que cumple la selección de levaduras en la fermentación en el vino, analizándose la importancia de la elección de unas cepas de levaduras respecto a otras, decisión que debe tomar el enólogo de la bodega, abarcando las diferentes propiedades que serán valoradas en cada una de ellas y que afectarán al producto final.

2. PROCESO DE VINIFICACIÓN

La información sobre la elaboración de vino es tan antigua como la civilización misma, y cada uno de los pueblos que la han descrito han mostrado alguna técnica propia, típica de sus tierras y en ocasiones difícilmente extrapolable. Los procedimientos y técnicas han variado muy poco en lo esencial desde los inicios de este arte. En base a esto, a continuación se narra resumidamente el proceso de vinificación que se realiza en una bodega tal y como ha sido descrito por J. Hidalgo Togores⁶:

- **Recepción materia prima.** La maduración, vendimia y transporte de la uva determinará en gran medida el valor del vino que se quiere producir. Es un paso crucial en el que la uva puede comenzar a fermentar, sufrir roturas y ser infectada por organismos no deseados; en especial las uvas blancas.

4 LITI, G., “The Natural History of Model Organisms: The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*” *Elife* 4 (2015)

5 GOOLD, H.D., KROUKAMP, H., WILLIAMS, T.C., PAULSEN, I.T., VARELA, C., PRETORIUS, I.S., “Yeast’s balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines” *Microb Biotechnol* 10 (2017) n°2, p. 264-278.

6 J. HIDALGO, *Tratado de enología*. 2003, 2 ed.

- **Despalillado.** Consiste eliminar los raspones y escobajos que tienen los racimos. Reduce la astringencia del vino y aumenta su color ya que este se fija a la materia colorante de los raspones. La retirada de los raspones dificulta el estrujado y disminuye la fuente de levaduras endógenas de la viña.
- **Estrujado.** Sustituye al antiguo proceso de “pisado”. Gracias a este proceso podemos separar la parte sólida de la uva, se realiza la transferencia de los microorganismos endémicos del mosto y se aireará el medio, permitiendo el arranque de la fermentación.
- **Maceración.** Se entiende por el proceso de extracción de componentes contenidos en la parte sólida de la vendimia tras el estrujado. Es la principal diferencia en el proceso entre vinos blancos y tintos. Según el tipo de uva que utilice la bodega la maceración transcurrirá en un tiempo y con unas características determinadas.
- **Adición de sulfuroso.** La funcionalidad la va a aportar el anhídrido sulfuroso (SO_2), un gas con múltiples propiedades conservantes. Sin embargo, el método más cómodo y utilizado para añadirlo no es directamente en forma de gas sino mediante el metabisulfito potásico ($\text{K}_2\text{O}_5\text{S}_2$), un polvo cristalino que genera anhídrido sulfuroso en disolución. En algunas regiones, la adición de potasio podría ser un problema pero generalmente son más los beneficios conservantes que los inconvenientes. Destacan su papel antioxidante y su efecto sobre el crecimiento de bacterias. La dosis máxima permitida de este producto varía en función del tipo de vino que se vaya a hacer⁷. El SO_2 actúa como fungistático en concentraciones bajas y pH elevado y fungicida a altas concentraciones y medio ácido. Sin embargo, a las mismas concentraciones su actividad antibacteriana es mucho mayor, afectando primero a bacterias lácticas y más tarde a las acéticas, que tienen mayor resistencia. Además, puede afectar al aroma y sabor del vino.

La dosis aplicada al mosto debe ser medida con cautela ya que una excesiva concentración de SO_2 podría afectar a la fermentación maloláctica que sucede tras la fermentación alcohólica (FA). Incluso las dosis normales afectan al transcurso de la fermentación produciendo una selección de levaduras. Su aplicación en exceso de manera premeditada puede frenar el desarrollo de las levaduras endógenas facilitando la implantación de levaduras preseleccionadas.

7 LEÓN, B., “Estudio comparativo de tres levaduras comerciales: CLOS, CT007 y VELLUTO en vinificación de Tempranillo y Mazuelo en la D.O.Ca. Rioja” *Trabajo Fin de Grado de la Universidad de la Rioja* (2016)

- **Encubado.** Es el proceso de introducción del mosto ya exprimido a los tanques de fermentación. En el caso de los vinos tintos este encubado se produce con la masa de hollejos puestos en flotación sobre el mosto, formando el denominado “sombbrero” que sirve de soporte a las levaduras.
- **Siembra.** Es un paso opcional muy frecuente en las regiones vitivinícolas frías, dado que una temperatura excesivamente baja limita el crecimiento de las levaduras endógenas. Por ello es importante forzar el inicio de la fermentación con un inóculo externo de levaduras que se impondrá sobre la flora indígena.
- **Fermentación Alcohólica.** Tras el encubado del mosto se produce una rápida multiplicación de los microorganismos, comenzando la FA a partir de la octava o duodécima hora de cultivo si este ronda los 25°C (caso del vino tinto) o a las 20-24 horas si este ronda los 18°C (vinos blancos).
- **Remontado.** Es la extracción del mosto de la parte inferior hasta la parte superior del tanque. Se “remoja” el sombrero, se homogeniza la mezcla y se airea el medio.
- **Descube y prensado.** El descube se refiere al vaciado del tanque de fermentación. El contenido es transportado a otro nuevo recipiente y los restos de hollejos serán prensados.
- **Fermentación Maloláctica.** Este proceso comienza al haber finalizado la FA y corrige la acidez producida. Esta fermentación es llevada a cabo por las bacterias lácticas y consiste en la transformación del ácido málico (de sabor herbáceo o “verde”) presente en el vino a ácido láctico (de sabor más agradable y mejor aroma). No es extraño que las bodegas hagan inóculos de estas bacterias para iniciar la fermentación maloláctica.
- **Clarificación:** El objetivo de este proceso es eliminar niveles excesivos de ciertos componentes sólidos para lograr transparencia y garantizar la estabilidad fisicoquímica del vino. Se limpian sustancias en suspensión en el vino como levaduras, bacterias o proteínas. Sin embargo es muy difícil la eliminación total de estos componentes.
- **Crianza.** Proceso por el que ciertos vinos son sometidos a un proceso de envejecimiento o evolución en barricas.

3. METODOLOGÍA

La recopilación de la información necesaria para la redacción de este trabajo se ha realizado mediante la búsqueda de revisiones y artículos científicos. Estos

se han encontrado en los principales buscadores de la web, tales como Pubmed, Science direct o Google académico utilizando las palabras clave: Alcoholic fermentation, comercial wine yeast, killer toxins, *non-Saccharomyces yeast*, raspberry flavour, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces*, terroir, *Torulaspora*, Velluto, vineyard, wine fermentation, Yeast 2.0, yeast interactions y yeast.

Además se ha utilizado como base el libro de J. Hidalgo Togores “Tratado de enología” publicado en 2003 para la organización del índice.

Se ha revisado la legislación vigente a día 18/06/2018 para ciertas definiciones u ordenanzas acerca de organismos modificados genéticamente dentro de la Unión Europea.

4. EL PAPEL DE LAS LEVADURAS

4.1. LEVADURAS VÍNICAS

Las levaduras se definen como hongos unicelulares ascomicetes o basidiomicetos cuyo crecimiento vegetativo resulta predominantemente de gemación o fisión, y que no forman sus estados sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero. Abarcan una centena de géneros que representan más de 700 especies, de los cuales al menos 15 tienen relación con la elaboración del vino⁸. Durante todo el proceso de vinificación que se ha explicado en el apartado anterior las levaduras están presentes y se van desarrollando, aportando características propias de cada una y marcando la diferencia que permite apreciar que un vino es diferente de otro. Estos microorganismos llevan a cabo la FA convirtiendo los glúcidos del mosto, tanto glucosa como fructosa, en etanol y CO₂.

Sin embargo no es esa la única reacción que se produce. Todos los cambios organolépticos que sufre el mosto hasta convertirse en vino suceden durante esta etapa, fruto en gran medida de los metabolitos que surgen del crecimiento microbiano durante la fermentación. Posteriormente, el vino puede seguir sufriendo modificaciones. De entre las levaduras más conocidas de este proceso, el género *Saccharomyces* ha tenido la mayor parte de la atención del mundo científico por su utilidad como fermentador, y así especies tales como *S. cerevisiae* (SC), *S. bayanus*, *S. pastorianus* y *S. paradoxus* entre otros⁹ son bien conocidas en el campo. Pero *Sa-*

8 PRETORIUS, I.S., “Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking” *Yeast* 16 (2000) nº 8, p. 675-729.

9 BELDA, I., ZARRAONAINDIA, I., PERISIN, M., PALACIOS, A., ACEDO, A., “Corrigendum: From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept” *Front Microbiol* 8 (2017). p. 821

ccharomyces es sólo una pequeña fracción de la comunidad microbiana que habita el mosto¹⁰. De hecho, este género rara vez se aísla de la superficie de la uva o del suelo de los viñedos⁷. Géneros tales como *Candida*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, etc. aparecen también en el jugo de la uva y tienen una importancia notoria en las características organolépticas del vino, aunque los datos genómicos sugieren que la diversidad puede ser mucho mayor⁸. Es bien sabido que las levaduras no-*Saccharomyces* modifican los aromas y sabores del vino^{11,9} pero también pueden interactuar con *Saccharomyces* en su crecimiento o metabolismo⁹. Estas levaduras están caracterizadas por un bajo poder fermentativo y una sensibilidad importante frente al etanol¹². Las no-*Saccharomyces* son las encargadas de arrancar la fermentación y sus poblaciones van variando conforme lo hace el grado alcohólico (Figura 1). De la mano con el aumento de grado alcohólico va la reducción de nutrientes y juntas generan una presión selectiva que determinará la especie que predomine en cada etapa. *S. cerevisiae* es la más cualificada para la alta graduación alcohólica y por eso es ella la que lleva a cabo la mayor parte de la fermentación⁷. Sin embargo, aunque SC sea la más competente, existen multitud de cepas de esta especie y se ha demostrado que en las mismas condiciones de mosto, diferentes cepas de SC producen vinos con diferentes características tanto químicas como organolépticas¹³.

Se han encontrado 93 especies de levadura diferentes asociadas a 49 variedades de uva sólo en 22 países diferentes¹⁴ pero siguen apareciendo nuevas variedades. Fruto de esta diversidad surge el término “Terroir”. Este término hace referencia a la diversidad de cepas e interacciones que asociadas a las variaciones regionales aportan distinción a cada vino¹⁵. Estas características se han demostrado empíricamente desde hace siglos pero su relación con la microbiota no se ha estudiado detenidamente todavía. “Solo en España hay 92 zonas, que producen distin-

10 MORRISON-WHITTLE, P., GODDARD, M.R., “From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation” *Environmental microbiology* 20 (2018), nº 1, p. 75-84.

11 Fleet, G., “Yeast interactions and wine flavor” *International Journal of Food Microbiology* (2003) 86, nº 1-2, p. 11-22.

12 FERNÁNDEZ, S.I.E., “La influencia de la tecnología de la vinificación en la microbiología y el desarrollo de la fermentación alcohólica” *Tesis doctoral de la Universidad de La Rioja* (2005).

13 BELDA, I., NAVASCUÉS, E., ALONSO, A., MARQUINA, D., SANTOS, A., “Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas” *REDUCA (Biología)* (2014) 7, nº 1 p 1-14.

14 EL DAROV, M.A., KISHKOVSKAIA, S.A., TANASCHUK, T.N., MARDANOV, A.V., “Genomics and Biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains” *Biochemistry Mosc.* 81 (2016), nº 13, p. 1650-1668.

15 BOKULICH, N.A., COLLINS, T.S., MASARWEH, C., ALLEN, G., HEYMANN, H., EBELER, S.E., MILLS, D.A., “Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics” *MBio* 7 (2016) nº3, p e00631-16.

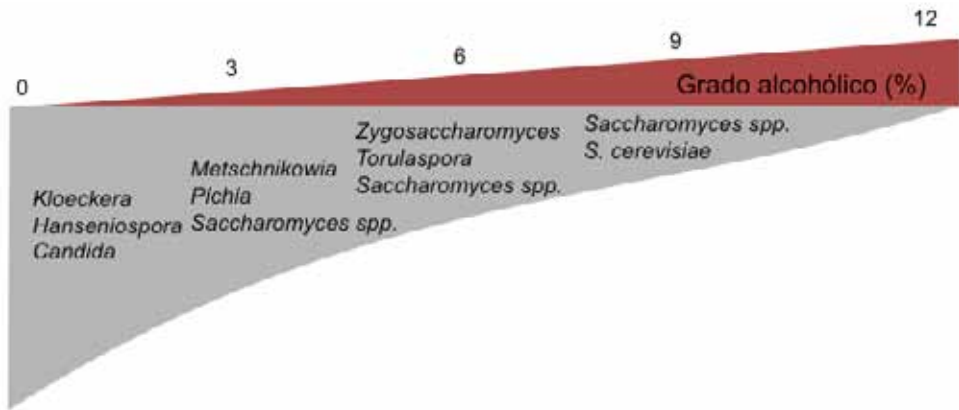


Figura 1: Representación de la evolución de los géneros de levaduras que intervienen en la FA⁸

tos denominados vinos Denominación de Origen Protegida (DOP), de las cuales 69 son Denominación de Origen (DO), 2 son Calificados Denominación de Origen (DOCa), 7 son vinos de calidad con Indicación Geográfica (Vino de Calidad) y 14 son Vino de Pago⁷⁸. Cada región tiene su microflora única, no solo de especies, sino también de cepas dentro de cada especie. Así, se sabe que durante el transcurso de la FA no solo cambian las especies dominantes según el estrés que soporten sino que además hay un crecimiento subyacente sucesivo de diferentes cepas de una misma especie que predominan según el momento del proceso y las características iniciales del mosto¹⁶, características que vienen definidas por las condiciones climatológicas de la añada.

Bokulich et al. (2016) han demostrado que la microbiota de la uva y los perfiles metabólicos del vino distinguen regiones vitivinícolas, si bien el grado de relación con la composición química del vino no está todavía suficientemente clara. En este mismo estudio se comprobó como un análisis microbiano del mosto de uva puede predecir las características del producto final y ayudar al enólogo en la toma de decisión durante el proceso de vinificación. En dicho caso el enólogo podría evitar contaminaciones indeseadas, paradas de fermentación o incluso conocer potenciales caracteres de deterioro del vino, como por ejemplo la actividad de ciertas bacterias lácticas que generen histamina descarboxilasa¹⁴.

La forma más artesanal o antigua de hacer vino depende exclusivamente de la microbiota que se encuentra en la superficie de la vid y en la de la bodega. Pero,

16 FLEET, G.H., "Wine yeasts for the future" *FEMS Yeast Research* 8 (2008), nº7, p. 979-995.

aunque el terroir aporte distinción y personalidad al vino, se trata de un proceso biológico espontáneo y azaroso⁷. Por consiguiente esto puede ocasionar múltiples problemas si la añada viene con una carga microbiana inferior a la habitual, si se ha usado antifúngico para tratar la vid o una época de lluvias que “lave” la planta durante la vendimia⁷. Esto puede generar uno de los mayores problemas que se presenta en la elaboración de los vinos, que no arranque la fermentación alcohólica o bien, una vez arrancada, que se produzca una parada de la fermentación⁵. En cualquiera de los casos, esto suele estar asociado a una reducción de la población viable de levaduras endógenas iniciales¹¹.

Esta parada se puede prever con un análisis de la densidad y otros parámetros, pudiéndose tomar medias al respecto, aunque estas implican la alteración del curso natural del proceso⁵. Algunos factores que pueden alterar el normal desarrollo de la fermentación pueden ser los siguientes:

- Concentración elevada de azúcar: No solo es limitante a la hora de arrancar la fermentación por la presión osmótica, sino que además puede causar problemas al final de la fermentación por un elevado grado alcohólico o azúcar residual. Además, las bacterias lácticas y otros microorganismos con metabolismos aerobios podrían descomponer el exceso de azúcar causando la conocida “quiebra láctica” del vino.
- Etanol y otros alcoholes: Altera la permeabilidad de membrana⁵. Una excesiva concentración de etanol puede inhibir la absorción de solutos, inhibiendo el crecimiento de las levaduras y con ello su viabilidad a la par que su capacidad para terminar la fermentación.⁷
- Temperatura de la fermentación: Dentro de los rangos que soportan las distintas levaduras, se ha demostrado que a mayor temperatura, la fermentación es más rápida, la población es más viable y la asimilación del nitrógeno es mejor¹¹. Temperaturas más bajas pueden tener un efecto inhibitorio en el crecimiento microbiano y tener riesgo de un retardo de esta fermentación e incluso su detenimiento. Por el contrario, unas temperaturas altas podrían provocar un arranque de fermentación excesivo y, por culpa del metabolismo microbiano, hacer que el mosto alcance temperaturas superiores a 30-35°C, lo que podría detener la fermentación de igual manera que las temperaturas bajas⁵.
- Carencias nutricionales: Para un desarrollo normal es indispensable una cantidad mínima de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), lo que corresponde a un mínimo de 140-150 mg/l. Algunos de esos son la biotina, el ácido pantoténico, nicotinamida o tiamina, muy importante en las descarboxilaciones. Por otro lado un exceso puede limitar el crecimiento microbiano influyendo en la aparición de otros compuestos indeseables como la urea. Otras sus-

tancias que pueden afectar al normal desarrollo del crecimiento microbiano es la falta de factores de crecimiento, que no suelen ser un problema para arrancar la fermentación pero que pueden serlo si se agotan durante el transcurso de la misma¹¹.

- Niveles de oxígeno: Si bien la fermentación por definición es un proceso anaerobio, todos los manuales de elaboración de vino recomiendan la aireación del mosto en fermentación, y así lo hacen las bodegas. Esto es necesario por un efecto que se producen en ciertas levaduras, *S. cerevisiae* entre ellas, llamado efecto “Crabtree” o “Pasteur negativo”. Este efecto descrito por el inglés H.G. Crabtree describe el fenómeno por el cual, ante una concentración elevada de glucosa, el O₂ tiene un efecto activador de FA. Es por ello que una anaerobiosis estricta no es la manera óptima de arrancar una fermentación.
- Antagonismo entre microorganismos: Ciertos mohos, virus o bacterias pueden ocasionar un bloqueo en el arranque del crecimiento microbiano, con su consiguiente efecto en la FA⁵. Además se ha encontrado una relación entre detenimientos de fermentaciones relacionados con regulación epigenética por interacciones entre levaduras y bacterias que afectan a la regulación de la represión por glucosa.

Estos problemas asociados con la FA pasaron a un segundo plano cuando en 1890 el botánico y enólogo Müller-Thurgau introdujo el inóculo de levaduras en el mosto como práctica enológica, adaptando las técnicas que utilizaba Hansen en la Cervecería Carlsberg¹⁷. Un siglo más tarde aparecieron en el mercado las “Active Dry Wine Yeast” o LSA en castellano. De esta forma, las productoras de vino a gran escala pueden utilizar las levaduras seleccionadas o “starters” como forma de asegurar el proceso, obteniendo unas características organolépticas previamente caracterizadas⁷.

Estos *starters* se añaden al mosto en el paso de la “siembra” y van a imponerse sobre la flora microbiana indígena que ha sido debilitada por el anhídrido sulfuroso. Esta siembra se realiza mediante el “pie de cuba” con levaduras autóctonas seleccionadas o mediante LSAs comerciales, pero también pueden ser añadidos factores de crecimiento y desarrollo de levaduras. La técnica del pie de cuba consiste en generar en un recipiente aparte una fermentación previa a la vendimia que se aña-

17 PETRUZZI, L., CAPOZZI, V., BERBEGAL, C., CORBO, M.R., BEVILACQUA, A., SPANO, G., SINIGLIA, M., “Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits” *Frontiers in microbiology* 8 (2017), p. 995.

de junto al nuevo mosto cuando se encuba, de tal forma que se genera un cultivo iniciador que arrancará de manera efectiva la fermentación (se añade poblaciones en torno a $2-3 \cdot 10^6$ individuos/ml). Puede ser con una población endógena de la zona, muy utilizada en zonas donde el “terroir” está bien valorado, o con LSA, para rehidratar las levaduras y despertar su metabolismo inactivo. También es posible la adición directa de algunas LSA en el mosto sin un previo pie de cuba. El uso de LSA es especialmente relevante en vinos blancos que tienen una muy baja cantidad de organismos indígenas dado que no sufren proceso de maceración y su fermentación se realiza a menor temperatura⁵.

La industria de los LSA en sus inicios usaba solo cepas de *Saccharomyces*¹², pero la nueva tendencia es tratar de analizar cultivos puros de fermentaciones espontáneas para seleccionar las levaduras con mejores características enológicas, incluyendo a las levaduras no-*Saccharomyces*¹². La mayoría de bodegas utilizan *starter* seleccionado para sus fermentaciones¹⁸ sobre todo en países emergentes con poca tradición vitivinícola⁵.

Hay cientos de levaduras en el mercado a disposición del enólogo, y la elección de una de ellas podía tener un efecto significativo en la calidad del vino. La controversia surge a la hora de comenzar la fermentación. El enólogo debe buscar la elaboración de un producto distinguible, y hay sectores en el gremio que consideran que el uso exclusivo de *S cerevisiae* mediante LSA ha conducido a una falta de complejidad organoléptica si las comparamos con las fermentaciones espontáneas exitosas¹³.

4.2. CRITERIOS BÁSICOS DE SELECCIÓN DE LEVADURAS Y SUS APORTACIONES AL PRODUCTO FINAL

Si queremos seleccionar una levadura que aporte las características deseadas para nuestro producto existen dos posibilidades: su búsqueda directa en los viñedos o el uso de las técnicas de ingeniería genética¹². Si aislamos una levadura endémica debemos realizar un análisis posterior de sus características enológicas (Tabla 1) y determinar su potencial como levadura “útil” para nuestro proceso¹⁵. Por otro lado, las posibilidades que aporta la ingeniería genética, dado los estudios sobre el genoma de *Saccharomyces*, tienen un gran potencial en un futuro próximo¹.

Dentro de las levaduras endémicas de la zona podremos seleccionar las cepas con mejores características y usarlas para el inóculo de los mostos de la región, los

18 MARSIT, S., DEQUIN, S., “Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review” *FEMS yeast research* 15 (2015) nº7.

cuales responderán mejor al inóculo de levaduras que los de regiones diferentes¹². Aun así algunas se patentan y distribuyen por todo el mundo.

A la hora de elegir si una levadura cumple las condiciones para servir como *starter* en la producción del vino deseado hay que tener en cuenta el conjunto global de parámetros que se describen en la Tabla 1. A día de hoy, ninguna de las levaduras que existen en el mercado posee todas las características citadas anteriormente. Entre dichas características, las que tienen un mayor impacto en la producción del vino son las que describiremos en los siguientes apartados.

Propiedades fermentativas	Propiedades tecnológicas	Propiedades sensoriales
<ul style="list-style-type: none"> - Inicio rápido de fermentación - Alta eficacia fermentativa - Tolerancia al estrés por etanol - Osmotolerancia - Rendimiento alcohólico moderado - Rango óptimo de temperatura - Producción de biomasa moderada - Resistencia a la acidez 	<ul style="list-style-type: none"> - Estabilidad genética - Tolerancia a SO₂ - Escasa producción de acetaldehído - Bajas necesidades de compuestos nitrogenados - Capacidad de floculación - Compactación del sedimento - Factor killer - Resistencia a la desecación - Actividad proteolítica - Marcado genético 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja formación de H₂S - Baja producción de acidez volátil - Baja producción de alcohol - Producción de glicerol y precursores - Consumo de ácido málico - Producción de ésteres volátiles fermentativos - Rotura de precursores glicosídicos y tiólicos - Facilidad de autólisis - Bajo potencial de carbamato de etilo

Tabla 1: *Propiedades valorables como criterios de selección de cepas de levadura con características enológicas óptimas.*

4.2.1. Inicio rápido de la fermentación

Un *starter* debe ser capaz de imponerse sobre la flora indígena que se encuentre en el mosto. El medio que encuentran las levaduras al comenzar la fermentación es un medio hiperosmótico (> 200 g azúcar/L), con un pH bajo, con sulfuroso

añadido en la mayoría de los casos y probablemente restos de fungicidas¹⁹. Para superar esto, por término medio se añade en torno a 2-3 *10⁶ levaduras por mililitro pero además es importante que estos individuos tengan la capacidad de iniciar su fase exponencial de manera abrupta en las primeras horas de fermentación. Este punto va de la mano con la resistencia al sulfuroso, que es un agente antioxidante, antibacteriano y fungistático o fungicida que puede afectar al crecimiento de la cepa, aunque principalmente sirve para eliminar los individuos indígenas que no soportan bien el sulfuroso. Sin embargo, la tendencia actual nos lleva a una reducción de su utilización en el vino ya que ciertos estudios han demostrado que puede ser perjudicial para la salud.

Hay que diferenciar en este apartado dos términos similares pero que poco tienen que ver, la “vitalidad” y la “viabilidad”. La primera se refiere a la actividad metabólica de la cepa de forma que es directamente proporcional con su aptitud para arrancar la fermentación, mientras que viabilidad se define como la proporción relativa de células vivas o que son capaces de reproducirse a partir del inóculo. En este aspecto la industria tienen un gran papel a la hora de poder influir en la forma de cultivar las levaduras para aumentar el grado de viabilidad y vitalidad^{7,5}, donde uno de los papeles más importantes lo juega los niveles de trealosa y glucógeno acumulada dentro de las levaduras y que tiene gran variabilidad en condiciones ambientales⁷.

La capacidad de iniciar rápido la fermentación cobra especial relevancia a la hora de arrancar una fermentación que se ha detenido y se corre el riesgo de perder el lote por oxidaciones no deseadas o aparición de mohos. Si una fermentación se para encontraremos un medio pobre en glucosa y otros nutrientes, con un pH bajo y cierta cantidad de etanol. La levadura Uvaferm 43 RESTART™ [*S. cerevisiae* (ex *bayanus*)], es un ejemplo claro de cepa utilizada para el arranque de fermentaciones parada. Ha sido desarrollada de manera natural por Lallemand en colaboración con Inter-Rhône como ocurrió con su predecesora la Uvaferm 43™. Esta fue seleccionada por ser capaz de consumir niveles de fructosa superiores a otras levaduras (Figura 2)^{20,21}, incluso a niveles limitantes de nitrógeno¹⁹ y dado que la fructosa es el glúcido que más abunda en una fermentación parada, esta característica la hace capaz de relanzar dichas fermentaciones.

19 MATALLANA, E., ARANDA, A., “Biotechnological impact of stress response on wine yeast” *Letters in applied microbiology* 64 (2017) n° 2, p. 103-110.

20 DUMONT, A., RAYNAL, C., RAGINEL, F., JULIEN, A.-O., SUÁREZ, C., HERAS, J.M., “Capacidad de las levaduras enológicas de consumir fructosa” *Semana vitivinícola* 3237 (2008) p 2502-2507.

21 JULIEN, A.-O., SILVANO, A., THÉODORE, D., RAGINEL, F., “New tools to help overcome stuck GO BACK fermentations in wine” (2017) *WnieLand Media* 10, n° 10, p 1-10.

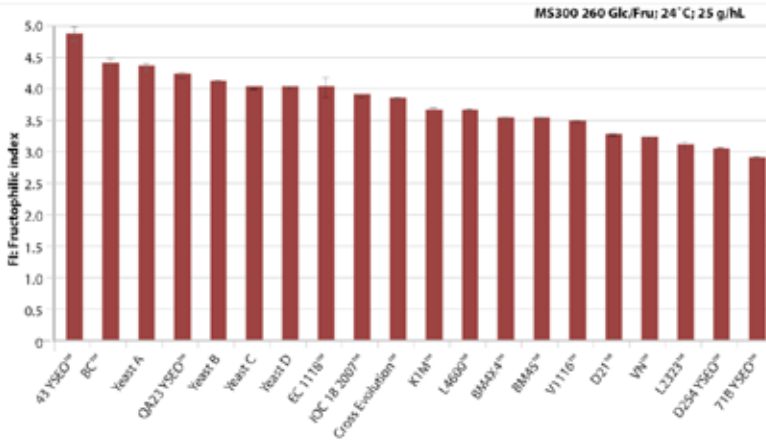


Figura 2: Afinidad de fructosa de diferentes levaduras comerciales²⁰.

Para desarrollar Uvaferm 43 Restart se utilizó un proceso de pre-aclimatación, sobretodo exponiendo a las levaduras a grandes concentraciones de etanol, que hizo a las levaduras Uvaferm 43™ más robustas y adaptables al nuevo medio (Figura 3). Con esto, asimilan más fácilmente fructosa que otras cepas, resiste hasta 16% de etanol y no altera las características del vino.

Azúcares (g/l)

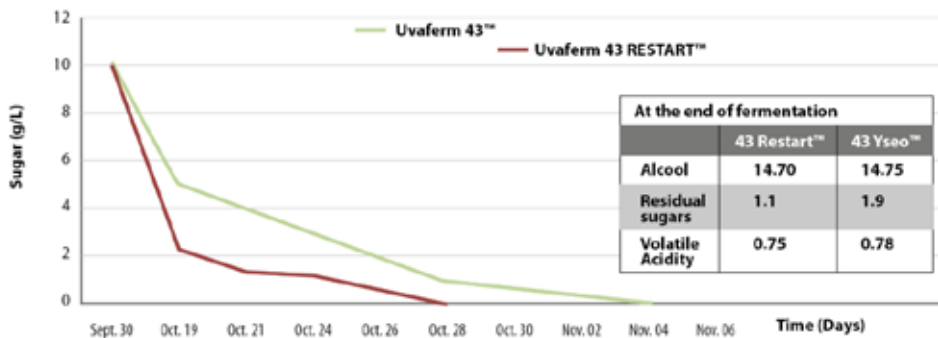


Figura 3: Gráfica comparativa de la capacidad de consumo de azúcares de Uvaferm 43™ y su cepa mejorada Uvaferm 43 Restart²⁰.

4.2.2. Rendimiento alcohólico

El agotamiento de los azúcares es obligatorio si queremos un correcto equilibrio del vino. El criterio se aplica necesariamente al 98% de azúcar de la uva que se tiene que convertir en etanol y CO_2 ⁷. El rendimiento alcohólico es el valor de consumo de azúcares para generar 1% de alcohol etílico. Este es un punto a tener en cuenta en la levadura elegida, ya que la demanda comercial exige cada vez vinos de menor graduación, ya sea porque empeora el vino o por conciencia social sobre la salud. A su vez, por culpa del cambio climático, cada vez la uva tiene mayor concentración de azúcar y genera un grado alcohólico más elevado, siendo esto más notorio en las vides del Nuevo Mundo²². Durante la fermentación, aproximadamente el 95% del azúcar se convierte en etanol y dióxido de carbono, el 1% en material celular y el 4% en otros productos como el glicerol. Se creía que la sobreexpresión de genes de la ruta glicolítica daría como resultado un aumento en la velocidad de formación de azúcar, sin embargo parece ser que existe un paso limitante en el rendimiento alcohólico a nivel de los transportadores de hexosas⁷.

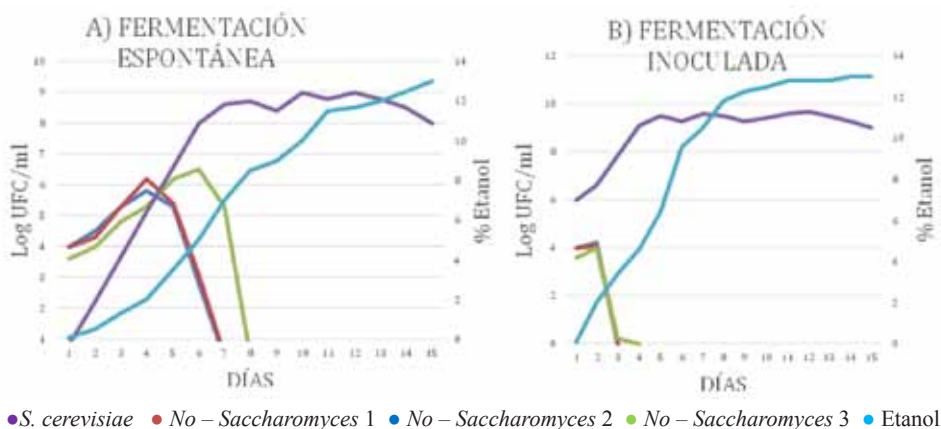


Figura 4: Modelo hipotético de evolución de la concentración de alcohol y de ciertas especies durante la fermentación alcohólica del vino.

En este contexto hay que citar que SC no es la especie más adecuada para un control moderado del grado alcohólico²¹. Por ello J. Hidalgo propone una doble fermentación. Una primera dirigida por levaduras *no-Saccharomyces*, con menor rendimiento alcohólico por lo general, hasta el 6-8% de etanol, dónde acaba la

22 CIANI, M., MORALES, P., COMITINI, F., TRONCHONI, J., CANONICO, L., CURIEL, J.A., ORO, L., RODRIGUES, A.J., GONZALEZ, R., "Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines" *Front Microbiol* 7 (2016), p. 642.

viabilidad de estas, y el uso de un starter de SC para evitar la parada de la fermentación. Esto recordaría más a un proceso de fermentación espontánea (Figura 4A) que a una fermentación con inóculo artificial (Figura 4B) ya sea por el metabolismo de las propias levaduras o por su intervención en la curva de crecimiento de SC²¹. Este método se ha aplicado ya en la industria cervecera²³.

Los datos de catabolismo de azúcar de estas especies no-Saccharomyces aún son escasos, aunque parece que el bajo rendimiento de estas se debe a la capacidad o no de desarrollar el efecto Crabtree y al cociente respiratorio²⁴. Quirós recoge que estas especies tienen gran potencial como reductores del grado alcohólico pero que es una línea que hay que seguir estudiando. Una levadura comercial que cuenta con estas características es Level 2 Solution Biodiva™ (*Torulaspora delbrueckii*) que alcanza un máximo de 10% de etanol y que actualmente es comercializada por Lallemand Bio. Este starter indica en sus propias instrucciones de uso que a las 24 horas de inocularlo se debe hacer otro inóculo de *S. cerevisiae* que tomará las riendas de la fermentación. Esto es debido a que la fermentación no podría terminarse dado su baja tolerancia a etanol, sin embargo su función en ese punto de la FA ya se habrá cumplido y la graduación del vino será menor al acabar esta. Bely et al. demostraron que la combinación de estas dos especies consigue reducir el grado alcohólico si se inoculan en una proporción 20:1 (*Torulaspora*: *Saccharomyces*), pero se encontraron con una fermentación detenida al hacerlo de forma secuencial.

Culture trial	Mix. cell population	Residual nitrogen	Ethanol	Glycerol	Volatile acidity	Acetaldehyde	Yield ethanol	
	AD10max	(mgN/L)	(% vol.)	(g/L)	(g/L acetic acid)	(mg/L)	(g/g)	
Pasteurized must	Pure <i>S. cerevisiae</i>	11.8	16.00±2.00	14.23±0.11	15.89±0.36	1.05±0.02	38.50±5.33	0.47
	Pure <i>T. delbrueckii</i> ^a	6.2	107.00±10.00	6.92±0.33	10.93±1.02	0.27±0.10	25.20±5.00	0.44
Non-pasteurized must	Pure <i>S. cerevisiae</i>	11.2	21.67±2.06 ^c	14.10±0.33 ^a	15.60±1.06 ^b	0.89±0.16 ^d	45.63±5.86 ^e	0.48
	Pure <i>T. delbrueckii</i> ^a	7.2	79.00±9.54 ^b	10.47±0.35 ^a	13.47±0.35 ^b	0.47±0.04 ^{cdm}	41.83±3.06 ^e	0.45
	Mixed T.S 5:1	11.1	23.67±1.53 ^c	14.27±0.35 ^a	16.00±0.10 ^b	0.41±0.03 ^d	30.90±4.00 ^f	0.46
	Mixed T.S 10:1	10.8	28.33±0.58 ^{cd}	14.43±0.04 ^a	15.90±0.30 ^b	0.40±0.03 ^d	25.90±3.90 ^f	0.47
	Mixed T.S 20:1	11.0	35.00±2.05 ^d	13.92±0.08 ^a	15.07±0.91 ^b	0.42±0.04 ^{cd}	18.20±1.47 ^f	0.47
	Mixed T.S 50:1	9.4	45.00±3.61 ^d	14.15±0.10 ^a	15.30±0.44 ^b	0.50±0.01 ^{bcd}	14.77±0.81 ^f	0.47
	Mixed T.S 100:1	9.4	48.67±4.90 ^d	14.08±0.08 ^a	15.90±1.51 ^b	0.52±0.03 ^{bc}	16.47±0.12 ^f	0.47
	Sequential T.S ^a	nd	85.00±5.66 ^d	13.15±0.41 ^b	13.17±0.15 ^b	0.56±0.04 ^b	20.30±1.84 ^f	0.46

Tabla 2: Características enológicas de los vinos inoculados con las levaduras del ensayo²⁵. ^aFermentación detenida.

23 CANONICO, L., AGARBATI, A., COMITINI, F., CIANI, M., “*Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content” *Food Microbiology* 56 (2016) p. 45-51.

24 QUIRÓS, M., ROJAS, V., GONZALEZ, R., MORALES, P., “Selection of non-Saccharomyces yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration” *International Journal of Food Microbiology* 181 (2014) p. 85-91.

25 BELY, M., STOECKLE, P., MASNEUF-POMARÈDE, I., DUBOURDIEU, D., “Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation” *International Journal of Food Microbiology* 122 (2008) p. 312-320.

4.2.3. Resistencia a la desecación

Esta característica no afecta a la futura composición del vino pero es importantísima a la hora de seleccionar una levadura y a su vez es esencial en las fermentaciones espontáneas. Ante situaciones de baja concentración de nutrientes, como al final de la fermentación, las levaduras quedan en estado de latencia. Posteriormente, la levadura se seca y queda en el ambiente de la bodega todo el año, hasta volver a aparecer el mosto el año siguiente¹⁸. Esto significa que una levadura con gran capacidad de soportar la desecación que sufrirá entre vendimias tiene una ventaja enorme sobre otras que, al comenzar la fermentación del año siguiente, tendrán una población viable más pequeña. No solo eso, en el ámbito de la biotecnología, a la hora de seleccionar una levadura para hacer una LSA, el hecho de que una levadura tenga esta propiedad bien marcada ayuda en gran medida a su comercialización¹⁸, ya que las LSA se venden desecadas.

4.2.4. Producción de acidez volátil

Se refiere principalmente al ácido acético (90% de los ácidos totales), que da un regusto avinagrado¹². Durante la fermentación, el acetaldehído derivado del piruvato se transforma en acetato por acción de la acetaldehído deshidrogenasa. Este mecanismo está muy bien estudiado debido a la conservación de los genes codificantes ALD en todas las cepas de *S. cerevisiae*. Especialmente ALD6 tiene un papel clave en la producción de ácido acético, que se relaciona a su vez con una desviación de la ruta fermentativa que da lugar a etanol¹.

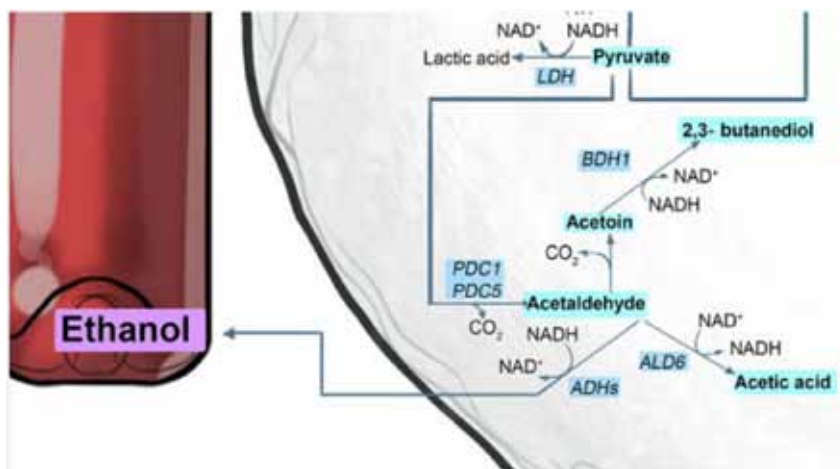


Figura 5: Ruta bioquímica de formación de ácido acético⁴.

En términos generales, la elevada acidez volátil en el vino afecta a su calidad, dando un toque avinagrado al vino y se usa como valor límite los 0'60 g/l. Los valores adecuados deben ser de entre 0'2 y 0'4 g/l según sean blancos, rosados o tintos. Es por ello que los últimos estudios están buscando cepas que no sobreexpresen este gen o, en su defecto, que tengan la capacidad de bajar la acidez generada en el proceso.

La acidez volátil además aparece en mayor medida cuanto más azúcar tenga el mosto, hasta el punto que el 35% del ácido acético que es producido por *S. cerevisiae* se genera al comienzo de la fermentación²⁶. Como ya se ha comentado, los mostos debido al cambio climático tienden a tener mayor concentración de azúcar, lo que nos devuelve las fermentaciones coinoculadas o secuenciales para solucionar el problema de elevados niveles de ácido acético. *T. delbrueckii* muestra una gran capacidad para reducir la producción de acético en condiciones de gran estrés osmótico, es decir, en las primeras etapas de fermentación²⁵. La tabla 2 muestra cómo, en cultivos mixtos, el grado de acidez volátil baja a niveles de 0,4 g/L mientras que la concentración de glicerol se mantiene en unos niveles aceptables. Por tanto el uso de Level 2 Solution Biodiva™ es una solución para vinos que contienen gran cantidad de acético. El catálogo *Lallemand* sobre esta levadura muestra un estudio que ha certificado que la combinación de estas dos levaduras mejora notoriamente las características del vino (Figura 6).

Ensayo comparativo sobre Syrah (Valle del Ródano): Impacto de Biodiva™ sobre el perfil sensorial del vino en cata a ciegas llevada a cabo por 27 catadores profesionales

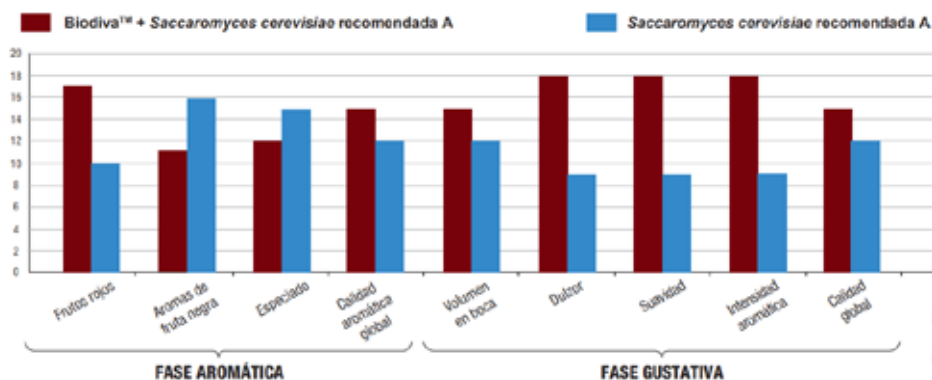


Figura 6: *Ensayo comparativo sobre Syrah (Valle del Ródano). Impacto de Biodiva™ sobre el perfil sensorial del vino en cata a ciegas llevada a cabo por 27 catadores profesionales*²⁷

26 BELY, M., RINALDI, A., DUBOURDIEU, D., "Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation" *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (2003) no 6, p. 507-512.

27 Catálogo Lallemandwine 2018. <http://www.lallemandwine.com/es/spain/productos/catalogo/>. Accedido el 2 de julio de 2018

4.2.5. Producción de glicerol

Este producto es muy importante en el carácter sensorial del vino, ya que desvía la ruta de la producción de etanol y da sensación de dulzor en boca (se reconoce a partir de 5,2 g/l en blancos y 28g/l en tintos)¹². Además contribuye a la suavidad, consistencia y cuerpo general del vino⁷. Al desviar la ruta de fermentación alcohólica hacia la formación de glicerol se consigue a su vez reducir el rendimiento alcohólico, que es un tema que ya se ha debatido previamente. Lograr un equilibrio entre el etanol y el glicerol en el vino es una cuestión de gustos, pero las tendencias del mercado son cada vez más favorables a vinos más ligeros²² y es por ello que multitud de estudios buscan cepas que sobreproduzcan esta molécula. La ruta puede desviarse de muchas maneras; tanto químicas (adición de sulfuroso), como físicas (regulando ciertos grados de estrés), como genéticas (manipulación de genes)⁴. La función de esta molécula es suministrar a la célula un soluto sensible al estrés osmótico y sea capaz de mantener el equilibrio redox convirtiendo NADH en NAD⁺⁷. Gracias al gran conocimiento del genoma que actualmente se tiene de la especie *S. cerevisiae* se ha podido investigar mucho acerca de los genes involucrados en la expresión de las proteínas de la ruta. Se sabe que ciertas cepas que sobreexpresan por ejemplo *GPD1* o subexpresan *GPD2*, genes relacionados con la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, producen vinos con menos grado alcohólico, con más glicerol y una mayor acidez⁴. Como esta, muchas otras partes del genoma de las levaduras siguen investigándose, sin embargo, el glicerol es una molécula muy “cara” energéticamente hablando y muchas de las cepas que surgen en las investigaciones no son útiles en fermentación de vinos dado que generan metabolitos no deseados.

Un ejemplo exitoso en el campo es el de Bodegas Muriviedro en colaboración con el CSIC, que ha seleccionado una levadura *Saccharomyces uvarum* que se comercializa actualmente con el nombre de VELLUTO y que tiene la característica de producir altas cantidades de glicerol. Los ensayos realizados durante los años previos a su patente la caracterizaron como una cepa capaz de producir altos niveles de glicerol y obtener vinos sabrosos y redondos. Sin embargo, un estudio realizado en la Universidad de La Rioja no encontró diferencias significativas en la producción de glicerol respecto a otras levaduras comerciales que no poseen la característica de sobreproducción de este compuesto, aunque sí encontraron diferencias organolépticas⁶.

En Montpellier se ha seleccionado una levadura que distribuye Lallemand y se comercializa con el nombre de IONYS WFTM que tiene, según el catálogo de Lallemand, la capacidad de acidificar el vino dándole mayor estabilidad. Además, es capaz de producir grandes cantidades de glicerol, hasta 25g/L. Un estudio externo

demonstró que esta levadura es capaz de reducir el pH del vino final respecto a otras levaduras también comercializadas por Lallemand con propiedades acidificantes pero superando en 5,6 g/L de promedio la cantidad de glicerol (Tabla 3). Además es capaz de reducir en cierta medida el grado alcohólico, lo que indica que esta cepa es capaz de desviar su ruta metabólica hacia la producción de glicerol, lo que la haría también potencialmente útil para reducir el grado alcohólico del vino²⁸.

PARAMETER	Temperature: 16 ± 1 °C		Temperature: 27 ± 1 °C	
	EC1118	IONYS™WF	EC1118	IONYS™WF
Ethanol (% v/v)	14.1 ± 0.13 B	13.58 ± 0.08 A	14.22 ± 0.13 B	13.72 ± 0.13 A
Glycerol (g/L)	6.53 ± 0.35 A	10.77 ± 0.42 B	6.73 ± 0.06 A	11.13 ± 0.46 B
Titrateable Acidity (g/L)	7.00 ± 0.30 A	8.37 ± 0.12 B	7.20 ± 0.10 A	8.07 ± 0.49 B
Volatile Acidity (g/L)	0.15 ± 0.07 A	0.17 ± 0.03 A	0.17 ± 0.02 A	0.18 ± 0.03 A
pH	3.67 ± 0.01 B	3.56 ± 0.01 A	3.75 ± 0.02 B	3.67 ± 0.05 A
Glucose + Fructose (g/L)	0.17 ± 0.05 A	0.20 ± 0.04 A	0.30 ± 0.23 A	0.37 ± 0.24 A

Tabla 3: *Parámetros analizados en microvinificaciones de uva tempranillo inoculadas con levaduras IONYS™ WF²⁷.*

4.2.6. Resistencia al estrés por etanol

El etanol es el producto principalmente deseado de la fermentación pero a su vez es un producto tóxico. Por tanto, además de buscar propiedades organolépticas que generar en los vinos, las levaduras seleccionadas deben tener la capacidad de resistir condiciones de estrés tales como la alta cantidad de etanol en el medio²⁹. Según revisó Pretorius en el año 2000, las LSA son fácilmente modificables en este sentido durante el proceso de fabricación de las mismas. Factores fisicoquímicos durante su cultivo pueden aumentar las adaptaciones a este estrés. Algunos de estos factores son la exposición a oxígeno, a cierta cantidad de etanol o la presión osmótica. Ante estas situaciones las levaduras desarrollan los llamados factores de supervivencia (por ejemplo ciertos ácidos grasos de cadena larga o esteroides). Si pensamos en las levaduras indígenas, estas deben pasar todo un año a la intemperie,

28 PASCUAL, O., PONS-MERCADÉ, P., GOMBAU, J., JULIEN, A.-O., HERAS, J.M., FORT, F., CANALS, J.M., ZAMORA, F., "Study of the effectiveness of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* selected for the production of wines with higher acidity and lower alcoholic strength in: *BIO Web of Conferences*" *EDP Sciences* 9 (2017) n° 02002.

29 CARRASCO, P., QUEROL, A., DEL OLMO, M., "Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains" *Archives of Microbiology* 175 (2001) n°6, p. 450-457.

con condiciones climáticas adversas y baja cantidad de nutrientes¹⁸, por lo tanto también sufren un estrés que promoverá la aparición de algunos de estos factores.

Se considera que el 95% de la FA se ha completado cuando la concentración de azúcares iniciales ha bajado hasta 10g/L³⁰. En estos momentos las levaduras ya empiezan a encontrarse al límite de la resistencia. Sin embargo, si nuestra levadura posee una resistencia a etanol que no le permite llegar a este porcentaje de consumo de azúcares nuestra fermentación se parará. Esto da como resultado un vino “abocado”, que es un vino con tendencia a lo dulce. Esta característica hay veces que se busca. Sin embargo, hay otros procesos más exactos para conseguir vinos dulces que el simple azar de una parada de fermentación. Es por tanto un problema para la vinificación.

Pero donde esta propiedad es importante es en las producciones de vinos espumosos, cava y champán, y vinos finos. En la elaboración de estos vinos, se necesita de una segunda fermentación cuyo producto de partida contiene un alto grado de etanol y acetaldehído y una baja concentración de nutrientes, lo que exige levaduras con gran resistencia a estos tipos de estrés¹⁸. Las cepas utilizadas en estos vinos deben ser tolerantes al etanol y floculantes con propiedades autolíticas (por ejemplo cepas de especies *S. bayanus* y *S. oviformis*)⁷.

Dos ejemplos de levaduras muy resistentes a alcohol son la Vitilevure Pris Mouse y la LALVIN T73, *S. cerevisiae*²⁸. Esta última además fue seleccionada en España por la Universidad de Valencia. Ambas son capaces de soportar con creces 13,5% de etanol²⁸. LALVIN T73 indica en su etiqueta que soporta hasta un 16% de etanol, produce glicerol y requiere bajos requerimientos de nitrógeno. Esto significa que cualquier mosto inoculado con esta cepa dará lugar a un vino agradable y estable.

4.2.7. *Factor Killer*

Hay cepas de levaduras que poseen la capacidad de secretar proteínas tóxicas que son letales para otras levaduras y hongos filamentosos. Estas proteínas se secretan con el objetivo de obtener una ventaja competitiva, dañando a los microorganismos del medio e imponiéndose sobre el resto³¹. Este carácter es importante

30 BRANDAM, C., LAI, Q.P., JULIEN, A.-O., TAILLANDIER, P., “Influence of oxygen on alcoholic fermentation by a wine strain of *Torulaspora delbrueckii*: kinetics and carbon mass balance” *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77, n° 9 (2013) p. 1848-1853.

31 BELDA, I., RUIZ, J., ALONSO, A., MARQUINA, D., SANTOS, A., “The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins” *Toxins* 9 (2017) n°4, p. 112.

para un starter que debe cumplir su función sin verse afectado por interacciones con otros microorganismos. Por otro lado, su utilización no acaba de ser ideal, ya que si no se controla, una cepa que se dispersa por la bodega es muy difícil de erradicar^{32,33}. De la misma manera, hay levaduras indígenas que poseen esta capacidad tóxica y por lo tanto es interesante que la cepa seleccionada tenga un amplio rango de resistencia frente a las proteínas *killer*. Hay un grupo denominado “cepas neutras” que no tienen factor killer pero que sí que poseen la resistencia a estas toxinas⁷.

En general, la acción de estas proteínas está restringida a valores de pH bajo y bajas temperaturas, es decir, las características del vino (pH 2.8-3.8). Sus mecanismos de acción son muy diversos dependiendo de la especie que sea la causante de la toxina. Así, *S. cerevisiae* tiene cuatro tipos diferentes de fenotipos killer: K1, K2, K28 y Klus, aunque se siguen estudiando más. La mayoría suelen ser K2 o K28⁷. El género *Zygosaccharomyces* y *Tolurospora* son otros ejemplos de levaduras capaces de generar proteínas *killer*. Cada fenotipo afecta de una manera diferente al resto de microorganismo³⁰.

Muchos datos aún se desconocen y siguen apareciendo estudios de diferentes ómicas que nos ayudan a comprender el papel que juegan estas moléculas en la ecología del vino. A parte de estas levaduras hay muchas otras con esta capacidad que aún se siguen investigando. Aunque no se sepa el papel exacto que cumplen estas proteínas en la ecología del vino y cual es su capacidad para modificar el vino, sí que se le puede atribuir el estatus de factor estabilizante. Lallemand, como principal proveedor de levaduras y bacterias, ha implantado en la descripción de la mayoría de levaduras que comercializa la aparición de este factor, señal inequívoca de la importancia que los enólogos dan a este.

4.2.8. *Formación de compuestos azufrados*

Este término abarca muchas moléculas diferentes con características muy variadas. Tenemos por un lado el sulfito de hidrógeno (H_2S), que da olor a huevos podridos, y en el otro al mercaptohexanol, que aporta frutuosidad al vino y es un compuesto que se busca durante su elaboración. Los sulfuros pueden surgir por muchos factores, entre ellos la composición del mosto, pH, concentración de sulfato, etc⁷.

32 KOTENKO, S.T., KHALILOVA, E.A., ISLAMMAGOMEDOVA, E.A., ALIVERDIEVA, D.A., “New wine *Saccharomyces cerevisiae* killer strain Y-3980” *IOSI 2* (2016) n° 5, p. 1-4.

33 MESAS, J.M., ALEGRE, M.T. “El papel de los microorganismos en la elaboración del vino, The role of the microorganisms in winemaking o papel dos microorganismos na elaboração do vinho” *Ciencia y Tecnología Alimentaria 2* (1999), n° 4, p. 174-183.

El enólogo por tanto debe cuidar este aspecto y elegir una levadura que produzca compuestos azufrados de manera moderada y que tenga un metabolismo adecuado en cuanto a la transformación de precursores de azufre no volátiles, compuestos muy activos en el sabor del vino. EL H_2S surge como respuesta al agotamiento de nutrientes, especialmente nitrógeno⁷, por lo tanto es un factor que debe ir muy de la mano con la asimilación del nitrógeno. Además, tiene un importante papel la ruta de asimilación de sulfuro, donde el sulfato se recoge y reduce progresivamente³⁴.

En este punto, en Australia ha sido seleccionada una levadura que es capaz de eliminar el olor a “hedor” producido por el H_2S conservando las propiedades de los vinos. Son tres las cepas de *S. cerevisiae* que se han seleccionado (comercializadas con el nombre de Maurivin Advantage, Platinum y Distinction) mediante técnicas que no implican a la ingeniería genética (Cordente et al., 2011). Además tiene una gran capacidad para crecer en medios pobres en nitrógeno y su resistencia al estrés alcohólico llega al 16%. En la Figura 7 se muestra la producción de H_2S [$\mu\text{g/L}$] de las cepas Distinction y Platinum respecto a la cepa de la que se obtuvieron.



Figura 7: Representación de los valores de H_2S [$\mu\text{g/L}$] que producen las levaduras comerciales Maurivin Distinction y Maurivin Platinum

34 HUANG, C.-W., WALKER, M.E., FEDRIZZI, B., GARDNER, R.C., JIRANEK, V. “Hydrogen sulfide and its roles in *Saccharomyces cerevisiae* in a winemaking context” *FEMS yeast research* 17 (2017) n°6.

4.2.9. *Asimilación de nitrógeno*

El nitrógeno es el segundo nutriente por detrás del carbono más necesario en la fermentación. Además es uno de los compuestos que más problemas da en cuanto a su presencia en el mosto natural y es muy habitual su adición como suplemento nutritivo para las levaduras en forma de fosfato de diamonio (DAP)^{5,7}. Pero el uso imprudente de DAP puede ser contraproducente para el producto final y a menudo está regulado⁷. Por lo tanto, la alta capacidad de las levaduras de asimilar tanto los compuestos nitrogenados, principalmente aminoácidos, como los iones amonio va a ser un punto muy importante a la hora de seleccionarla.

Se ha demostrado que fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables como amonio o glutamina bloquean rutas de síntesis de transportadores para la asimilación de otros no tan utilizadas en el metabolismo como por ejemplo la prolina⁷. Por tanto, una mejora considerable a la hora de hacer vino con mosto de bajo contenido en nitrógeno es la elección de una levadura con baja represión de transportadores y por tanto mayor capacidad de asimilación de nitrógeno. Este punto está muy relacionado con el punto III.2.1 que hablaba de reinicios de fermentaciones. En esas situaciones los elementos nitrogenados principales han desaparecido en su mayoría. UVAFERM 43 RESTARTTM posee, además de su gran facto competitivo y su captación de fructosa, unas necesidades bajas de nitrógeno, lo que la hacen una cepa perfecta para solventar este problema.

4.3. MEJORA GENÉTICA DE LEVADURAS

A día de hoy, en cada momento se suceden nuevos avances en el mundo de la biología sintética. Esta explosión de descubrimientos ha sucedido gracias al desarrollo de técnicas en la lectura y escritura del DNA, como el famoso CRISPR-CAS. Esta transición es similar a la que ocurrió con la química a mediados del pasado siglo, cuando los científicos empezaron a experimentar con las moléculas³⁵. Desde que en 2002 se consiguiera sintetizar el RNA completo del poliovirus, no ha dejado de haber avances en este campo. Esto ha ido de la mano con la inversión que se ha realizado por otras industrias como la salud o los combustibles, que a día de hoy se aprovechan de todos estos avances¹. Incluso, y a pesar de la controversia que tiene, no es difícil encontrar alimentos genéticamente modificados en el mercado.

35 PRETORIUS, I.S., BOEKE, J.D. "Yeast 2.0—connecting the dots in the construction of the world's first functional synthetic eukaryotic genome" *FEMS Yeast Research* 18 (2018) n° 4.

La mejora del vino es la característica por excelencia a la hora de elegir la levadura que se va a usar. Todos los ejemplos previos han conseguido mejorar en algún aspecto el producto y se han obtenido mediante la caracterización de mostos de una zona determinada, como Lalvin T73, o mediante la aparición aleatoria de ciertas características aprovechándose de los ciclos sexuales y parasexuales de las levaduras, como la gama de levaduras Maurivin³⁶. Pero como se mencionó al comenzar el apartado anterior, ninguna levadura actual tiene todas las características de la tabla 1 conjuntamente. De hecho, la mejora de una de las características suele suponer el empeoramiento de alguno de los otros puntos.

Los avances en ingeniería genética han permitido secuenciar el genoma de SC desde hace tiempo y este ya era descrito en el año 2000 por Pretorius como “un genoma relativamente pequeño, con muchos cromosomas, poco DNA repetitivo y pocos intrones”. También sabemos que esta especie tiene una gran diversidad, ya no solo en sus características metabólicas, sino también en cuanto a su contenido genético que puede ser haploide, diploide, aneuploide e incluso poliploide⁷. La tasa de mutación de SC es muy elevada, promovida los genes Ty (retrotransposones RNA), el cruzamiento mitótico y la conversión génica⁷. De esto se han aprovechado los investigadores para buscar por deriva génica cepas con propiedades específicas útiles. Pero otra técnica desarrollada es la transformación de genes, técnica que permite alterar con gran precisión las características de las levaduras sin afectar negativamente a otros aspectos del metabolismo.

Fruto de la amplia utilización industrial de SC y su “baja” complejidad genómica, en los últimos años los estudios de rutas metabólicas, genes individuales y genoma completo han sido una constante para esta especie, convirtiéndola en el “chasis” de la biología sintética¹. Multitud de autores se han dedicado a investigar cómo mejorar ciertas propiedades o determinar las rutas metabólicas mediante ingeniería genética con objetivos directamente relacionados con la enología (Tabla 4). Actualmente, un proyecto denominado “Yeast 2.0” o Sc2.0 busca crear una levadura que contenga un DNA sintetizado *de novo*. A día de hoy se han conseguido sintetizar 7 de los 16 cromosomas del genoma de SC³⁷. Su objetivo es el pleno conocimiento de *S. cerevisiae* para utilizarla como base de las respuestas a una amplia variedad de preguntas sobre los cromosomas, el porqué de su contenido, funciones de empalme de ARN o funciones industriales³⁶. Si esto llega a conseguirse en la

36 CEBOLLERO, E., GONZALEZ-RAMOS, D., TABERA, L., GONZALEZ, R. “Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine?” *Biotechnology Letters* 29 (2007) n° 2, p. 191-200.

37 Página oficial de Yeast 2.0. Synthetic Yeast 2.0 | Building the world’s first synthetic eukaryotic genome together. <http://syntheticyeast.org/>. Accedido 25 de junio de 2018.

totalidad del genoma se abriría la puerta a una nueva forma de selección de levaduras. A estas las podríamos denominar levaduras “a la carta” y se podrían centrar en modificar ciertos aspectos de levaduras ya seleccionadas o crearlas en función de lo que desee el enólogo.

1	Enhanced resistance of wine yeast to nutritional stress during the industrial production of starters by increasing the glycogen synthase activity and eliminating glycogen phosphorylase activity.	Perez-Torrado et al. (2002).
2	Improved juice extraction, wine clarification and filtration by overexpressing genes encoding pectinolytic enzymes in wine yeast.	Gonzalez-Candelas et al. (1995); Fernandez-Gonzalez et al. (2005); Vilanova et al. (2000)
3	Over-expression the <i>GPD1</i> gene in wine yeast resulting in a substantial increase in glycerol production at the expense of ethanol in wine; and deletion of <i>ALD6</i> and <i>ALD4</i> genes in order to reduce acetate production.	Michnick et al. (1997); Remize et al. (2000); Eglinton et al. (2002)
4	Expression in wine yeast of the <i>Trichoderma longibrachiatum</i> β -(1,4)-endoglucanase gene, resulting in wines with an enhanced varietal aroma.	Perez-Gonzalez et al. (1993)
5	Expression in wine yeast of the α -L-arabinofuranosidase B gene from <i>Aspergillus niger</i> in order to enhance varietal aroma.	Sanchez-Torres et al. (1996)
6	Expression of a <i>Candida molischiana</i> β -glucosidase gene in wine yeast in order to enhance varietal aroma.	Sanchez-Torres et al. (1998)
7	Expression in wine yeast of the <i>Aspergillus nidulans</i> β -(1,4)-endoxylanase gene, resulting in wines with enhanced varietal aroma.	Ganga et al. (1999)
8	Expression in wine yeast of the <i>rhaA</i> gene from <i>Aspergillus aculeatus</i> encoding an alpha-L-rhamnosidase in order to enhance varietal aroma.	Munzanares et al. (2003)
9	Over-expression in wine yeast of the <i>ATF1</i> gene, encoding an acetyltransferase, to improve the secondary aroma profiles of wine.	Lilly et al. (2000)
10	Expression of a gene encoding a glycosyl-hydrolase to increase resveratrol content in wine.	Gonzalez-Candelas et al. (2000)
11	Expression in wine yeasts of the gene encoding the L-(+)-lactate dehydrogenase from <i>Lactobacillus casei</i> for acidification of high-pH wines.	Dequin and Barre (1994)
12	Expression of heterologous malate permease and malolactic genes, for yeast strains performing malolactic fermentation.	Bony et al. 1997; Husnik et al. (2006)
13	Overexpression of <i>esc1-1</i> allele to accelerate yeast autolysis for accelerated aging of sparkling wines (Champagne or Cava).	Cebollero et al. (2005)
14	Construction of an autolytic yeast strain by deletion of the <i>BCY1</i> gene for accelerated aging of sparkling wines	Tabera et al. (2006)

Tabla 4: Algunos avances conseguidos gracias a la ingeniería genética en las levaduras vinicas³⁵.

Sin embargo, así como las cepas de levaduras obtenidas por hibridaciones o mutaciones espontáneas están teniendo éxito en el mercado y son bien aceptadas en el mundo de la enología, la idea de una cepa generada por ingeniería genética o modificada genéticamente aun causa recelo en los consumidores. Así, los enólogos no tienen opción de aprovechar al máximo los avances científicos dado que el mercado sigue siendo sensible a productos alimentarios con etiquetado de genéticamente modificado (MG)¹. Según el Reglamento (EC) de la Comunidad Europea, la definición de alimento modificado genéticamente es “aquél alimento que contiene o está compuesto por organismos modificados genéticamente o han sido producidos a partir de ellos” y el etiquetado es obligatorio incluso si el DNA recombinante o la

proteína correspondiente no se encuentra presente en el producto final³⁸. Dado que con la clarificación no se puede asegurar la eliminación de las levaduras, se da por sentado que estas se encuentran en el producto final y por tanto hay que asegurar que su consumo no es perjudicial para la salud antes de ser comercializadas. A pesar de que SC tenga el status GRAS (Generally Recognized As Safe), las campañas de los organismos anti-OGM siguen imponiéndose en este aspecto¹.

A principios de siglo, dos cepas de levadura de vino MG se comercializaron con el nombre de ML01 y ECMo01. ML01 es capaz de convertir ácido málico en ácido láctico durante la fermentación alcohólica. Contiene un gen de *Oenococcus oeni* y otro de *Schizosaccharomyces pombe* que le permiten realizar la fermentación maloláctica durante la FA. Esta fermentación sólo la pueden llevar a cabo las bacterias lácticas tras la FA. ECMo01 tiene la capacidad de reducir las cantidades de carbamato de etilo o uretano, tóxico y no deseado en el vino. Eran las primeras levaduras MG que salieron a mercado y cumplían todos los requisitos de seguridad para ello. A pesar de que se demostró que poseían claros beneficios para el vino, la utilización de estas levaduras aún no se ha generalizado. Como estos ejemplos hay otros que son capaces de reducir el grado alcohólico o dar sabores activos al vino y que no son utilizadas por las bodegas¹. En 2016, Danna Lee y su equipo demostraron que es posible hacer vino con unas cantidades de cetona de frambuesa sensorialmente relevantes. Este compuesto es muy aromatizante pero es muy difícil de extraer de los tejidos vegetales. Por este motivo, el equipo ensambló cuatro genes de la ruta de síntesis en un huésped SC. De esta forma consiguieron fermentar un mosto Chardonnay hasta la sequedad completa y aportar al producto final un sabor a frambuesa³⁹.

A pesar de las aparentes mejoras proporcionadas por las levaduras MG, no hay constancia de ninguna bodega que las esté utilizando en su proceso. Esto es un claro indicio de la resistencia que opone la sociedad a cualquier producto con etiqueta MG.

7. CONCLUSIONES

El vino lleva en nuestra dieta más de lo que ninguna persona viva pueda recordar. Gracias a los avances en comunicaciones y marketing, la cultura del vino está

38 REGLAMENTO (CE) No 1829/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. DOCE. L 268 Artículo 2 (6).

39 LEE, D., LLOYD, N.D.R., PRETORIUS, I.S., BORNEMAN, A.R., "Heterologous production of raspberry ketone in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* via pathway engineering and synthetic enzyme fusion" *Microb. Cell Fact.* 15 (2016) n° 1, p. 49-56.

viviendo un momento de esplendor en cuanto a demanda y, con ello, aumentando el número de exportaciones a multitud de nuevos mercados. Estos nuevos mercados exigen vinos cada vez más suaves y dulces, con menor grado alcohólico del que estamos acostumbrados. Sin embargo, la tradición es algo que muchos enólogos no están dispuestos a sacrificar a costa de perder las características propias de sus vinos. Hasta finales del siglo pasado existía la creencia popular de que las levaduras superiores estaban asociadas a viñedos específicos que daban estilo y calidad a sus vinos⁷, pero los avances en análisis genético han tirado abajo esta teoría. La selección de levaduras ha permitido que cualquier terreno sea adecuado para fermentar un vino más que decente.

Nadie duda que el terroir aporta distinción a una comarca y que grandes bodegas del mundo como las de las regiones de Burdeos (Francia), Barossa Valley (Australia) o La Rioja Alta (España) son fácilmente reconocibles en boca por los entendidos en el mundo. Sin embargo, las nuevas bodegas no podrían permitirse el costo de perder una añada entera por culpa de una mala fermentación y por tanto se han aprovechado de las LSA para asegurar una continuidad en su producción. Es más, no solo aseguran el producto sino que es probable que mejoren el anterior en algún aspecto. Lo que no se puede evitar es que las bodegas de las regiones que deben utilizar LSA estén tendiendo a estandarizar vinos con ciertas características y degenerar en una estandarización de los vinos que hace que pierdan personalidad.

Poco a poco se va ampliando el conocimiento de los roles que cumplen cada una de las levaduras en la fermentación alcohólica y cómo influyen en los cambios organolépticos del vino. Gracias a ello, la industria del vino se ha modernizado y existen bodegas que pueden satisfacer las necesidades de los nuevos grupos de población que se introducen en el mundo y exigen vinos más ligeros. Los jóvenes se decantan más por vinos blancos y rosados, afrutados y dulces y con bajo contenido alcohólico. Para ello, hasta ahora se había usado la selección de levaduras de forma natural (selección directa de mostos o mediante recombinación), permitiendo a los enólogos elegir las que mejor se adaptaran a sus mostos. El siguiente paso lo da la ingeniería genética, que está preparada para introducir la posibilidad de editar los genomas a nuestro gusto, pudiendo convertir el dilema acerca de qué levadura quiero para mi fermentación al de qué genes me interesan para el vino que quiero producir. Sin embargo esta posibilidad está descartada a día de hoy debido a la presión que soportan los OGM por las organizaciones que se oponen a ellos y el rechazo general de la población.

En los próximos años la industria del vino se enfrenta a una posible revolución que haga temblar los cimientos de la tradición. Aunque como dice el refranero español, “la innovación de hoy es la tradición del futuro”. El papel de la levadura en el vino está lejos de ser comprendido al 100% pero estamos avanzando a pasos

agigantados hacia su descubrimiento. Ya somos capaces de “imitar” la fermentación natural mezclando no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* y comprendemos que ciertos genes característicos son responsables de limitaciones o ventajas en la fermentación.

Así, el papel que ha cumplido la selección de levaduras ha sido importantísimo para el avance de la enología (y otras ramas industriales que utilizan levaduras) y el papel que tendrá en un futuro junto a la ingeniería genética será abrir un mundo entero de posibilidades que será posterior a la estandarización de los alimentos OGM.