

Presencia de levaduras autóctonas en bodegas que practican la inoculación reiterada con Levaduras Secas Activas

Pilar Santamaría,^{a*} Patrocinio Garijo,^a Carmen Tenorio,^a Rosa López,^a Ana Rosa Gutiérrez^b

^a Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico de La Rioja (CIDA). Ctra. de Mendavia-Logroño (NA 134, km. 88), 26071 Logroño (La Rioja), Spain. Ph: +34 941 291383. e-mail: microbiologia.cida@larioja.org.

^b Departamento de Agricultura y Alimentación (CCT), Universidad de La Rioja. C/ Madre de Dios, 51 26006 Logroño, (La Rioja), Spain. Ph: +34941299727. e-mail: ana-rosa.gutierrez@unirioja.es

Palabras clave: Inoculación, Fermentación alcohólica, biodiversidad, ecosistema de bodega, *Saccharomyces cerevisiae*

Resumen

La inoculación sistemática con levaduras secas activas (LSA), es una práctica enológica comunmente utilizada en muchas bodegas del mundo. Sin embargo, en ocasiones a esta práctica se le ha atribuido un efecto negativo sobre la biodiversidad de las levaduras naturales presentes en las bodegas. Dado que son utilizadas en gran cantidad, las levaduras comerciales podrían competir y eliminar las cepas autóctonas existentes en las bodegas. Este estudio analizó la presencia de las levaduras comerciales utilizadas como inóculo en el ecosistema de tres bodegas de la D.O.Ca. (Denominación de Origen Calificada) Rioja. Se estudió la permanencia de estas levaduras en el equipamiento de las bodegas y su participación en fermentaciones espontáneas. Los resultados obtenidos indicaron que la presencia de las LSA utilizadas en las bodegas fue escasa o nula tanto en el ecosistema de las bodegas como en las fermentaciones espontáneas donde no se habían añadido. Así, en las tres bodegas estudiadas, la inoculación repetida con LSA no ha impedido la presencia y desarrollo de cepas autóctonas (*Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*), en el equipamiento de bodega y en las fermentaciones estudiadas.

Introducción

La fermentación alcohólica es un proceso conducido por levaduras en el que se transforma el mosto en vino. Las levaduras que participan en las fermentaciones se pueden dividir en dos categorías: *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*. El primer grupo incluye levaduras que pertenecen al género *Saccharomyces*, y son los principales agentes de la fermentación. El origen de estas levaduras y el modo por el que llegan al mosto, ha sido objeto de debate desde hace tiempo. Actualmente se cree que las levaduras que participan en las fermentaciones espontáneas tienen dos posibles orígenes: la uva o el material de bodega. (Fleet and Heard 1993; Mortimer and Polsinelli 1999). Rosini (1984) demostró que en los meses siguientes a la vinificación, las levaduras *Saccharomyces* responsables de las fermentaciones permanecen en la bodega y colonizan las superficies e instalaciones de la

misma. Según Pretorius (2000), *Saccharomyces cerevisiae* es la principal especie colonizadora de las superficies de la bodega.

Además de la uva y los equipos de bodega, existe otra forma de llegada de levaduras al mosto: la adición exógena o inoculación de Levaduras Secas Activas (LSA). El uso de levaduras secas activas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* para inocular mostos es una práctica muy común en la mayoría de las regiones vitivinícolas. Sin embargo, a esta práctica se le ha atribuido en ocasiones un efecto negativo sobre la biodiversidad, al provocar la eliminación de las cepas autóctonas presentes en el ecosistema de la bodega, debido a la permanencia y dominancia de las cepas adicionadas a lo largo del tiempo. Beltrán et al. (2002) estudiaron las poblaciones de levadura durante seis años consecutivos, y observaron que el uso continuo de levaduras comerciales disminuía la diversidad e importancia de las cepas indígenas de *S. cerevisiae*. Constantí et al. (1997) observaron que una levadura empleada para la inoculación en una bodega nueva permanecía en ella y aparecía en fermentaciones no inoculadas el año siguiente de haber sido empleada. Valero et al. (2005) detectaron la presencia de cepas comerciales de levadura en viñedos próximos a las bodegas, confirmando así su diseminación y permanencia en el área en la que han sido utilizadas.

Este trabajo analiza la presencia de levaduras autóctonas en tres bodegas, que utilizan la inoculación sistemática con LSA como método de elaboración. La presencia de levaduras diferentes a las adicionadas se estudió tanto en las instalaciones de las bodegas como en fermentaciones espontáneas llevadas a cabo en las mismas.

Materiales y Métodos

Este trabajo se realizó en tres bodegas de la D.O.Ca. Rioja (España). Las tres bodegas realizaban una inoculación sistemática de todos sus depósitos con LSA. Todas las levaduras comerciales empleadas con anterioridad a la realización de este estudio (4 cultivos distintos en la bodega 1, 9 en la bodega 2 y 6 en la bodega 3), pertenecían a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, y fueron identificadas y caracterizadas a nivel clonal, para diferenciarlas entre sí y de las cepas autóctonas.

Las muestras de levadura se tomaron sobre el equipamiento y superficies de la bodega antes de la entrada de uva, y sobre una fermentación espontánea llevada a cabo en cada una de las bodegas. Los muestreos de superficie se realizaron utilizando placas Rodac (Mossel et al. 2003) que contenían el medio Cloranfenicol Glucosa Agar, y se colocaron sobre 10 puntos de la bodega durante 30 segundos. Posteriormente fueron incubadas a 25°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se aislaron al azar 5 colonias de levadura de cada placa, que fueron finalmente identificadas. El muestreo de las fermentaciones espontáneas se realizó en tres momentos: a las 24 horas de encubado, en fermentación tumultuosa y al final de la fermentación. Las muestras se sometieron a diluciones seriadas y fueron sembradas en placa con medio Cloranfenicol Glucosa Agar. Las placas se incubaron a 25°C durante 48 horas, y se aislaron 10 colonias al azar para su posterior identificación.

Todas las colonias aisladas, tanto de las superficies como de las fermentaciones, se sembraron en placas Petri con medio Agar Lysina. El crecimiento en este medio permitió distinguir entre levaduras *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*, pues sólo estas últimas son capaces de crecer en él. Los aislados pertenecientes al género *Saccharomyces*, se identificaron a nivel de clon mediante análisis de restricción de su ADN mitocondrial (Querol et al., 1992).

Resultados y Discusión

Los aislamientos realizados en las instalaciones de las bodegas antes de la entrada de uva, revelaron una alta presencia de levaduras *No-Saccharomyces* (70-80%) en las tres bodegas (Figura 1). Estas levaduras también estuvieron presentes al inicio de las fermentaciones espontáneas (90, 100% y 100% de los aislamientos realizados a las 24 horas del encubado).

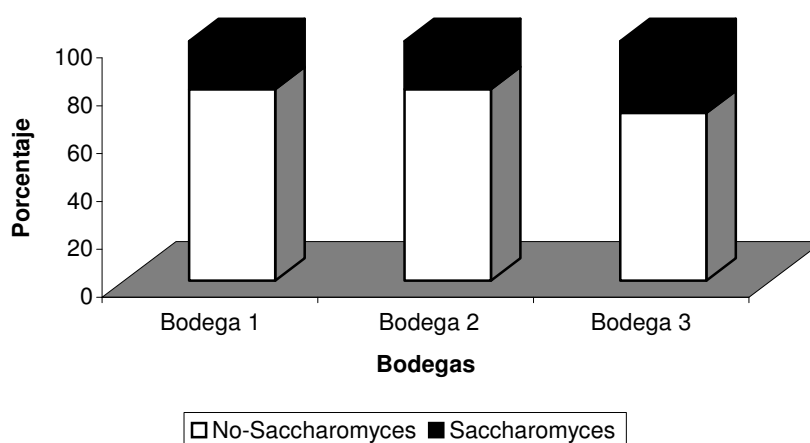


Figura 1.- Porcentajes de levaduras *Saccharomyces* y *No-Saccharomyces* en las instalaciones de las bodegas.

La mayoría de las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de las instalaciones y de las fermentaciones espontáneas fueron levaduras autóctonas. En la bodega 1, el 90% de las *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de las **instalaciones** fueron levaduras autóctonas, mientras que en las otras dos bodegas ese el porcentaje se elevó hasta el 100%. Algo similar ocurrió en las **fermentaciones espontáneas**: sólo en la bodega 3 aparecieron dos cepas comerciales que supusieron el 18,5% de todos los *Saccharomyces*. En las bodegas 1 y 2 el 100% de las levaduras de este género se correspondieron con levaduras autóctonas (Tabla 1).

Cocolin et al. (2004), en un estudio realizado en una bodega que utilizaba levaduras comerciales, encontraron una gran diversidad de cepas *Saccharomyces cerevisiae*, excluyendo como nosotros la colonización del ecosistema de la bodega por los cultivos comerciales. Beltrán et al. (2002), estudiaron la participación en fermentaciones espontáneas de diferentes levaduras comerciales utilizadas durante varios años, y sólo detectaron una presencia importante de las mismas los años en que se habían añadido como inóculo. En los años posteriores a su empleo, estas cepas no participaban en fermentaciones espontáneas, y eran generalmente las cepas autóctonas las que controlaban el proceso.

La ausencia de cepas comerciales en el presente estudio, tanto en instalaciones como en fermentaciones espontáneas, podría deberse a que las levaduras utilizadas como inóculo no se han adaptado a las condiciones de las bodegas donde se han adicionado, y por ello han sido superadas por las cepas autóctonas.

La inoculación repetida de las mismas LSA año tras año, podría haber provocado una significativa presencia de estas levaduras tanto en el ecosistema de la bodega como en las fermentaciones espontáneas realizadas en ellas. Este dominio de las levaduras comerciales evidentemente supondría la eliminación de las levaduras autóctonas, tanto *Saccharomyces* como No- *Saccharomyces*. Sin embargo, en este trabajo se ha detectado una mínima presencia de las LSA tanto en la bodega como en las fermentaciones estudiadas, con el consiguiente dominio de las levaduras autóctonas en ambos medios.

Tabla 1.- Distribución (%) de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (autéctonas y comerciales) en el equipamiento y en una fermentación alcohólica espontánea (FA), en las bodegas estudiadas.

BODEGA 1			BODEGA 2			BODEGA 3		
<u>Levaduras autóctonas</u>			<u>Levaduras autóctonas</u>			<u>Levaduras autóctonas</u>		
Cepas	Equipos	FA	Cepas	Equipos	FA	Cepas	Equipos	FA
Ia	10	-	Ib	20	10	Ic	13,3	-
IIa	30	5	IIb	40	25	IIc	6,7	-
IIIa	10	-	IIIb	20	-	IIIc	6,7	31,5
IVa	10	-	IVb	20	-	IVc	13,3	4,5
Va	10	-	Vb	-	5	Vc	6,7	-
VIa	10	30	VIb	-	5	VIc	26,6	-
VIIa	10	-	VIIb	-	10	VIIc	6,7	-
VIIIa	-	10	VIIIb	-	5	VIIIc	-	4,5
IXa	-	5	IXb	-	10	IXc	-	4,5
Xa	-	10	Xb	-	5	Xc	-	14,0
XIa	-	10	XIb	-	5	XIc	-	4,5
XIIa	-	10	XIIb	-	5	XIIc	-	4,5
XIIIa	-	5	XIIIb	-	5	XIIIc	-	4,5
XIVa	-	5	XIVb	-	5	XIVc	6,7	9,0
XVa	-	5	XVb	-	5	XVc	13,3	-
XVIa	-	5						
<u>Levaduras comerciales</u>			<u>Levaduras comerciales</u>			<u>Levaduras comerciales</u>		
Cepas	Equipos	FA	Cepas	Equipos	FA	Cepas	Equipos	FA
LSA 1	10	-	-	-	-	LSA 2	-	4,5
						LSA 3	-	14,0

Conclusiones

La principal conclusión de este estudio es que en las tres bodegas estudiadas, la inoculación reiterada con LSA ha permitido la presencia y desarrollo de levaduras autóctonas, tanto en el equipamiento como en las fermentaciones espontáneas. Por ello, parece posible utilizar la inoculación con levaduras secas activas, sin que ello necesariamente implique la eliminación definitiva de cepas autóctonas y la irremediable presencia y control de las fermentaciones de las cepas sembradas los años anteriores.

Literatura

- Beltrán, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A.** (2002). Analysis of yeasts populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287-293.
- Cocolin, L., Pepe, V., Comitini, F., Comi, G., Ciani, M.** (2004). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research* 5, 237-245.
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., Guillamón, J.M.** (1997). Analysis of yeasts populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339-344.
- Fleet, G.H., Heard, G.M.** (1993). Yeast: growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet, G.H. pp. 27-54. Switzerland: Hardwood Academic Publishers.
- Mortimer, R., Polsinelli, M.** (1999). On the origin of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150, 199-204.
- Mossel, D.A.A., Moreno, B., Struijk, C.B.** (2003). In: *Microbiología de los alimentos* ed. Acribia S.A. pp. 356-357. Zaragoza (España).
- Pretorius, I.S.** (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D.** (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by yeasts strains. *Appl. Env. Microbiol.* 58, 2948-2953.
- Rosini, G.** (1984). Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30, 249-256.
- Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M., Dequin, S.** (2005). Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* 5, 959-969.