

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA
FACULTAT D'ENOLOGIA

ECOLOGÍA DE LEVADURAS:
SELECCIÓN Y ADAPTACIÓN A FERMENTACIONES
VÍNICAS

Memoria presentada por
M^a JESÚS TORIJA MARTÍNEZ
para optar al grado de Doctora en Bioquímica
Tarragona, 2002

A mis padres

A mi hermano

A Jordi



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Dept.. Bioquímica i Biotecnologia
FACULTAT D'ENOLOGIA DE TARRAGONA
Ramón y Cajal, 70.
43005-Tarragona.
Tel. 34-977 250360
Fax 34-977 250347
E-mail: amb@astor.urv.es

Los firmantes, Dr. Albert Mas Barón, Profesor Titular de Universidad de Nutrición y Bromatología del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili, y

El Dr. Nicolas Rozès, Profesor Titular Interino de Escuela Universitaria de Nutrición y Bromatología del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili

HACEN CONSTAR,

Que el presente trabajo, con el título '**Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas**' que presenta la **Sra. María Jesús Torija Martínez**, para optar al Grado de Doctora en Bioquímica por la Universitat Rovira i Virgili ha sido realizado bajo nuestra dirección, y que todos los resultados obtenidos son fruto de los experimentos llevados a cabo por esta doctoranda.

Para que conste y tenga los efectos oportunos, firmamos el presente certificado

Dr. Albert Mas Barón

Dr. Nicolas Rozès

Tarragona, 1 de marzo de 2002

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada gracias a las becas que he disfrutado durante todos estos años, ya que me han dado el apoyo económico que todo investigador necesita (beca asociada a proyecto, beca predoctoral de la Universitat Rovira i Virgili y finalmente la beca predoctoral FI de la Generalitat de Catalunya).

Al finalizar este trabajo, hay muchas personas a las que quiero agradecer su apoyo y amistad a lo largo de estos años.

En primer lugar, a mis directores de tesis, Dr. Albert Mas Barón y Dr. Nicolas Rozès, que me han dado la oportunidad de realizar esta tesis. A ambos agradecerle su apoyo, paciencia, así como las ganas de aprender y mejorar que me han transmitido y que tan útiles me han sido y espero que me sigan siendo. Gracias por confiar en mis posibilidades y retarme a esforzarme cada día más.

Al Dr. José Manuel Guillamón por ofrecerme su ayuda de forma totalmente desinteresada en todo momento. Gracias por tu apoyo y tus ánimos.

A todos los profesores y personas vinculadas al Departament de Bioquímica i Biotecnologia, así como de la Facultad de Enología, por ayudarme en todo lo que he necesitado en estos años. Especialmente a la Dra. Montse Poblet por estar siempre ahí, proporcionándome todo lo que necesitaba así como por adentrarme en el apasionante mundo de la Biología Molecular.

A todos los doctorandos con los que he coincidido en mayor o menor medida. Gracias por proporcionarme sabiduría y buenas ideas, además de buenas diversiones. En este apartado especial mención para las Pringels (Gemma, Sumpta y Maite), por esos buenos momentos que hemos vivido juntas y espero que se repitan muy a menudo, y para el Josep, gracias por todos tus buenos consejos y no olvides que tenemos una película a medias... No quiero olvidarme tampoco de Núria (mi sucesora en el puesto), Miriam, Judit, Chiqui, Ángel, bueno en definitiva a todos. Muchísimas gracias y mucha suerte.

Un agradecimiento especial a todas aquellas personas que me han hecho de guía espiritual en el complicado (al menos para mí) mundo de la informática (Josep, Chiqui, Gemma, Jordi y mención especial a Joan Creus -gracias por tus diseños-...). Gracias a todos porque sin vuestra colaboración esta tesis no hubiera sido posible.

A la empresa Lallemand S.A. por el interés mostrado en este trabajo, y en especial a Antonio y a Eva por siempre estar a nuestra disposición.

A todas las personas que trabajan o han trabajado en la Finca Experimental Mas dels Frares, así como a los propietarios de las bodegas donde he realizado este trabajo, la bodega Jaume Sabaté (Vilella Baixa), Jaume Sangenís (Porrera), Mercedes Llobet (Bot), Barbara Forès (Gandesa), Cooperativa de Horta de Sant Joan y de Batea por prestarme toda su ayuda y permitirme utilizar sus instalaciones.

Finalmente, quiero agradecer de forma especial el apoyo incondicional de mis padres y mi hermano, que me han dado fuerza a lo largo de estos años para continuar hacia delante. Gracias de todo corazón. A Jordi, por estar a mi lado cuando más te necesitaba y transmitirme todo tu positivismo y energía. A todos mis amigos, simplemente por estar.

Seguramente me habré olvidado de muchas personas que me han ayudado en este largo camino. Lo siento ha sido un desliz. Esta tesis está igualmente dedicada a vosotros. Gracias de todo corazón sin vuestro apoyo y colaboración, esta tesis no hubiera sido posible.

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	3
PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	29

1ª PARTE: ECOLOGÍA Y SELECCIÓN DE LEVADURAS

CAPÍTULO 1

Selección de levaduras (Enviado a Tecnología del vino)	37
---	----

CAPÍTULO 2

<i>Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years</i> (Antonie van Leeuwenhoek 79, 345-352)	53
--	----

CAPÍTULO 3

<i>Effects of fermentation temperature on the strain population of <u>Saccharomyces cerevisiae</u></i> (Aceptado en Int. J. Food Microbiol.)	71
---	----

CAPÍTULO 4

Selección de cepas de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> en la Denominación de Origen Terra Alta	85
---	----

CAPÍTULO 5

Pruebas de selección en bodega	97
--------------------------------	----

CAPÍTULO 6

Discusión general	131
-------------------	-----

2ª PARTE: MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A BAJAS TEMPERATURAS

CAPÍTULO 7

<i>Effect of fermentation temperature and <u>Saccharomyces</u> species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine</i> (Enviado a Int. J. Food Microbiol.)	143
---	-----

CAPÍTULO 8	
Efecto de la temperatura en la concentración intracelular de los azúcares y ácidos orgánicos	163
CAPÍTULO 9	
<i>Effect of organic acids and the nitrogen source on alcoholic fermentation: Study of their buffering capacity</i>	179
(Enviado a J. Agric. Food Chem.)	
CAPÍTULO 10	
<i>Effect of the nitrogen source on the fatty acid composition of <u>Saccharomyces</u> and production of volatile compounds</i>	201
(Enviado a Food Microbiol.)	
CAPÍTULO 11	
Discusión general	215
CONCLUSIONES GENERALES	227
ANEXO 1	
Protocolos	231
ANEXO 2	
Registro de la patente y folleto comercial de la cepa RV1	253

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Mi incorporación al grupo de investigación de "Biotecnología Enológica" del Departamento de Bioquímica y Biotecnología en la Facultad de Enología de Tarragona se produjo a finales del año 1996.

Durante este tiempo, nuestro grupo ha estado subvencionado por una serie de proyectos que han sido la base de la investigación que se ha estado realizando y en donde se engloba este trabajo:

- ALI96-0497 "Caracterización de microorganismos y plantas: Aplicación de técnicas de Biología Molecular a la Viticultura y Enología"
- CDTI/Miguel Torres, S.A. "Evaluación de los condicionantes del mosto en el desarrollo de la fermentación alcohólica"
- PETRI 95-0179-OP "Selección de levaduras de las Denominaciones de Origen Terra Alta y Priorat para su utilización como iniciadores de fermentación"
- FEDER 2FD97-1854 "Selección, adaptación y puesta a punto a nivel industrial de levaduras para la fermentación a bajas temperaturas (13°C)"
- AGL2000-0205-P4-03 "Análisis de los mecanismos moleculares y bioquímicos de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones vínicas a bajas temperaturas. Producción y utilización a nivel industrial".

En estos proyectos también han participado empresas privadas como Lallemand, S.A., Miguel Torres, S.A., Sepsa (Sociedad Expendidora del Penedès, S.A.), Cava Gramona, habiéndose establecido con algunas de ellas contratos de I+D específicos.

La primera parte de este trabajo tiene que ver con la necesidad de asegurar la completa finalización de la fermentación alcohólica, así como la tipicidad y reproducibilidad de los vinos. Para poder cumplir todos estos requisitos, la estrategia más adecuada parece ser la inoculación con una cepa autóctona, que está mejor adaptada y puede mantener las características típicas de la zona. Por tanto, los **objetivos** de la primera parte del trabajo eran:

1. Conocer la ecología de levaduras de dos Denominaciones de Origen (Terra Alta y Priorat), haciendo un seguimiento de fermentaciones espontáneas realizadas en bodegas de esas zonas.
2. Seleccionar una o varias cepas de levadura entre las aisladas en el estudio ecológico para utilizarlas como iniciadores de fermentación. Esta selección al estar ligada a un proyecto en

el que había una colaboración entre la Universidad y una empresa privada (Lallemand S.A.) tenía como objetivo final comercializar alguna de estas cepas para ser utilizadas en fermentaciones con características similares a las de estas zonas.

Para cumplir este objetivo, se realizó una selección masiva por competencia, donde un número elevado de cepas competía por los nutrientes. Además, como criterio adicional se utilizó la temperatura. La temperatura es una variable muy importante en las fermentaciones alcohólicas ya que interacciona tanto en el desarrollo del proceso como en las características del producto final.

Esta importancia de la temperatura de fermentación sirvió como base de la segunda parte de la tesis, en la que se pretendía conocer más sobre los mecanismos adaptativos de las levaduras frente a las bajas temperaturas. Las fermentaciones a bajas temperaturas son una práctica que empieza a ser muy habitual en bodega para favorecer la producción de vinos blancos más aromáticos. Esta práctica, sin embargo, comporta algunos problemas, por lo que son procesos que requieren de un estudio más exhaustivo.

Nuestro **objetivo** concreto era:

3. Determinar los cambios que se producen en la composición de ácidos grasos de membrana en diferentes cepas debidos a la temperatura de fermentación, ya que se sabe que se trata de un parámetro altamente influenciado por los cambios ambientales, así como en la producción de compuestos volátiles. También se quería estudiar el efecto de la temperatura en la evolución intracelular de algunos metabolitos (ácidos orgánicos, azúcares y alcoholes) durante la fermentación alcohólica.

A partir de este estudio surgieron dos nuevos **objetivos**:

4. Analizar el efecto de los ácidos orgánicos en la fermentación alcohólica

5. Estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno en la fermentación alcohólica y en la composición de ácidos grasos de membrana.

Primera Parte: ECOLOGÍA Y SELECCIÓN DE LEVADURAS

1. ¿Por qué un estudio ecológico?

Numerosos estudios ecológicos se han realizado a lo largo de los años para conocer la dinámica, cuantificación y composición de la microflora responsable de las fermentaciones espontáneas del mosto.

La fermentación del mosto es un proceso bioquímico muy complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos. Entre todos ellos, las levaduras son los microorganismos clave en la vinificación, ya que son los responsables de la fermentación alcohólica, la principal reacción en la conversión del mosto en vino.

1.1. Origen de las levaduras responsables de las fermentaciones espontáneas

Las levaduras pueden tener su origen en la uva o en la bodega (material que entra en contacto con el mosto).

En una uva sana y madura que sea prensada asépticamente, la población de levaduras total en el mosto puede variar entre 10^3 - 10^5 ufc/ml, aunque el número de especies diferentes presentes en la uva será limitado.

La especie mayoritaria en la superficie de la uva es la apiculada *Hanseniaspora uvarum* y su forma imperfecta, *Kloeckera apiculata*, que representan aproximadamente el 50-75% de la población total. Otros géneros significativos son *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Hansenula* y *Rhodotorula* (Rosini *et al.*, 1982; Parish y Carroll, 1985).

Sin embargo, el origen de *Saccharomyces* es una cuestión controvertida, ya que existen dos teorías. La primera defiende que las uvas dañadas (por hongos, exceso de agua, pájaros, insectos, etc.) sirven de "depósito" para microorganismos, entre los que se incluye *Saccharomyces cerevisiae*, y que por tanto, estas uvas son la principal fuente de levaduras en las fermentaciones espontáneas. La forma en que estos microorganismos llegan a estas uvas se cree que se debe principalmente a los insectos (Mortimer y Polsinelli, 1999). La segunda teoría apuesta porque su principal procedencia es el ambiente de bodega (superficies del equipamiento de bodega: bombas, tuberías, depósitos de fermentación etc.), aunque no descarta una presencia minoritaria de *S. cerevisiae* en las uvas (Martini, 1993; Fleet y Heard, 1993; Vaughan-Martini y Martini, 1995).

Por lo que respecta a la microbiota que se puede encontrar en el ambiente de bodega, también se han realizado numerosos estudios (Belin, 1979; Rosini, 1984). En ellos, se ha visto que la principal especie de bodega es *S. cerevisiae*. Aunque también se han encontrado otras especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* y *Brettanomyces* (y su forma perfecta *Dekkera*).

1.2. ¿Por qué estudiar fermentaciones alcohólicas espontáneas?

Porque es la única forma de conocer la dinámica poblacional propia de una bodega o región vitivinícola.

Las fermentaciones espontáneas son aquellas que se producen de forma natural, es decir, las realizan las levaduras provenientes de la uva y del material de bodega, sin ningún tipo de inoculación externa. Esto hace que las fermentaciones espontáneas no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación (Kunkee y Amerine, 1970; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; Lafon-Lafourcade, 1983; Zambonelli, 1988).

Así, en los primeros días de fermentación, los géneros mayoritarios son *Hanseniapora/Kloeckera*, *Candida* y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia* (Querol *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1991; Fleet y Heard, 1993; Schütz y Gafner, 1994). Después de estos 2 o 3 primeros días, estos géneros reducen su número, dando paso al crecimiento de otras especies más tolerantes al etanol como son las de *Saccharomyces*. De hecho, *S. cerevisiae* es considerada la principal especie responsable de las fermentaciones alcohólicas (Ribéreau-Gayon, 1985). De todas maneras, algunos estudios realizados (Fleet *et al.*, 1984; Heard y Fleet, 1986) han mostrado que algunas especies de no-*Saccharomyces* (especialmente *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* y *Candida colliculosa*) también contribuyen a la fermentación, ya que estas especies sobreviven más de lo que se pensaba inicialmente, pudiendo alcanzar poblaciones máximas de 10^6 - 10^7 ufc/ml. Por tanto, este crecimiento es cuantitativamente significativo y seguramente influenciará la composición organoléptica del vino. Además, las modificaciones que produzcan éstas en la composición del mosto tendrán un efecto en la cinética de la fermentación y comportamiento bioquímico de *Saccharomyces*.

A pesar de que la fermentación espontánea es una sucesión de géneros y especies de levaduras, sólo unas pocas cepas de *S. cerevisiae* controlan la mayor parte de la fermentación. Esto

es el resultado de una selección natural durante la fermentación espontánea (Frezier y Dubourdiou, 1992; Vezinhet *et al.*, 1992; Fleet y Heard, 1993; Versavaud *et al.*, 1993). Tradicionalmente, los métodos utilizados para la identificación y caracterización de especies y cepas de levadura se han basado en sus características morfológicas, sexuales y bioquímicas (Kreger-Van Rij, 1984; Barnett *et al.*, 1990), pero estas características están muy influenciadas por las condiciones del cultivo y pueden dar resultados poco precisos (Yamamoto *et al.*, 1991). En los últimos años, diversas técnicas de Biología Molecular han sido desarrolladas para la identificación de especies y cepas de levaduras. La aplicación de estas técnicas ha demostrado que hay una amplia diversidad genética entre las cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Querol *et al.*, 1992a; Versavaud *et al.*, 1993; Quesada y Cenis, 1994).

La diversidad, composición y evolución de la microbiota de levaduras presente en el mosto se ha visto que depende de varios factores como pueden ser (i) la localización geográfica y las condiciones climáticas (temperatura, lluvias, etc.), (Fleet *et al.*, 1984; Parish y Carrol, 1985; Querol *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1991), (ii) la variedad y madurez de la uva, así como la edad de la viña (Martini *et al.*, 1980; Rosini *et al.*, 1982; Martínez *et al.*, 1989), (iii) el uso de fungicidas (Bureau *et al.*, 1982), (iv) los daños físicos causados a la uva por hongos, insectos o pájaros (Longo *et al.*, 1991) y (v) las condiciones de vinificación (Suárez-Lepe, 1997; Epifanio *et al.*, 1999). Esta gran diversidad ha originado muchos trabajos en los que se ha analizado la dinámica poblacional de fermentaciones espontáneas llevadas a cabo en diferentes campañas en una misma bodega (Schütz y Gafner, 1994; Constantí *et al.*, 1997; Sabaté *et al.*, 1998; Beltran *et al.*, 2002), en diferentes bodegas de una misma zona (Versavaud *et al.*, 1995) o en diferentes regiones vitivinícolas (Longo *et al.*, 1991; Khan *et al.*, 2000; van der Westhuizen *et al.*, 2000). Además, se ha visto que la calidad del vino también está claramente afectada por la cepa de *S. cerevisiae* que lleva a cabo la fermentación (Vezinhet y Pineau, 1990; Fleet y Heard, 1993). De hecho, ya lo dijo Pasteur (1876): "las cualidades del vino dependen en gran parte de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de los mostos. Podemos pensar que si se sometiera a un mismo mosto a la acción de levaduras distintas se lograrían vinos de distinta naturaleza".

1.3. ¿Por qué la utilización de inóculos comerciales?

La necesidad de asegurar la fermentación y la calidad del producto, ante el hecho de que hay un gran número de variables que intervienen en una fermentación espontánea, ha favorecido que el uso de las levaduras secas activas (LSA) se haya convertido en una práctica habitual en enología.

La inoculación con LSA favorece un inicio más rápido de fermentación (normalmente se reduce la fase de latencia) y un consumo total de los azúcares fermentables, reduciendo los posibles problemas de fermentación. Además permite un mayor control microbiológico, lo que no es posible en fermentaciones espontáneas (Longo *et al.*, 1992). Asimismo, se ha demostrado que se obtiene un producto de una calidad más uniforme a lo largo de las diferentes campañas (Ribéreau-Gayon, 1985; Giudici y Zambonelli, 1992; Fleet y Heard, 1993). Esta última cuestión tiene sus defensores y detractores, ya que se puede obtener mayor repetitividad a expensas de perder algo de complejidad en el vino final. De hecho, siempre se ha creído que las levaduras autóctonas dan un distintivo de tipicidad y estilo al vino que puede perderse con la inoculación (Mateo *et al.*, 1991; Fugelsang, 1996; Heard, 1999). De todas maneras, un estudio realizado por Querol *et al.* (1992b) ha demostrado que la rápida imposición de la levadura seca activa reduce el número de cepas de *Saccharomyces* autóctonas pero no las elimina totalmente durante los primeros días de fermentación, con lo que todavía pueden tener un importante efecto en el aroma y características del vino.

1.4. ¿Por qué la existencia de diversas cepas comerciales?

A pesar de que ya hacía algunos años que se inoculaba mediante cultivos frescos mantenidos en las estaciones enológicas, no fue hasta mediados de los 60 y como respuesta a las necesidades de las bodegas de California, que se produjeron las primeras levaduras secas. Inicialmente, sólo se produjeron comercialmente 2 cepas de *S. cerevisiae* (Montrachet y Pasteur Champagne) y éstas se utilizaron universalmente como iniciadores en todo tipo de fermentaciones, con un éxito limitado. Pronto se demostró que estas cepas no eran una solución universal para las fermentaciones del mosto y apareció la necesidad de seleccionar cepas mejor adaptadas a las diferentes regiones del mundo y sus respectivas variedades de uva.

Para la selección de cepas es esencial establecer cuáles son sus propiedades enológicas (Degré, 1993). Hay diferentes criterios de selección que se pueden dividir en: favorables

(tolerancia al etanol, buen rendimiento en la transformación de los azúcares en etanol, capacidad de crecer en altas concentraciones de azúcar, etc.) y desfavorables (como la producción de H_2S , producción de espuma o acidez volátil). No obstante, hay algunos aspectos que habitualmente se han considerado propiedades favorables como el carácter killer o la degradación de ácido málico y que se pueden englobar en un tercer grupo denominado neutros (Cuinier, 1985; Pretorius y van der Westhuizen, 1991; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000).

Además, utilizando técnicas de Biología Molecular (cariotipos, amplificación de elementos δ o análisis de restricción del ADN mitocondrial) se ha demostrado la existencia de cepas autóctonas de *S. cerevisiae* representativas de una determinada región (Vezinhet *et al.*, 1992; Versavaud *et al.*, 1995; Guillamón *et al.*, 1996), confirmando que las cepas de levaduras están totalmente adaptadas a determinadas características climáticas y substratos. Así, algunos enólogos admiten que pueden obtenerse mejores resultados si se utilizan levaduras seleccionadas procedentes de la microzona donde van a ser utilizadas (Martini y Vaughan-Martini, 1990).

1.5. ¿Por qué las Denominaciones de Origen Terra Alta y Priorat?

A) TERRA ALTA



B) PRIORAT



Figura 1. Extensión territorial de las Denominaciones de Origen Terra Alta (A) y Priorat (B).

Las Denominaciones de Origen (D.O.) Terra Alta y Priorat son dos regiones vitivinícolas próximas geográficamente y pertenecientes a la provincia de Tarragona, que se encuentran en pleno desarrollo, debido principalmente a la industria enológica, que hasta ahora había sido un negocio puramente familiar y a pequeña escala. Además tienen una serie de características que las hacen idóneas para un estudio de selección de levaduras:

- sus vinos tienen mucho cuerpo y elevado grado alcohólico (debido a que se trata de mostos muy ricos en azúcares), por lo que las levaduras son resistentes a altas concentraciones de etanol.
- la falta, en muchos casos, de tecnología, lo que supone la utilización de sistemas clásicos para la conducción de las fermentaciones alcohólicas, es decir:
 - falta de regulación térmica. Muchas fermentaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente, con la variabilidad que eso supone (levaduras con un amplio rango de temperaturas de fermentación).
 - elevadas dosis de SO₂ (levaduras resistentes).
 - ausencia de inoculación (fermentaciones llevadas a cabo únicamente por levaduras autóctonas).
 - en algunos casos, una higiene precaria (levaduras con una buena capacidad competitiva).

1.6. ¿Qué criterios de selección utilizar?

Cuando se quiere seleccionar una cepa de *S. cerevisiae* para utilizarla como iniciador de fermentación y se parte de un número elevado de cepas diferentes, se puede aplicar lo que se conoce como selección masiva por competencia. Este método de selección es similar a lo que ocurre en las fermentaciones espontáneas, ya que se basa en la propia competencia entre las cepas por los nutrientes del medio, para elegir aquellas que tengan una mejor capacidad fermentativa. Este criterio, no obstante, puede no ser suficiente, por lo que se hace necesario utilizar otros. En nuestro caso también se emplearon la temperatura de fermentación, la finalización correcta del proceso y los análisis organolépticos de los vinos.

1.6.1. La temperatura de fermentación

La temperatura a la que se lleva a cabo la fermentación alcohólica afecta: (i) al crecimiento de las levaduras y por tanto a la duración de la fermentación, (ii) a la contribución que las diferentes especies de levaduras tienen en la fermentación y (iii) al metabolismo de las levaduras, que es el que determina la composición química y organoléptica del vino (Fleet y Heard, 1993).

Entre 15 y 35°C se sabe que disminuye la duración de la fase de latencia y aumenta la velocidad de fermentación al incrementar la temperatura, aumentando también la velocidad de consumo de azúcar y nitrógeno. Además, al modificarse el metabolismo de las levaduras, como ya se ha mencionado anteriormente, también se varía la composición del vino final. Así, las temperaturas más elevadas favorecen una mayor producción de la mayoría de los productos de la fermentación gliceropirúvica a costa de una menor producción de etanol. Aún así, los compuestos cuya formación está más influenciada por la temperatura son los alcoholes superiores, los ácidos grasos de cadena corta y sus ésteres, ya que tienen su máximo de producción a los 20°C, para progresivamente ir disminuyendo según aumenta la temperatura (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Por tanto, las bajas temperaturas de fermentación están justificadas cuando se desea una concentración elevada de estos compuestos, como es el caso de las vinificaciones en blanco.

De hecho, la temperatura de fermentación es una de las características diferenciadoras entre la vinificación en blanco y en tinto. En las vinificaciones en blanco, la temperatura de fermentación idónea es una temperatura entre 15-20°C ya que así se favorece una mayor producción y retención de los aromas. En las vinificaciones en tinto, por el contrario, se utilizan temperaturas de fermentación más elevadas (22-28°C) porque lo que interesa es que haya una mayor extracción de los compuestos fenólicos de las pieles de la uva, responsables del color tinto del vino, la cual se ve favorecida cuanto mayor es la temperatura.

La temperatura de fermentación también afecta a la dinámica poblacional de las levaduras que llevan a cabo el proceso. Varios autores han mencionado que especies como *Kloeckera apiculata* o *Candida stellata* pueden mantener altos niveles de población (10^7 - 10^8 ufc/ml) a lo largo de fermentaciones a bajas temperaturas (p.e. 10-15°C), llegando en algunos casos a poder reemplazar a *Saccharomyces* como especie dominante (Sharf y Margalith, 1983; Heard y Fleet, 1988). Una de las posibles razones para esta mejor supervivencia es que a bajas temperaturas estas especies aumentan su tolerancia al etanol (Gao y Fleet, 1988). En cambio, muy pocos estudios (Fleet y Heard, 1993; Epifanio *et al.*, 1999) se han realizado sobre el efecto de la temperatura en la

diversidad de cepas de *S. cerevisiae*. Por lo tanto, resultaba interesante profundizar en el análisis de los efectos de la temperatura de fermentación sobre la dinámica poblacional de *Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica.

Segunda Parte: MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A BAJAS TEMPERATURAS

2.1. ¿Por qué se estudian las fermentaciones a bajas temperaturas?

Las fermentaciones a bajas temperaturas aunque proporcionan grandes ventajas como la mayor aromaticidad de los vinos blancos, son procesos bastante problemáticos, ya que suelen producirse ralentizaciones o incluso paradas de fermentación. Las fermentaciones lentas y las paradas son el principal problema de las fermentaciones vnicas, por lo que son objeto de numerosos estudios.

Las fermentaciones lentas y en su caso más extremo, las paradas de fermentación, tienen lugar cuando hay un consumo más lento del azúcar del mosto. Esta bajada del consumo es un indicador de que hay unas condiciones ambientales o fisiológicas adversas. Hay muchas causas que pueden generar estos problemas fermentativos: deficiencias en algún nutriente, altas concentraciones de etanol, toxicidad por parte de ácidos orgánicos o ácidos grasos, presencia de toxinas killer, temperaturas extremas, residuos de pesticidas o fungicidas, competencia entre los microorganismos, altas concentraciones de SO₂, una excesiva clarificación, falta de agitación y oxigenación, etc (Lafon-Lafourcade y Ribéreau-Gayon, 1984; Fleet y Heard, 1993; Boulton, 1996; Alexandre y Charpentier, 1998; Bisson, 1999). Además, la combinación de varios de estos factores actuando de forma sinérgica provoca una mayor inhibición del crecimiento y por tanto, de la fermentación.

Por lo que respecta a la temperatura, ambos extremos pueden provocar este tipo de problemas. El principal efecto tanto de las bajas como de las altas temperaturas se produce en la membrana plasmática (Watson, 1987; Suutari *et al.*, 1990). La temperatura afecta la fluidez de membrana y por tanto, al transporte. Las bajas temperaturas reducen la fluidez y restringen los cambios conformacionales de los transportadores mientras que las altas temperaturas causan los efectos contrarios, es decir, aumentan la fluidez, lo que puede resultar en una excesiva disociación

de la estructura de los transportadores comportando un menor control de la permeabilidad de los substratos por parte de la membrana (Bisson, 1999).

Además, una baja temperatura inicial puede limitar el crecimiento de las levaduras, teniendo una población de levaduras insuficiente para una correcta fermentación (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

2.1. ¿Por qué estudiar los ácidos grasos de membrana?

Los ácidos grasos son los principales componentes de los fosfolípidos de las membranas de las células, por lo que desempeñan un importante papel en la determinación de sus propiedades (Swan y Watson, 1997).

La membrana plasmática es el primer elemento de contacto entre la célula y su entorno, por lo que se considera que juega un papel esencial en la respuesta adaptativa de *S. cerevisiae* (Sajbidor, 1997). Así, pequeñas alteraciones en la membrana pueden originar cambios importantes en las actividades de muchas funciones esenciales dependientes de la membrana, como el transporte, la permeabilidad de los iones, etc. (Keenan *et al.*, 1982; Hazel y Williams, 1990) que pueden afectar a la viabilidad, capacidad de fermentación y tolerancia al etanol de las levaduras (Rozès *et al.*, 1988; del Castillo, 1992). De hecho, las propiedades físicas de la membrana están claramente determinadas por la composición lipídica, siendo uno de los principales factores el grado de insaturación (Avery *et al.*, 1996).

Se sabe que cambios en las condiciones ambientales inducen cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (Baleiras Couto y Huis in't Veld, 1995) Estas alteraciones suelen reflejarse en cambios tanto en las proporciones relativas de algunos ácidos grasos como en la longitud media de cadena, que se cree que son necesarios para mantener una correcta fluidez de membrana. La cantidad de esteroides así como la naturaleza de los grupos polares de los fosfolípidos también tienen su importancia en el control de la fluidez de membrana (Hosono, 1992).

Algunos de los aspectos ambientales que tienen una gran influencia en la composición de ácidos grasos de membrana pueden ser la disponibilidad de oxígeno, la temperatura, el etanol, etc.

El oxígeno tiene una gran influencia en la composición de ácidos grasos, debido a que la ausencia de oxígeno como ocurre en condiciones de anaerobiosis, impide la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides (O'Connor-Cox y Ingledew, 1990; van der Rest *et al.*, 1995). Así, la

inhibición de la biosíntesis de estos compuestos, trae como consecuencia, una clara disminución del crecimiento celular, la viabilidad y la actividad fermentativa (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1979; Youings y Rose, 1989).

La temperatura de fermentación, por su parte, tiene también un fuerte efecto en la composición de ácidos grasos de membrana de los diferentes microorganismos (Nordström y Laakso, 1992; Kamimura *et al.*, 1993). Generalmente, levaduras y bacterias suelen presentar un incremento de la proporción de ácidos grasos insaturados a bajas temperaturas (Nordström y Laakso, 1992), aunque Suutari *et al.* (1990) observó que esto no ocurre en todas las especies de levaduras. De todas maneras, lo que está bien establecido es que la mayoría de los organismos, incluyendo animales, plantas y microorganismos regulan su composición de membrana como respuesta a cambios en la temperatura ambiental para poder mantener una fluidez de membrana óptima y así una función celular normal (Swan y Watson, 1997).

La producción de etanol por parte de *S. cerevisiae* está limitada por el efecto tóxico que tiene éste sobre su organismo (Casey y Ingledew, 1986) y aunque su mecanismo de acción se desconoce, se cree que la membrana plasmática puede ser una de sus dianas (D'Amore y Stewart, 1987). El principal cambio producido por el etanol en la composición lipídica de las células es un aumento tanto de la proporción de ácidos grasos insaturados como de la longitud media de cadena, conduciendo a una mayor fluidez de membrana (Eaton *et al.*, 1982). De hecho, algunos autores han establecido una relación entre la fluidez de membrana y su tolerancia al etanol (Thomas y Rose, 1979; Beavan *et al.*, 1982; Mishra y Prasad, 1989). Además, se ha demostrado que en el medio, la combinación de los ácidos grasos de cadena corta (hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico) y el etanol puede inhibir el crecimiento de las levaduras (Geneix *et al.*, 1984; Ravaglia y Delfini, 1993).

Por tanto, el conocimiento de los posibles cambios en la composición de ácidos grasos de membrana puede ayudar a entender los diferentes comportamientos frente a las bajas temperaturas.

Como otros mecanismos deben estar implicados en el metabolismo adaptativo de *Saccharomyces* frente a cambios en la temperatura de fermentación, se analizaron diferentes metabolitos celulares. A partir de estos resultados, se decidió centrar este trabajo en el estudio del efecto de los ácidos orgánicos y la fuente de nitrógeno en el desarrollo de la fermentación alcohólica.

2.2. Los ácidos orgánicos

2.2.1. *En la uva*

Aunque la uva contiene desde el inicio hasta el final de su desarrollo la mayoría de los ácidos que intervienen en la vía glicolítica así como en los ciclos de Krebs y del glioxilato, éstos se encuentran en concentraciones muy pequeñas, siendo los ácidos tartárico y málico los mayoritarios, pudiendo representar hasta un 90% del total.

Estos dos ácidos aunque presentan similitudes químicas, utilizan para su síntesis, vías metabólicas muy diferentes. De hecho, no tienen una evolución idéntica durante el desarrollo de la uva y su maduración (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

La uva es el único fruto cultivado de origen europeo que acumula cantidades significativas de ácido tartárico. Este ácido es un producto secundario del metabolismo de los azúcares y se considera que el ácido ascórbico es el principal intermediario en su síntesis. El ácido tartárico puede ser degradado por algunas cepas de bacterias lácticas, significando siempre un descenso en la calidad del vino y un aumento de la acidez volátil. Además éste es el principal ácido degradado cuando la uva está infectada por *Botrytis cinerea*.

El ácido málico, por su parte, es un producto muy activo del metabolismo de las uvas, siendo sus precursores, los azúcares. La producción de ácido málico puede deberse a vías catabólicas (glucolisis, vía de las pentosas) o a la β -carboxilación del fosfoenolpiruvato (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). A diferencia de lo que ocurre con el ácido tartárico, el contenido de ácido málico en las bayas disminuye durante el período de maduración. Así, en las zonas de climas cálidos, las uvas contienen poco ácido málico en el momento de la vendimia (Boulton *et al.*, 1996). Además el ácido málico es fácilmente metabolizable por las bacterias lácticas del vino.

2.2.2. *En el vino*

Prácticamente todos los ácidos presentes en el vino provienen de la uva, aunque una pequeña cantidad se produce durante la fermentación, por lo tanto, los ácidos mayoritarios en los vinos son al igual que ocurría en el mosto, los ácidos tartárico y málico. De hecho, entre ambos contribuyen entre un 70-90% a la acidez total del vino. Otros ácidos orgánicos presentes en el vino, entre los que se incluyen: los ácidos glucónico (especialmente en uvas infectadas por *Botrytis*), glioxílico, glucurónico, pirúvico, cítrico, succínico, láctico y fumárico, están presentes

en bajas concentraciones y por tanto, contribuyen poco a la acidez y pH del vino (Dartiguenave *et al.*, 2000).

Un apartado especial requiere el ácido acético, que es el principal ácido volátil del vino. Su formación se debe a la acción de las levaduras durante la fermentación alcohólica, pero también se debe a ataques bacterianos por parte de bacterias acéticas o lácticas. Las características organolépticas negativas de este ácido, lo convierten en un producto poco deseable, y en concentraciones elevadas se considera un defecto del vino (coloquialmente conocido como vino picado). La producción de ácido acético por *Saccharomyces* suele variar entre 100-200 mg/l, dependiendo de la cepa utilizada, la temperatura de fermentación y la composición del mosto (Boulton *et al.*, 1996). De hecho, está descrito que la producción de ácido acético depende principalmente de la concentración de azúcar en el medio, y que es independiente de la cantidad que sea fermentada, es decir, que cuanto mayor sea la concentración de glucosa en el medio, mayor será la producción de ácido acético (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Tabla 1. Principales ácidos orgánicos del vino.

Ácido	Fórmula	P.M.	pk _a
L-(+) Tartárico	HOOC-CHOH-CHOH-COOH	150	3,01 4,37
L-(+) Málico	HOOC-CH ₂ -CHOH-COOH	134	3,46 5,13
Cítrico	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	192	3,14 4,77 5,74
L-(+) Láctico	HOOC-CHOH-CH ₃	90	3,86
Succínico	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -COOH	118	4,18 5,23

La concentración de cada ácido en el vino depende de varios factores como son el tipo de mosto, la actividad microbiana de la cepa de levadura o las condiciones en las que se lleva a cabo la fermentación alcohólica (Ramon-Portugal *et al.*, 1999).

Los ácidos orgánicos, por tanto, al ser los principales responsables de la acidez total del vino, tienen una demostrada contribución a las características organolépticas finales del vino, así como a la estabilidad biológica y fisicoquímica posterior del mismo.

Además, los ácidos orgánicos son importantes para las levaduras porque pueden (Jennings, 1995):

- ser utilizados como fuente de carbono
- contribuir al potencial osmótico intracelular
- contribuir al equilibrio de cargas intracelular
- intervenir en el control del pH intracelular

De todas maneras, todavía quedan incógnitas sobre el transporte de estos ácidos en las levaduras. De hecho, aunque en *S. cerevisiae*, se conocen dos sistemas de entrada para los ácidos monocarboxílicos (Casal *et al.*, 1995, 1996), ninguna permeasa para ácidos dicarboxílicos ha sido identificada, a diferencia de lo que ocurre en otras levaduras (*Kluyveromyces marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida utilis* o *Hansenula anomala*) donde se conocen permeasas para algunos de estos ácidos (Côrte-Real y Leão, 1990; Cassio y Leão, 1991, 1993; Sousa *et al.*, 1992; Queiros *et al.*, 1998). Se cree que al pH del vino, en *S. cerevisiae*, los ácidos dicarboxílicos atraviesan la membrana por difusión simple de su forma no disociada.

2.3. La fuente de nitrógeno

El mosto contiene una concentración relativamente alta de compuestos nitrogenados constituida principalmente por: amonio (3-10% del nitrógeno total), aminoácidos (25-30%), polipéptidos (25-40%) y proteínas (5-10%). La concentración de nitrógeno en la uva depende principalmente de la variedad y de las condiciones ambientales y de crecimiento (sobre todo de los fertilizantes nitrogenados). Ésta disminuye en casos de sobremaduración o podredumbre y en situaciones donde la viña ha sufrido condiciones de sequía.

En la vinificación en blanco, debido principalmente al proceso de desfangado, suele disminuir la concentración de nitrógeno asimilable (sobre todo en aminoácidos) y de proteínas,

mientras que la vinificación en tinto favorece una mejor extracción de los componentes de la piel, aumentando, por tanto, su concentración. Este es el motivo por el que en las vinificaciones en blanco suele ser tan importante la adición de compuestos nitrogenados al inicio de la fermentación, para intentar evitar una ralentización o parada de fermentación. Normalmente se suele añadir una sal de amonio, siendo las preferidas el sulfato o fosfato de amonio (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Tabla 2. Clasificación de los aminoácidos y amonio según su velocidad de asimilación por parte de *S. cerevisiae* en condiciones enológicas (Jiranek *et al.*, 1990)

GRUPOS	VELOCIDAD DE ASIMILACIÓN	COMPUESTOS
A	Rápida	Arginina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, isoleucina, leucina, lisina, serina, treonina, NH ₄
B	Lenta	Ácido glutámico, alanina, histidina, metionina, fenilalanina, valina
C	Asimilados cuando no hay ni A ni B	Glicina, triptófano, tirosina
D	Prácticamente nula	Prolina

S. cerevisiae tiene, por tanto, a su disposición una amplia variedad de compuestos nitrogenados en el mosto. Las diferencias observadas en la velocidad de absorción de los diferentes aminoácidos y amonio en condiciones enológicas, ha llevado a clasificar estos compuestos en 4 grupos dependiendo de su velocidad de asimilación por parte de la célula (Tabla 2). De todas maneras, se cree que las fuentes de nitrógeno preferidas por las levaduras son el amonio, la glutamina y la asparagina (ter Schure *et al.*, 2000).

El amonio es fácilmente asimilado por *S. cerevisiae* y puede satisfacer todas sus necesidades de compuestos nitrogenados, ya que a partir de amonio es capaz de sintetizar todos los aminoácidos. Por lo tanto, *S. cerevisiae* no necesita que en el medio haya aminoácidos, pero su adición estimula el crecimiento. Los polipéptidos y las proteínas no participan en el crecimiento de *S. cerevisiae*, ya que no es capaz de hidrolizarlos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

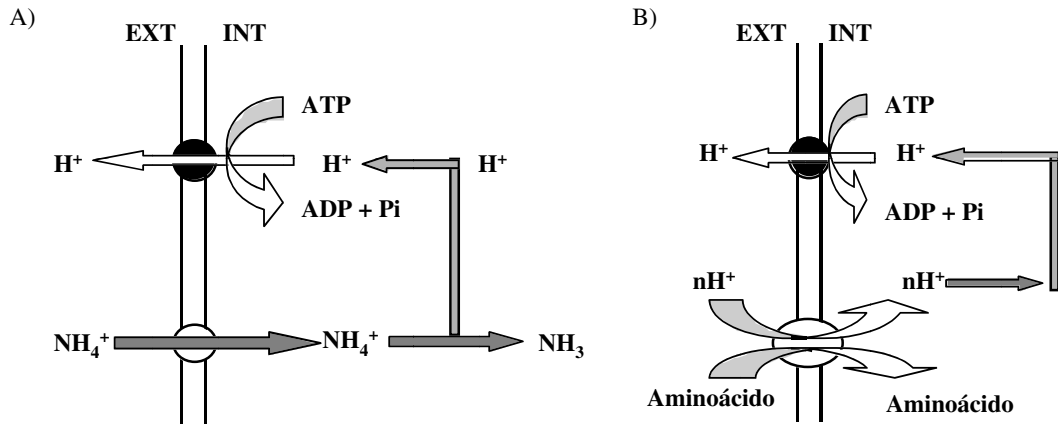


Figura 2. Esquema del funcionamiento de transporte del amonio (A) y de los aminoácidos (B) en *S. cerevisiae*.

El transporte del amonio al interior de la célula es diferente del de los aminoácidos (ver Figura 2). El amonio, en *S. cerevisiae*, penetra en la célula mediante un sistema uniporte acoplado a una ATPasa de protones (A), mientras que los aminoácidos lo hacen mediante un simporte con uno o varios protones, que son posteriormente excretados por una ATPasa de protones (B), (Barre *et al.*, 1998)

Es evidente, pues, el interés que tiene el análisis de la composición de ácidos grasos de membrana y la producción de compuestos volátiles para tratar de profundizar en los mecanismos adaptativos de la célula frente a las bajas temperaturas así como el conocer el posible efecto de los ácidos orgánicos y la fuente de nitrógeno en el desarrollo de la fermentación alcohólica.

BIBLIOGRAFÍA

Alexandre, H. y Charpentier, C. (1998) Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 20, 20-27.

Avery, S.V., Howlett, N.G. y Radice, S. (1996) Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3960-3966.

Baleiras Couto, M.M. y Huis in't Veld, J.H.J. (1995) Influence of ethanol and temperature on the cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailii* spoilage yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 327-334.

Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (1990) Yeasts: characterisation and identification, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Barre, P., Blondin, B., Dequin, S., Feuillat, M., Sablayrolles, J.M. y Salmon, J.M. (1998) La levure de fermentation alcoolique. In: *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques.* (Ed. C. Flanzy) pp. 414-495. Technique & Documentation Lavoisier: Paris.

Beavan, M.J., Charpentier, C. y Rose, A.H. (1982) Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1447-1455.

Belin, J.M. (1979) Contribution à l'étude des levures des chais-taxonomie, répartition des levures. *Mycopathologia* 67, 67-81.

Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N. y Mas, A. (2002) Analysis of yeast population during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* (aceptado)

Bisson, L.F. (1999) Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 107-119.

Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. y Kunkee, R.E. (1996) Principles and practices of winemaking. Chapman and Hall, New York.

Bureau, G., Brun, D., Vignes, A., Maujean, A., Vesselle, G. y Feuillat, M. (1982) Étude d'une microflore levurienne champenoise. *Conn. Vigne Vin* 16, 15-32.

Casal, M., Blázquez, M., Gamo, F.J., Gancedo, C. y Leão, C. (1995) Lack of lactate proton symport activity in *pck1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microb. Lett.* 128, 2620-2623.

Casal, M., Cardoso, H. y Leão, C. (1996) Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 142, 1385-1390.

Casey, G.P. y Ingledew, W.M. (1986) Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13, 219-280.

Cassio, F. y Leão, C. (1991) Low- and high-affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3623-3628.

Cassio, F. y Leão, C. (1993) A comparative study on the transport of L(-)malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: evidence for a general organic acid permease. *Yeast*, 9, 743-752.

- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. y Guillamón, J.M.** (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339-344.
- Côrte-Real, M. y Leão, C.** (1990) Transport of malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Hansenula Anomala*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1109-1113.
- Cuinier, C.** (1985) Le levurage spécifique. *Viticulture Tourangelle* 215, 15-18.
- D'Amore, T. y Stewart, G.G.** (1987) Ethanol tolerance of yeast. *Enz. Microb. Technol.* 9, 322-330.
- Dartiguenave, C., Jeandet, P. y Maujean, A.** (2000) Study of the contribution of major organic acids of wine to the buffering capacity of wine in model solutions. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 352-356.
- Degré, R.** (1993) Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet) pp. 421-447. Chur, Harwood Academic Publishers GmbH.
- del Castillo Agudo, L.** (1992) Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Appl. Microbiol. Biotech.* 37, 647-651.
- Eaton, L.C., Tedder, T.F. y Ingram, L.O.** (1982) Effects of fatty acid composition on the sensitivity of membrane functions to ethanol in *Escherichia coli*+. *Substance and Alcohol Actions/Misuse* 3, 77-87.
- Epifanio, S.I., Gutiérrez, A.R., Santamaría, M.P. y López, R.** (1999) The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 219-224.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostínçar, A., Bobet, R., Uruburu, F. y Querol, A.** (2000) Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedès' area (Spain). *Food Microbiol.* 17, 553-562.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P.** (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034-1038.
- Fleet, G.H. y Heard, G.M.** (1993) Yeast growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Frezier, V. y Dubourdiou, D.** (1992) Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 375-380.
- Fugelsang, K.C.** (1996) In: *Wine Microbiology*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Gao, C. y Fleet, G.H.** (1988) The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata*, and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 405-410.
- Geneix, C., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P.** (1984) Relation entre les difficultés de fermentations et certaines activités enzymatiques de la levure. *Conn. Vigne Vin* 18, 205-217.
- Giudici, P. y Zambonelli, C.** (1992) Criteri di selezioni dei lieviti per enologia. *Vignevini* 9, 29-34.
- Guillamón, J.M., Barrio, E. y Querol, A.** (1996) Characterization of wine yeasts strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographical or ecological origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 122-132.

-
- Hazel, J.R. y Williams, E.E.** (1990) The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29, 167-227.
- Heard, G.M. y Fleet, G.H.** (1986) Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 38, 22-25.
- Heard, G.M. y Fleet, G.H.** (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 23-28.
- Heard, G.M.** (1999) Novel yeasts in winemaking - looking to the future. *Food Australia* 51, 347-352.
- Hosono, K.** (1992) Effect of salt on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 91-96.
- Jennings, D.H.** (1995) *The physiology of fungal nutrition.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Jiranek, V., Langridge, P. y Henschke, P.A.** (1990) Nitrogen requirements of yeast during wine fermentation. In: *Proceedings of the 7th Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, 1989.* (Eds. P.J. Williams, D.M. Davidson y T.H. Lee) pp. 166-171. Australian Industrial Publishers S.A., Adelaide.
- Kamimura, H., Fuse, H., Takimura, O. y Yamaoka, Y.** (1993) Effects of growth pressure and temperature on fatty acid composition of a barotolerant deep-sea bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 924-926.
- Keenan, M.H.J., Rose, A.H. y Silverman, B.W.** (1982) Effect of plasma-membrane phospholipid unsaturation on solute transport into *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 366. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2547-2556.
- Khan, W., Augustyn, O.P.H., van der Westhuizen, T.J., Lambrechts, M.G. y Pretorius, I.S.** (2000) Geographic distribution and evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the warmer, inland regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 17-31.
- Kreger-Van Rij, N.J.W.** (1984) *The yeast, a taxonomic study.* Elsevier, Amsterdam.
- Kunkee, R.E. y Amerine, M.** (1970) Yeasts in winemaking. In: *The Yeasts, vol 3: Yeast Technology.* (Eds. A.H. Rose y J.S. Harrison) pp. 5-72. Academic Press, London.
- Lafon-Lafourcade, S., Larue, F. y Ribéreau-Gayon, P.** (1979) Evidence for the existence of "survival factors" as an explanation for some peculiarities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 1069-1073.
- Lafon-Lafourcade, S.** (1983) Wine and brandy. In: *Biotechnology, vol 5: Food and Feed Production with Microorganisms.* (Eds. H.J. Rehm y G. Reed) pp. 81-163. Verlag Chemie, Weinheim.
- Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P.** (1984) Developments in the microbiology of wine production. *Prog. Indust. Microbiol.* 19, 1-45.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. y Villa, T.G.** (1991) Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 141-144.
- Longo, E., Velázquez, J.B., Sieiro, C., Cansado, J., Calo, P. y Villa, T.G.** (1992) Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N.W. Spain). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 539-541.

- Martínez, J., Millán, C. y Ortega, J.M.** (1989) Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from "Pedro Ximenez" grapes. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 10, 31-35.
- Martini, A., Federici, F. y Rosini, G.** (1980) A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Can. J. Microbiol.* 26, 856-859.
- Martini, A. y Vaughan-Martini, A.** (1990) Grape must fermentation: past and present. In: *Yeasts Technology*. (Eds. J.F.T. Spencer y M. Spencer) pp. 105-123, Springer-Verlag, Berlin.
- Martini, A.** (1993) Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* 3, 165-176.
- Mateo, J.J., Jiménez, M., Huerta, T. y Pastor, A.** (1991) Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to aroma of wines. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 153-160.
- Mishra, P. y Prasad, R.** (1989) Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 30, 294-298.
- Mortimer, R. y Polsinelli, M.** (1999) On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150, 199-204.
- Nordström, K.M. y Laakso, S.V.** (1992) Effect of growth temperature on fatty acid composition of ten *Thermus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1656-1660.
- O'Connor-Cox, E.S.C. y Ingledew, W.M.** (1990) Effect of timing of oxygenation on very high gravity brewing fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 48, 26-32.
- Parish, M.E. y Carroll, D.E.** (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grape and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 165-170.
- Pretorius, I.S. y van der Westhuizen, T.J.** (1991) The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 12, 3-31.
- Queiros, O., Casal, M., Athoff, S., MoradasFerreira, P. y Leão, C.** (1998) Isolation and characterization of *Kluyveromyces marxianus* mutants deficient in malate transport. *Yeast* 14, 401-407.
- Querol, A., Jiménez, M. y Huerta, T.** (1990) A study on microbiological and enological parameters during fermentation musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci.* 55, 114-122.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D.** (1992a) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D.** (1992b) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2952.
- Quesada, M.P. y Cenis, J.L.** (1995) Use of random amplified polymorphic DNA(RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 204-208.
- Ramon-Portugal, F., Seiller, I., Taillandier, P., Favarel, J.L., Nepveu, F. y Strehaiano, P.** (1999) Kinetics of production and consumption of organic acids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 37, 235-240.

-
- Ravaglia, S. y Delfini, C.** (1993) Production of MCFA and their ethyl esters by yeast strains isolated from musts and wines. *Ital. J. Food Sci.* 1, 21-36.
- van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. y Konings, W.N.** (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59, 304-322.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. y Sudraud, P.** (1975) *Sciences et Techniques du Vin*, vol. 2. Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon, P.** (1985) New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 1-10.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Donèche, B. y Lonvaud, A.** (2000) *Handbook of Enology*, vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. Wiley & Sons Ltd.: West Sussex, England.
- Rosini, G., Federici, F. y Martini, A.** (1982) Yeast flora of grapes during ripening. *Micr. Ecol.* 8, 83-89.
- Rosini, G.** (1984) Assessment of dominance of added yeast with fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine making. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30, 249-256.
- Rozès, N., Larue, F. y Ribéreau-Gayon, P.** (1988) Effect of a variation of grape must temperature on the fermentative ability and the neutral lipid content of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 10, 821-824.
- Sabaté, J., Cano, J., Querol, A. y Guillamón, J.M.** (1998) Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentation: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 452-455.
- Sajbidor, J.** (1997) Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 87-103.
- Schütz, M. y Gafner, J.** (1994) Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 253-257.
- Sharf, R. y Margalith, P.** (1983) The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 311-313.
- Sousa, M.J., Mota, M. y Leão, C.** (1992) Transport of malic acid in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for a proton-dicarboxylate symport. *Yeast*, 8, 1025-1031.
- Suárez-Lepe, J.A.** (1997) Identificación de levaduras. Seguimiento y control de implantación de las cepas seleccionadas. En: *Levaduras vnicas*, vol. 10, pp. 243-269. Ed. Mundi-Prensa: Madrid.
- Suutari, M., Liukkonen, K. y Laakso, S.** (1990) Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1469-1474.
- Swan, T.M. y Watson, K.** (1997) Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Can. J. Microbiol.* 43, 70-77.
- ter Schure, E.G., van Riel, N.A.W. y Verrips, C.T.** (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 67-83.
- Thomas, D.S. y Rose, A.H.** (1979) Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Arch. Microbiol.* 122, 49-55.

- van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H. y Pretorius, I.S.** (2000) Geographic distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the Coastal Regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 3-9.
- Vaughan-Martini, A. y Martini, A.** (1995) Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Ind. Microbiol.* 14, 514-522.
- Veziñhet, F. y Pineau, J.** (1990) La levurage. *Progrés Agricole et Viticole* 107, 219-221.
- Veziñhet, F., Hallet, J., Valade, M. y Poulard, A.** (1992) Ecological survey of wine yeast strains by methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 83-86.
- Versavaud, A., Dulau, L. y Hallet, J.N.** (1993) Étude écologique de la microflore levurienne spontanée de vignoble des Charentes et approche moléculaire de la diversité intraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Fr. Oenologie* 142, 20-28.
- Versavaud, A., Corcoux, P., Poulland, C., Dulau, L. y Hallet, J.N.** (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3521-3529.
- Watson, K.** (1987) Temperature relations. In: *The Yeast*, vol. 2: Yeast and Environment. (Eds. A.H. Rose y J.S. Harrison) pp. 41-71. Academic Press Limited, London.
- Yamamoto, N., Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K. y Totsuka, A.** (1991) Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 4, 358-363.
- Youngs, A. y Rose, A.H.** (1989) Sterol uptake by anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5, 459-463.
- Zambonelli, C.** (1988) *Microbiologia e Biotecnologia dei Vini*. Edagricole, Bologna.

PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Primera Parte: ECOLOGÍA Y SELECCIÓN DE LEVADURAS

1 Estudio ecológico de las Denominaciones de Origen Terra Alta y Priorat durante tres campañas consecutivas (1996-1998) (Capítulo 2)

El estudio se realizó en dos bodegas de cada área en las que nunca se habían inoculado levaduras comerciales. Se tomaron muestras tanto de vinificaciones en blanco como en tinto. Como variedad blanca se utilizó principalmente Macabeo y como tinta, Garnacha Negra.

Como parámetros para controlar la fermentación se utilizaron: la densidad y la población.

Las levaduras se aislaron en medio YEPD, mientras que para la diferenciación inicial entre cepas de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* se utilizaron medios selectivos: medios lisina y cicloheximida.

La identificación se realizó mediante técnicas de Biología Molecular (Anexo 1):

- } La identificación de especies se realizó por RFLPs del ADN ribosomal.
- } La identificación de cepas de *Saccharomyces* se realizó por RFLPs del ADN mitocondrial.

→ Selección de levaduras para utilizarlas como iniciadores de fermentación

} *En laboratorio* (Capítulos 3 y 4):

El estudio de selección consistía en inocular 20 cepas de *S. cerevisiae* distintas de las identificadas en el estudio ecológico en un mismo fermentador con la misma población inicial. Como criterio de selección, además de la propia competencia entre cepas, se utilizó la temperatura. Se estudió un amplio rango de temperaturas (15-35°C).

Las cepas fueron previamente crecidas en YEPD líquido fresco.

Medio: mosto de uva blanca concentrado, que se diluía para tener una concentración inicial de azúcares elevada.

- } El seguimiento de las cepas fue realizado por RFLPs del ADN mitocondrial.

} *En bodega* (Capítulo 5):

Las cepas seleccionadas en laboratorio se probaron en bodega, primero en la bodega experimental "Mas dels Frares" de la Facultad de Enología, y posteriormente en bodegas de las zonas estudiadas.

-
- } La imposición de la cepa inoculada se siguió mediante RFLPs del ADN mitocondrial.

Segunda Parte: MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A BAJAS TEMPERATURAS

↔ **Estudio del efecto de la temperatura en la composición de ácidos grasos de membrana y la formación de compuestos volátiles** (Capítulo 7)

Para estudiar los diferentes comportamientos de las cepas de *Saccharomyces* frente a las bajas temperaturas, se diseñó una experiencia en donde 3 cepas comerciales fermentaban un mosto rico en azúcares a dos temperaturas: 13 °C y 25°C.

- } En las muestras tomadas a lo largo de la fermentación se analizó, mediante cromatografía de gases, la composición de ácidos grasos de membrana y la producción de compuestos volátiles (ver Anexo 1).

↔ **Estudio del efecto de la temperatura en la concentración intracelular de azúcares, alcoholes y principalmente ácidos orgánicos** (Capítulo 8)

- } En las fermentaciones del estudio anterior también se analizaron las concentraciones intracelulares de varios compuestos, entre los que destacan los ácidos orgánicos, mediante HPLC (ver Anexo 1)

↔ **Estudio del efecto de los ácidos orgánicos en la fermentación alcohólica** (Capítulo 9)

Debido a los resultados obtenidos en el estudio anterior, se diseñó un nuevo experimento para estudiar el efecto de los ácidos orgánicos en el desarrollo de la fermentación alcohólica y la evolución del pH. Este experimento consistía en la adición de diferentes ácidos orgánicos y en diferentes concentraciones a un medio sintético sencillo.

- } Se probaron diferentes concentraciones de ácido tartárico, diferentes ácidos orgánicos y diferente pH inicial.
- } *Análisis del efecto de diferentes fuentes de nitrógeno*

Como la fuente de nitrógeno también tiene una gran importancia en el desarrollo de la fermentación y el pH, se estudió su efecto en fermentaciones en presencia o ausencia de un ácido orgánico (ác. tartárico)

→ **Estudio del efecto de la fuente de nitrógeno sobre la fermentación alcohólica y la composición de ácidos grasos de membrana** (Capítulo 10)

El diseño experimental anterior también se utilizó para determinar el efecto de la fuente de nitrógeno en el desarrollo de la fermentación alcohólica así como en la composición de ácidos grasos de membrana y producción de compuestos volátiles (mediante Cromatografía de gases).

PRIMERA PARTE:

**ECOLOGÍA Y SELECCIÓN DE
LEVADURAS**

CAPÍTULO 1:

SELECCIÓN DE LEVADURAS

M.J. Torija, G. Beltran, M. Novo, N. Hierro, M. Poblet, N. Rozès, J.M. Guillamón y A. Mas.

Tecnología del Vino
(enviado para su publicación)

INTRODUCCIÓN

Muchos estudios se han realizado sobre las levaduras vínicas desde que Pasteur (1866) demostrara que éstas eran las responsables de la transformación de los azúcares del mosto en etanol propia de las fermentaciones vínicas. No obstante, la fermentación alcohólica se trata de un proceso complejo y todavía dista bastante de estar completamente entendido.

Lo que parece claro es que las fermentaciones alcohólicas realizadas espontáneamente no son debidas a la acción de una única especie ni de una única cepa de levadura, sino que es el resultado de la acción combinada de diversas especies de levaduras que crecen más o menos siguiendo una sucesión a lo largo de la fermentación (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; Lafon-Lafourcade, 1983). De todas maneras, dentro de las levaduras que se pueden encontrar en una fermentación alcohólica (levaduras procedentes de la propia uva o del material típico de bodega), se ha visto que *Saccharomyces cerevisiae* es la más idónea para consumir todos los azúcares fermentables y por tanto, asegurar el proceso.

La transformación de los azúcares en etanol es el proceso básico en la producción de vino pero también existen otras reacciones secundarias que pueden llegar a ser muy importantes. Su importancia se debe sobretodo a sus aportaciones cualitativas al vino, ya que pueden contribuir favoreciendo (producción de glicerol, ésteres, alcoholes superiores, etc.) o perjudicando (producción de ácido acético, sulfhídrico o acetato de etilo) el producto final.

El estudio a lo largo de los años de la dinámica, cuantificación y composición de la microbiota responsable de las fermentaciones espontáneas ha mostrado diferencias tanto cualitativas como cuantitativas, en las levaduras aisladas en una misma zona vitivinícola e incluso dentro de los depósitos de una misma bodega. Las causas de esta variabilidad pueden ser: cambios en las técnicas de vinificación, diferencias en las vendimias, cambios en las condiciones climáticas, etc. (Suárez-Lepe, 1997). Por tanto, la necesidad de asegurar la fermentación alcohólica, así como la tipicidad y reproducibilidad de los vinos, requiere cada vez más el uso de cultivos iniciadores.

Las levaduras seleccionadas se han utilizado con excelentes resultados en muchos países, obteniéndose productos finales de calidad más uniforme que los que se producían con las fermentaciones espontáneas (Fleet y Heard, 1993). Este último punto es que el todavía hoy genera el debate acerca de la utilización o no de inóculos, ya que garantizan repetitividad a expensas de perder algo de complejidad en el vino final.

De hecho ya Pasteur decía que “las cualidades del vino dependen en gran parte de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de los mostos. Podemos pensar que si se sometiera a un mismo mosto a la acción de levaduras distintas, se lograrían vinos de distinta naturaleza”.

A pesar de que existen levaduras comerciales para realizar las fermentaciones, es más efectivo el uso de cultivos puros de levaduras que procedan de la zona vitivinícola donde se van a utilizar, lo que se conoce como *levaduras locales seleccionadas*, ya que se cree que las levaduras que se encuentran en una microzona son (Martini y Martini, 1990)

- específicas del área,
- totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona,
- totalmente adaptadas a la materia prima, es decir al mosto a fermentar,
- responsables, al menos parcialmente, de las características únicas de los vinos obtenidos.

Las características propias de una zona (mostos con alto o bajo contenido en azúcares, grado alcohólico, tipo de vinos elaborados, temperatura de fermentación, etc.) pueden ser, por tanto, un aspecto interesante a la hora de seleccionar una levadura aunque hay muchos otros que también se tienen que tener en cuenta. La importancia de estos parámetros puede ser relativa dependiendo del producto para el cual quieren ser utilizados, por ejemplo, si se quiere seleccionar una levadura apta para una vinificación en tinto (que se realizan prácticamente sin control de temperatura), no tendría demasiado valor añadido el seleccionar una levadura que pudiera fermentar sin problemas a bajas temperaturas. Pero en cambio, esta levadura sería de gran utilidad en vinificaciones en blanco. Algunos de los criterios utilizados para seleccionar levaduras se presentan en la Tabla 1.

Por tanto, la selección de la cepa adecuada para cada tipo de fermentación es una estrategia muy importante para garantizar por un lado una fermentación correcta, así como para mejorar las características del vino final, ya que aunque es evidente que la calidad del vino va estar claramente unida a la de la variedad y calidad de la uva, las levaduras pueden producir compuestos que den un toque de distinción al producto obtenido.

Tabla 1. Algunas de las características deseables y no deseables en la selección de levaduras para la producción de vinos de calidad (Degré, 1993).

Características deseables	Características no deseables
<ul style="list-style-type: none"> • Alta tolerancia al etanol • Total degradación de los azúcares fermentables • Resistencia al SO₂ • Capacidad fermentativa a bajas temperaturas • Máxima reducción de la fase de latencia • Degradación del ácido málico • Capacidad fermentativa a altas presiones • Producción de glicerol • Producción de β-glucosidasa • Fenotipo killer 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de SO₂ • Producción de H₂S • Producción de acidez volátil • Producción de acetaldehído y piruvato • Producción de espuma • Formación de precursores del carbamato de etilo • Producción de polifenol oxidasas

1. Estudio de la ecología de levaduras de la zona

Para seleccionar una levadura propia de una zona, el primer paso es conocer la flora autóctona de esta zona. Diversos estudios ecológicos se han realizado en los últimos años en diferentes regiones vitivinícolas (Querol *et al.*, 1992a, 1994; Schütz y Gafner, 1993, 1994; Versavaud *et al.*, 1995; Sabaté *et al.*, 1998; Beltran *et al.*, 2002). En éstos, se confirma que muchas cepas de *Saccharomyces* llevan a cabo las fermentaciones alcohólicas espontáneas, aunque muy pocas son predominantes al final de fermentación.

Para realizar un estudio ecológico, se debe hacer un seguimiento de fermentaciones espontáneas que se realicen en la zona a estudiar. Evidentemente es muy importante que se trate de fermentaciones espontáneas, pero no sólo eso, sino que se elijan para este estudio, si es posible, bodegas donde nunca se haya inoculado, porque así se garantiza que las cepas que se aislarán serán cepas autóctonas de estas zonas. De hecho se ha visto que en bodegas donde se inoculan algunos depósitos, en aquéllos donde se llevan a cabo las fermentaciones espontáneas, normalmente se terminan imponiendo también los inóculos comerciales, reduciéndose así, la diversidad de la flora propia de la bodega (Constantí *et al.*, 1997; Beltran *et al.*, 2002)

Es recomendable que este seguimiento se haga más de una campaña, porque así, además de tener un número más amplio de cepas, también se podrá tener una idea más exacta de la importancia que tiene cada una de las cepas dentro de estas fermentaciones alcohólicas, es decir, el aislamiento de una misma cepa durante campañas consecutivas puede ser un buen indicador de que se trata de una cepa bien adaptada a las condiciones de la zona.

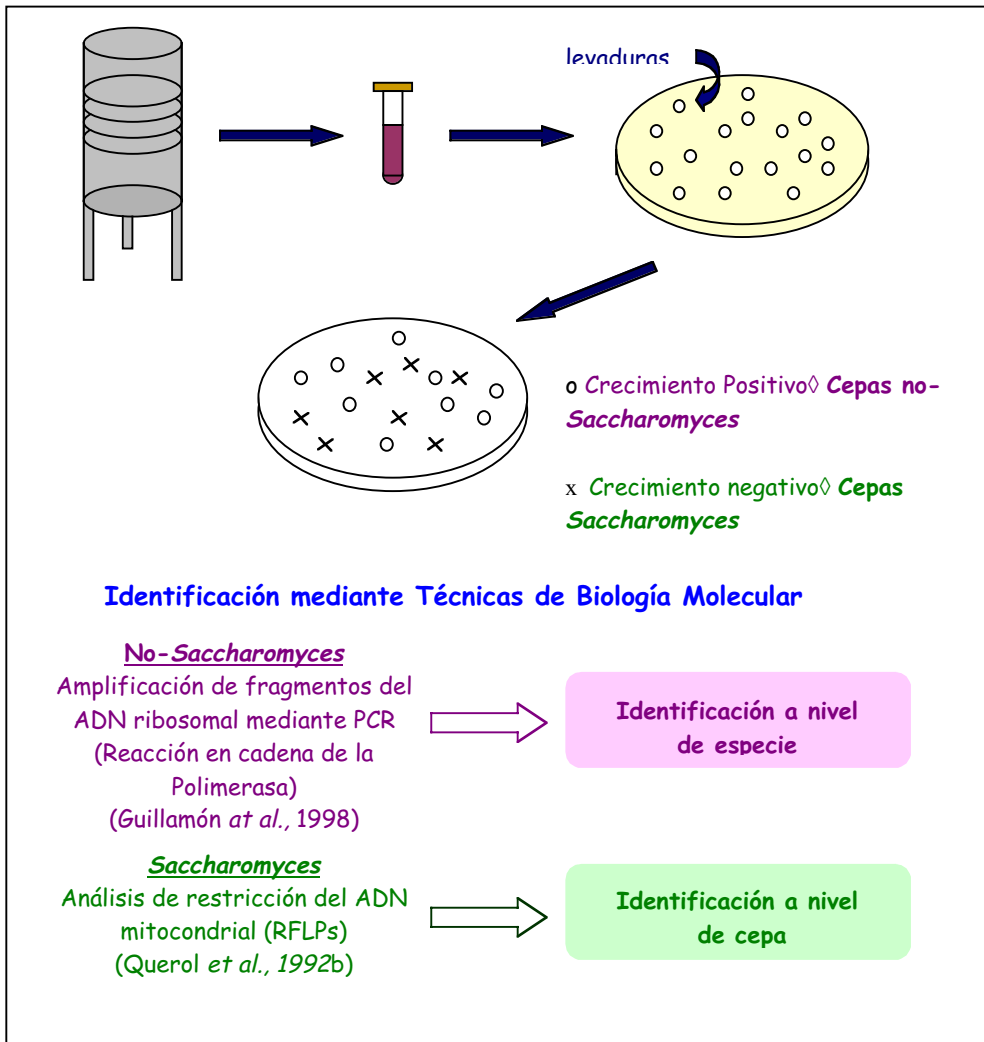


Figura 1. Esquema del aislamiento e identificación de las cepas de levaduras que llevan a cabo la fermentación alcohólica

Una vez se tiene una colección de cepas aisladas de la zona, el siguiente paso es **la identificación de estas cepas**. Como se ha explicado anteriormente, aunque la especie principal y responsable de la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae*, en las fermentaciones espontáneas, también se encuentran otras especies, sobretudo en las primeras fases del proceso (cepas de *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, etc.). Por tanto, la primera diferenciación que debe realizarse es a nivel de especie, mediante medios selectivos, concretamente el medio lisina (Figura 1). Se utiliza este medio porque las cepas de *Saccharomyces* no pueden crecer en un medio donde la lisina sea la única fuente de nitrógeno. La mayoría de las cepas de no-*Saccharomyces*, en cambio, crecen sin problema.

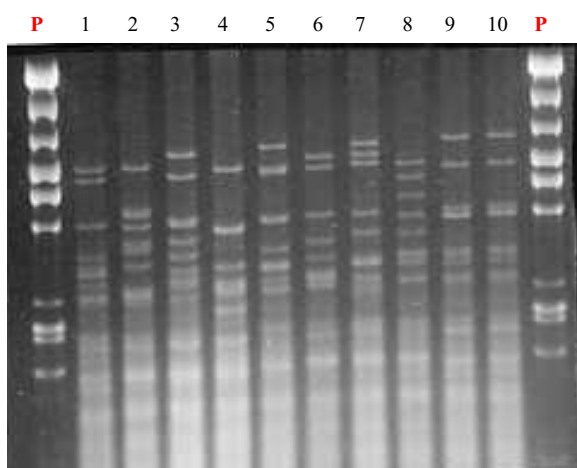


Figura 2. Fermentación alcohólica espontánea. Estudio mediante RFLPs del ADN mitocondrial de 10 cepas de *Saccharomyces*. Todas las cepas presentan perfiles diferentes, es decir son cepas diferentes, excepto las de los carriles 9 y 10, que son idénticas. Los carriles P, son patrones de bandas conocidas a partir de los cuales se calcula el tamaño de las bandas.

Una vez distinguidas las colonias que son *Saccharomyces* de las que no lo son, el siguiente paso, es identificarlas a nivel de cepa. Se entiende por cepa todos aquellos individuos provenientes de un mismo origen, y que por tanto, mantienen unas características uniformes a nivel genético con su antecesor. Para la identificación de cepas de *Saccharomyces* se utilizan técnicas de Biología Molecular, concretamente, el análisis de los perfiles de restricción del ADN mitocondrial (RFLPs)

(Querol *et al.*, 1992b), donde cepas diferentes tienen perfiles diferentes (Figura 2). Para hacer estos análisis, se eligen 40-50 colonias al azar de cada punto a estudiar.

Tabla 2. Resumen del estudio ecológico realizado en variedades blancas y tintas durante tres campañas consecutivas en las D.O.s Terra Alta y Priorat.

	D.O. Terra Alta			D.O. Priorat		
	1996	1997	1998	1996	1997	1998
Cepas nuevas	28	12	28	35	23	8 ^(*)
Total	68 cepas diferentes			66 cepas diferentes		
	Perfiles idénticos aparecidos en las 2 D.O.s: 22					
	68 cepa Terra Alta + 66 cepas Priorat - 22 perfiles idénticos					
	= 112 perfiles diferentes, por tanto, cepas de <i>Saccharomyces</i> diferentes					

^(*) Sólo se estudiaron variedades blancas

En este punto se tendrán aisladas e identificadas probablemente un número elevado de cepas autóctonas de la zona. De hecho, en un estudio de este tipo realizado en nuestro laboratorio en las Denominaciones de Origen Terra Alta y Priorat durante 3 campañas consecutivas (Torija *et al.*, 2001, ver Capítulo 2) se aislaron 68 y 66 cepas diferentes, respectivamente (Tabla 2). De todas maneras, había cepas que aparecían en ambas Denominaciones de Origen, lo cual puede ser justificado por el hecho de que estas dos regiones se encuentran próximas geográficamente, y por tanto, este intercambio de cepas puede ser debido a procesos de dispersión biológica (pájaros, insectos) o cultural (intercambios de personas y prácticas agrícolas o industriales, por ejemplo).

2. Proceso de selección

El elevado número de cepas diferentes identificadas, hace de la selección, un trabajo largo y costoso sobretodo en tiempo, por lo que una buena estrategia se hace imprescindible. Los criterios utilizados hasta ahora para la selección de cepas consistían en una sucesión de pruebas para determinar la ausencia o presencia de determinados caracteres que se consideraban importantes en cepas vínicas. Estas pruebas se realizaban inicialmente con todas las cepas, para según se iban aplicando los diferentes criterios, ir descartando cepas. Algunos de los criterios más utilizados están citados en la Tabla 1, siendo el orden más común de aplicación: factor killer, tiempo de

fermentación, capacidad fermentativa en mostos con elevadas concentraciones de azúcares, formación de H₂S, formación de espuma, etc. (Cabranes y Mangas, 1997; Gutiérrez *et al.*, 1997; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000). De todas maneras, el factor killer, se trata de un criterio por lo menos cuestionable, ya que al pH del vino (entre 3-3,5), estas toxinas se suelen encontrar inactivas. De hecho, cepas sensibles al fenotipo killer pueden imponerse en fermentaciones alcohólicas, lo que confirma que no se trata de un requisito imprescindible para seleccionar una cepa.

El ir probando cada una de las cepas en fermentaciones individuales y caracterizar todos los productos finales obtenidos, parece arduo cuando se habla de tal número de cepas, por tanto, una posible solución (pueden existir otras) es la selección de cepas en *fermentaciones masivas por competencia*.

¿En qué consisten?

Se elige un número definido de cepas de *Saccharomyces*, se inoculan en un mismo fermentador y se hace un seguimiento de cómo evolucionan estas cepas a lo largo de la fermentación. La población inicial de todas las cepas es la misma, para que todas tengan las mismas posibilidades de imposición.

El número de cepas a analizar dependerá de las cepas aisladas, pero no sería aconsejable utilizar un número superior a 20 cepas.

¿Cómo elegir las cepas?

Si se tiene un número superior a 20, es recomendable descartar algunas cepas. Un criterio a seguir, puede ser, el tomar como referencia las fermentaciones espontáneas y elegir aquellas cepas que hayan tenido una presencia relevante a lo largo de éstas. De hecho, se pueden dar casos de cepas, las cuales sólo se hayan aislado en porcentajes muy bajos en un momento determinado de la fermentación y en un solo año y que por tanto, no puedan considerarse levaduras representativas de la zona, ya que probablemente se trate de cepas que son poco resistentes al etanol y a las condiciones existentes, y que por tanto, no se impondrían en una fermentación competitiva.

¿Qué medio de fermentación se utilizará?

Las fermentaciones se hacen a escala de laboratorio, es decir, en pequeños fermentadores.

Es importante intentar simular las condiciones de fermentación que posteriormente se utilizarán en bodega. Para ello, lo ideal es utilizar mosto concentrado diluido, ya que tiene todos los nutrientes necesarios para una correcta fermentación. Además, al utilizar este mosto concentrado se puede regular la concentración de azúcares, lo cual ya supone una característica

adicional de selección al poderse fijar unas condiciones más o menos restrictivas de fermentación (altos contenidos en azúcar, por ejemplo, condicionarán altos grados alcohólicos). Aparte de la propia competencia entre cepas, se puede aplicar algún otro criterio de selección que pueda resultar interesante, y así acelerar el proceso de la selección.

Este criterio dependerá del tipo de fermentación al que se dirija la selección (algunos de los más importantes se exponen en la Tabla 1).

La temperatura de fermentación.

La temperatura de fermentación puede ser uno de estos criterios ya que se trata de una variable muy importante en vinificación. De hecho, dependiendo del tipo de vinificación que se quiera realizar, se utilizará una temperatura u otra y por tanto, puede ser de gran interés tener cepas que fermenten bien a las temperaturas elegidas. Así, las vinificaciones en blanco se llevan a cabo a una temperatura baja favoreciendo así, la retención de aromas, característica distintiva de un buen vino blanco. Las fermentaciones de vinos tintos, en cambio, se realizan a temperatura ambiente, pero sin dejar que la temperatura supere los 30°C, favoreciendo la extracción de los compuestos fenólicos, responsables del color de los vinos.

Para el análisis de la capacidad fermentativa de las cepas a diferentes temperaturas, se puede por ejemplo, probar 5 temperaturas diferentes a las que llevar a cabo las fermentaciones: 15, 20, 25, 30 y 35°C (Figura 3). De esta manera se cubre el rango habitual de temperaturas de todo tipo de vinificaciones.

En estas fermentaciones, se hace el seguimiento de las cepas mediante técnicas de Biología Molecular (ADN mitocondrial) al igual que se había hecho en las fermentaciones espontáneas. Así, se puede ver como se comporta cada cepa en las diferentes condiciones y si hay alguna/s que se impongan sobre el resto.

El estudio de este tipo de fermentaciones puede suponer la reducción del número de cepas con las que continuar el estudio a un rango de 2 a 8 cepas. Éste, ya se trata de un número mucho más asequible para poderlas caracterizar individualmente.

A modo de ejemplo, en nuestro estudio con cepas de la D.O. Priorat (Torija *et al.*, 2002, ver Capítulo 3)

- Se seleccionaron 3 cepas para fermentaciones a temperaturas elevadas. Una de ellas, fue la única resistente a las temperaturas más extremas (35°C).

- Para bajas temperaturas, por su parte, hubo 6 cepas que presentaron porcentajes similares de imposición y por tanto, se continuó el estudio con todas ellas.

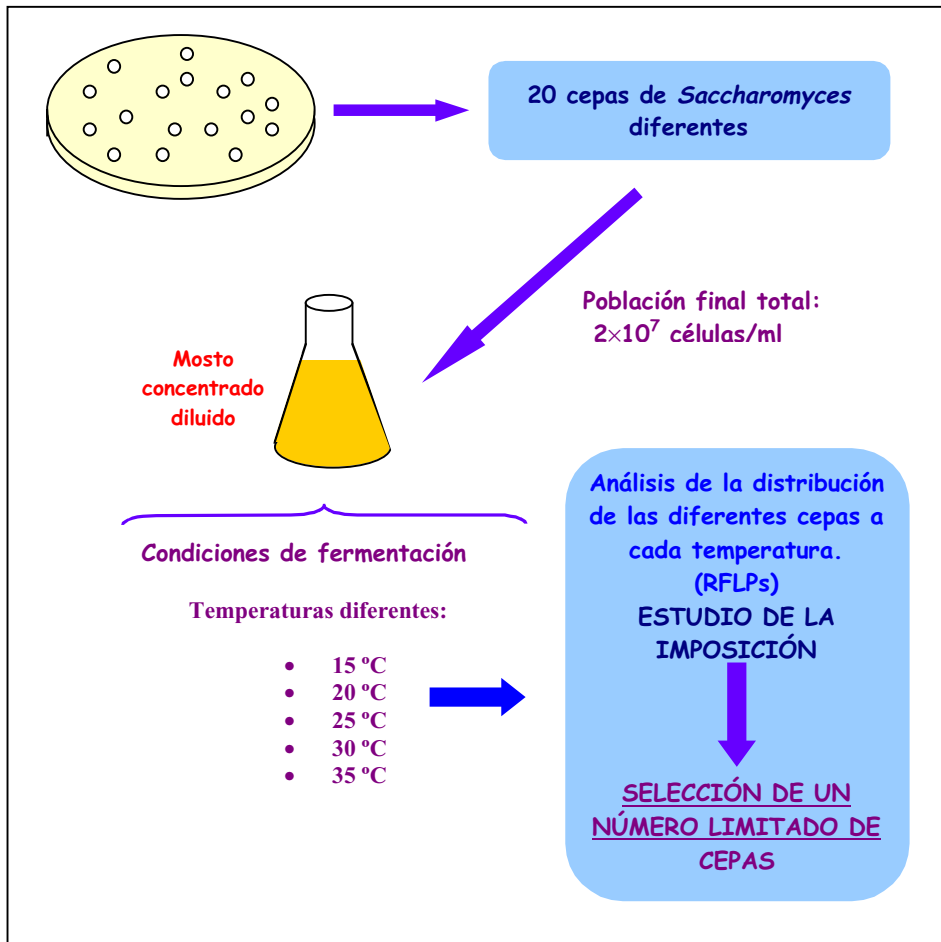


Figura 3. Estrategia de selección

3. Fermentaciones individuales en el laboratorio

Una vez el número de cepas está claramente delimitado, estas cepas se deben probar de forma individual en una fermentación. El primer paso es hacerlo, al igual que en la fermentación masiva, a pequeña escala, es decir, en el laboratorio.

Cada una de las cepas seleccionadas, se inocula de forma individual en un fermentador con mosto concentrado diluido y se sigue la fermentación.

Aunque parezca de poca importancia, se trata de un paso básico, ya que el hecho de que una cepa se haya impuesto en una fermentación masiva, no garantiza que pueda realizar una fermentación completa por ella sola. Además, se tiene que analizar las características organolépticas del vino obtenido con cada cepa, cosa que hasta ahora no se había podido hacer, porque al ser un conjunto de cepas no se podía saber qué cepa era la que proporcionaba las diferentes características, ya fueran favorables o desfavorables.

Después de haber hecho las pruebas en el laboratorio y por tanto, haber comprobado qué cepas presentan:

- Buena capacidad fermentativa (estudio de la velocidad y duración la de fermentación)
- Resistencia a altas concentraciones de azúcares (debido a las características particulares de la zona de selección)
- Resistencia a altas concentraciones de etanol
- Producción de glicerol, ésteres, alcoholes superiores
- Baja acidez volátil
- Resistencia a SO₂

Se realiza una cata, y se eligen las cepas que además de fermentar correctamente, tengan un mejor perfil cromático, aromático y gustativo.

Las cepas que hayan superado todas las fases de selección se probarán a nivel industrial en una bodega.

4. Fermentaciones industriales

Estas cepas se inoculan de forma independiente en un depósito a escala industrial, tal y como se haría con una cepa comercial (ver Capítulo 5). Se hace el seguimiento de la fermentación, controlando la imposición de nuestra cepa sobre la flora autóctona de la zona mediante las técnicas antes mencionadas (Figura 4). En el caso de imposición, se realiza una analítica completa de los vinos obtenidos, tal y como se ha explicado en las fermentaciones en laboratorio, con la posterior cata realizada por especialistas.

Las cepas que cumplan todos estos requisitos serán aptas para ser seleccionadas. Si se tienen varias, en la elección de una u otra se deberá valorar, principalmente, las características organolépticas, es decir, aquella que proporciona un vino de mayor calidad.

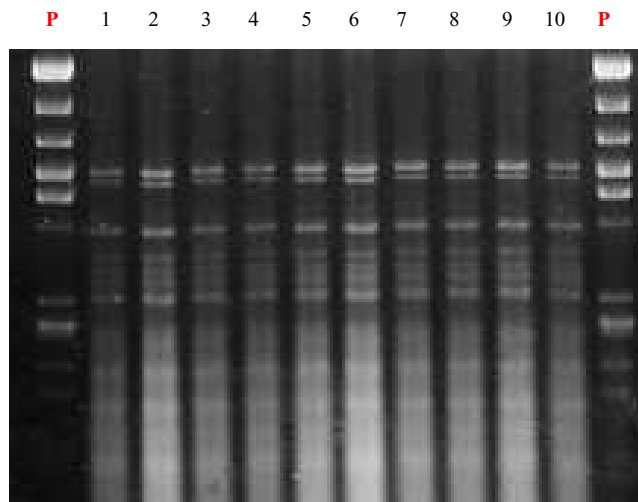


Figura 4. Fermentación alcohólica inoculada. Estudio mediante RFLPs del ADN mitocondrial de 10 cepas de *Saccharomyces*. Todas las cepas presentan el mismo perfil, igual al inoculado, confirmando la imposición total de la cepa inoculada. Los carriles P, son patrones de bandas conocidas a partir de los cuales se calcula el tamaño de las bandas.

Si las cepas seleccionadas tienen un interés comercial, queda un último paso que es su deshidratación. No todas las cepas resisten bien ni mantienen sus características tras el secado y la posterior rehidratación y por tanto, aunque se trate de una cepa de características extraordinarias, sino se puede deshidratar, no será una buena levadura para su uso industrial.

La producción de levaduras secas activas (LSA) es un proceso muy importante, ya que se producen en condiciones de aerobiosis (es decir, en presencia de oxígeno), para conseguir una elevada biomasa, y una reserva de ácidos grasos insaturados y esteroides muy necesarios durante el proceso fermentativo (en semianaerobiosis) donde la síntesis de estos compuestos está inhibida. Este proceso hace que las levaduras estén metabólicamente activas cuando se rehidratan y por tanto, su imposición sea más rápida. Por este motivo, no es necesario hacer un pie de cuba antes de

inocular estas LSA. De hecho, el hacer demasiadas réplicas al preparar el pie de cuba antes de inocular, puede restarle efectividad a las LSA.

Una vez que la levadura ha superado todas estas fases, aún se hace necesario el análisis de su estabilidad genética. Es conocida una cierta inestabilidad de las cepas de levaduras, que hace que después de muchas generaciones (que es el caso de la producción industrial de LSA), el porcentaje de mutaciones sea elevado, por lo que dicho análisis es un requisito imprescindible.

Una vez superadas las diferentes fases del proceso de selección y de la producción industrial (incluido el secado), queda la última fase y definitiva: su uso industrial en bodega y su aceptación final, que es la auténtica prueba de fuego de todo el proceso.

Como conclusión, las cepas seleccionadas de una zona pueden ser una buena solución para mantener las características típicas de los vinos de una región vitivinícola y así minimizar la pérdida de tipicidad de los vinos inoculados, hecho muy criticado por los detractores de la inoculación; pero que, por otra parte, pueden garantizar una uniformidad del producto a lo largo de los años.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación de los proyectos FEDER 2FD97-1854 y AGL2000-0205-P4-03 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M.T., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N. y Mas, A.** (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentations: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* (aceptado).
- Cabranes, C. y Mangas, J.J.** (1997) Selection and biochemical characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains isolated from spanish cider. *J. Inst. Brew.* 103, 165-169.
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. y Guillamón, J.M.** (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339-344.
- Degré, R.** (1993) Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. En: *Wine Microbiology and Biotechnology.* (Ed. G.H. Fleet) pp. 421-447. Harwood Academic Publishers.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F. y Querol, A.** (2000) Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedès' area (Spain). *Food Microbiol.* 17, 553-562.
- Fleet, G.H. y Heard, G.M.** (1993) Yeast growth during fermentation En: *Wine Microbiology and Biotechnology.* (Ed. G.H. Fleet) pp. 1034-1038. Harwood Academic Publishers.
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. y Querol, A.** (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
- Gutiérrez, A.R., López, R. y Santamaría, P.** (1997) «VRB»: Levadura autóctona de la C.O.Ca Rioja. Proceso de selección y evaluación en bodega. *Vitic./Enol. Profesional* 51, 36-43.
- Lafon-Lafourcade, S.** (1983) Wine and brandy. En: *Biotechnology, vol. 5: Food and Feed Production with Microorganisms.* (Eds. H.J. Rehm y G. Reed) pp. 81-163. Verlag Chemie: Weinheim.
- Martini, A. y Martini, A.V.** (1990) Grape must fermentation past and present. En: *Yeast Technology.* (Eds. J.F.T. Spencer y D.M. Spencer) pp. 105-123. Springer Verlag: Berlin.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D.** (1992a) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2952.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D.** (1992b) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D.** (1994) Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 315-323.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. y Sudraud, P.** (1975) *Traité d'Oenologie. Sciences et Techniques du vin, vol. 2.* Dunod ed., Paris.
- Sabaté, J., Cano, J., Querol, A. y Guillamón, J.M.** (1998) Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 452-455.
- Schütz, M. y Gafner, J.** (1993) Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 551-558.

Schütz, M. y Gafner, J. (1994) Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 253-257.

Suárez-Lepe, J.A. (1997) Identificación de levaduras. Seguimiento y control de implantación de las cepas seleccionadas. En: *Levaduras vinicas*, cap.X. pp. 243-269. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. y Mas, A. (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 345-352.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. y Mas, A. (2002) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* (aceptado).

Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L. y Hallet, J.N. (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3521-3529.

CAPÍTULO 2:

**YEAST POPULATION DYNAMICS IN SPONTANEOUS
FERMENTATIONS: COMPARISON BETWEEN TWO
DIFFERENT WINE-PRODUCING AREAS OVER A PERIOD
OF THREE YEARS**

M.J. Torija, N. Rozès, M. Poblet, J.M. Guillamón y A. Mas

Antonie van Leeuwenhoek 79, 345-352 (2001)

ABSTRACT

Yeast ecology, biogeography and biodiversity are important and interesting topics of research. The population dynamics of yeasts in several cellars of two Spanish wine-producing regions was analysed for three consecutive years (1996 to 1998). No yeast starter cultures had been used in these wineries and therefore provided an ideal winemaking environment to investigate the dynamics of grape-related indigenous yeast populations. Non-*Saccharomyces* yeast species were identified by RFLPs of their rDNA, while *Saccharomyces* species and strains were identified by RFLPs of their mtDNA.

This study confirmed the findings of other reports that non-*Saccharomyces* species were limited to the early stages of fermentation whilst *Saccharomyces* dominated towards the end of the alcoholic fermentation. However, significant differences were found with previous studies, such as the survival of non-*Saccharomyces* species in stages with high alcohol content and a large variability of *Saccharomyces* strains (a total of 112, all of them identified as *Saccharomyces cerevisiae*) with no clear predominance of any strain during all the fermentation, probably related to the absence of killer phenotype and lack of previous inoculation with commercial strains.

INTRODUCTION

The use of active dry yeasts in fermentation is becoming one of the most common practices in winemaking. This practice ensures a reproducible product and reduces the risk of wine spoilage. However, there is some controversy about the use of commercial wine yeasts which may reduce the production of some desired metabolic components such as higher alcohols and other metabolic by-products (Sponholz and Dittrich, 1974; Mateo *et al.*, 1991). Although inoculation is recommended in modern, industrial winemaking, there is still some concern about missing some desirable characters of natural or spontaneous fermentations (Fleet and Heard, 1993). Knowledge of the evolution of the microbiota during alcoholic fermentation will help to control fermentation and wine quality.

Natural fermentation is carried out by the yeasts present on grapes and winery equipment. Some of the most common wild yeasts on grapes are *Hanseniaspora uvarum* (and its anamorphic form *Kloeckera apiculata*), and those of the genera *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces* and *Hansenula* (Fleet and Heard, 1993). However, the number of species and their presence during fermentation depends on the production area (Amerine and Kunkee, 1968), the practical

winemaking process (Cuinier, 1978) and the type of wine produced (Poulard, 1984). *Saccharomyces cerevisiae*, the principal agent in alcoholic fermentation, is absent or rarely present on grapes but is associated with the winery environment as it is incorporated into the must during fermentation (Longo *et al.*, 1991; Frezier and Dubourdieu, 1992; Vaughan-Martini and Martini, 1995; Constantí *et al.*, 1997). The non-*Saccharomyces* yeasts grow well during the early stages of fermentation, when the ethanol concentration is still low, being later replaced by *Saccharomyces*, which are more tolerant to ethanol and more competitive for growth in media with high sugar concentration (Amerine *et al.*, 1982; Lafon-Lafourcade, 1983; Querol *et al.*, 1990). However, the non-*Saccharomyces* yeasts definitively contribute to the fermentation since they reach populations of up to 10^6 - 10^7 cells ml⁻¹ (Fleet *et al.*, 1984; Heard and Fleet, 1986). These high populations are believed to influence the wine composition as well as the development of *Saccharomyces*, because the chemical changes in wine produced by non-*Saccharomyces* affect both the kinetics of growth and metabolism of *Saccharomyces* (Lema *et al.*, 1996).

Earlier studies examined how the native populations of *Saccharomyces* strains evolved during spontaneous wine fermentation (Querol *et al.*, 1992a, 1994; Schütz and Gafner, 1993, 1994; Sabaté *et al.*, 1998). Many different strains had been observed, but few were predominant in the later stages of the process. Some had been isolated over several years in the same cellar (Frezier and Dubourdieu, 1992; Sabaté *et al.*, 1998) or were widespread in different cellars of the same wine-producing region (Versavaud *et al.*, 1995). Such strains, which were highly homologous according to their molecular patterns (mtDNA), could be considered representative of an enological area (Guillamón *et al.*, 1996).

The aim of the present work was to analyse the presence and evolution of yeasts in several cellars of two wine-producing regions for three consecutive years to study the population diversity, phylogenetic affinities, and biogeographic and wine type distributions. These areas shared similarities in climate and practice of traditional winemaking, despite being geographically separated. Both wine-producing regions, Priorat and Terra Alta (Catalonia, Spain) were characterized by high temperatures in summer and low levels of rainfall, which yielded wines with a high alcohol content (13-16%, v/v). Taxonomic identity was established at species level for non-*Saccharomyces* yeasts by RFLPs of rDNA (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999) and at strain and species level for *Saccharomyces* by RFLPs of mtDNA (Querol *et al.*, 1992b; Guillamón *et al.*, 1994).

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Sampling was carried out in two wineries in each area between 1996 and 1998. The grape varieties were Macabeo for white fermentations and Grenache for red ones. Musts in these cellars had never been inoculated with active dry yeasts. The initial sugar and SO₂ concentrations were about 220-240 g l⁻¹ and 50-300 mg l⁻¹, respectively. Sampling was done in both white and red fermentations at different stages: Must, Beginning (BF, density, g l⁻¹: 1,075-1,100), Middle (MF, density, g l⁻¹: 1,020-1,040) and Final Fermentation (FF, density g l⁻¹: 993-1,000). Temperature was uncontrolled and there was no settling. Final ethanol content was 13.5-14.5 % (v/v).

After plating the samples on YPD agar at an adequate sample dilution, 20 colonies were randomly taken and isolated from each plate. To distinguish between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts, two selective media were used: lysine and cycloheximide (Angelo and Siebert, 1987). *Saccharomyces* species were unable to grow on these media.

Mitochondrial DNA restriction analysis

DNA extraction and determination of mitochondrial DNA restriction patterns of the strains were carried out as previously described by Querol *et al.* (1992b) with the restriction endonuclease *HinfI* (Boehringer Mannheim, Germany). Restriction fragments were separated on a horizontal 0.8% agarose (Ecogen, Barcelona, Spain) gel in TBE buffer (Tris 89 mM; boric acid 89mM; EDTA 2 mM; pH 8). The same protocol but with the restriction endonuclease *AluI* (Boehringer) was used to differentiate species of *Saccharomyces* (Guillamón *et al.*, 1994).

PCR amplification and restriction of rDNA

The amplification and restriction of rDNA was carried out as previously described by Guillamón *et al.* (1998). The primers used to amplify the ITS region were ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') described by White *et al.* (1990) and synthesized by ARK Scientific GmbH Biosystems (Darmstad, Germany). Amplified DNAs were digested with 3 restriction endonucleases: *HinfI*, *CfoI* and *HaeIII* (Boehringer). Restriction fragments were separated on a horizontal 2% multipurpose agarose (Boehringer) gel in TBE buffer and compared against standards (100-bp DNA ladder; Gibco-BRL).

Killer Factor determination

The killer factor was determined by the method described by Jacobs *et al.* (1988). As controls, strains of the Spanish Type Culture Collection were used: CECT 1415 as sensitive and CECT 1182 as killer phenotype.

Estimates of similarities between electrophoretic profiles

Similarities between the profiles were determined by the fraction of shared bands (Dice coefficient). Clustering was calculated by the unweighted pair group method using arithmetic average linkage (UPGMA method) included in the NTSYS package (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Exeter Publ. Ltd.).

RESULTS

Non-*Saccharomyces* species

Effects of wine region

As expected, the non-*Saccharomyces* yeasts were predominant in the must and during the initial stages of some fermentations while *Saccharomyces* was isolated throughout the fermentation but especially at the mid and final stages (Figure 1). It has to be stressed that only 20 randomly selected colonies were analysed at each point, so the results should be taken with the appropriate restraint of the random selection.

In Priorat (Figure 1A), *Candida stellata* was the main species of non-*Saccharomyces* in must, especially in 1996 and 1998, when it was the only one detected. In 1996 when the alcoholic fermentation began, there was still a high percentage of this yeast, it accounted for 50% of the total number of yeast isolated. In 1997, minor non-*Saccharomyces* species (1-5%) were found in must and BF stages, such as *Candida colliculosa*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Metschnikowia pulcherrima*. Interestingly, although a large percentage of *Saccharomyces* was isolated in this must, *C. stellata* was still present at the later stages of fermentation.

At Terra Alta (Figure 1B), *C. stellata* was the majoritary species in must in the first two years (75% in 1996 and 60% in 1997) with the presence of *H. uvarum* as a secondary species in 1997 (30%), while in 1998 the main non-*Saccharomyces* species was *H. uvarum* (72.5%). At the beginning of the alcoholic fermentation, the presence of *C. stellata* was still detected, although in 1998 non-*Saccharomyces* species were greatly reduced in number. Other minor species, such as *C.*

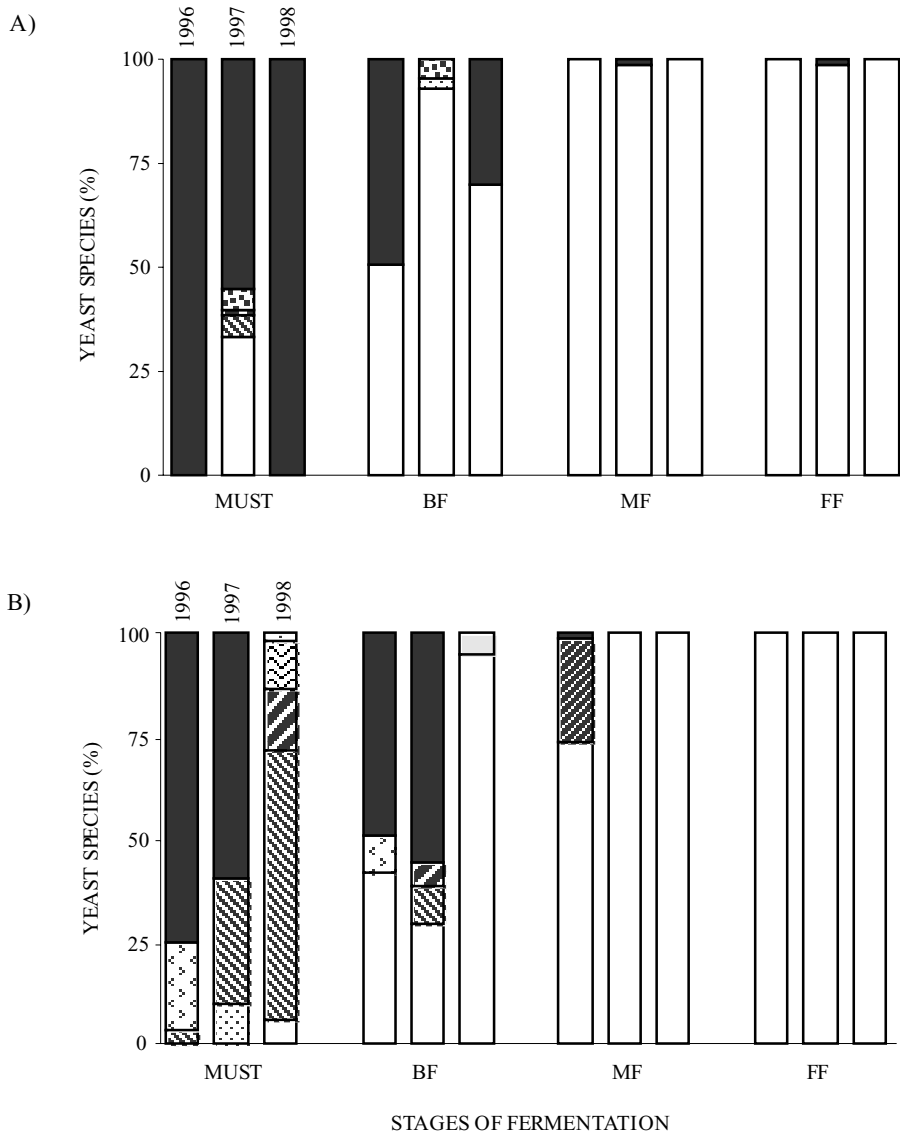


Figure 1. Biodiversity of yeast species during alcoholic fermentation. BF: Beginning of fermentation, MF: Mid fermentation, FF: Final of fermentation. A) Priorat B) Terra Alta.

Saccharomyces,
 Candida stellata,
 Hanseniaspora uvarum,
 Candida colliculosa,
 Metschnikowia pulcherrima,
 Schizosaccharomyces spp.,
 Zygosaccharomyces bailii,
 Kluyveromyces thermotolerans,
 non-identified

colliculosa, *Kluyveromyces thermotolerans* and *M. pulcherrima* strains, were isolated in must and at BF stages. A notable percentage of *Schizosaccharomyces* spp. was found during the 1996 fermentation (MF stages). It was not possible to identify another minor species on the basis of its rDNA restriction patterns (1996).

The size of the populations at the beginning of fermentation in both wine regions was about 10^6 cfu ml⁻¹, reaching 10^7 cfu ml⁻¹ in the middle of the fermentation with an exception (Terra Alta, 1997) which reached populations of 10^8 cfu ml⁻¹. Viable cells decreased to 10^6 cfu ml⁻¹ at the later stages of the process (FF).

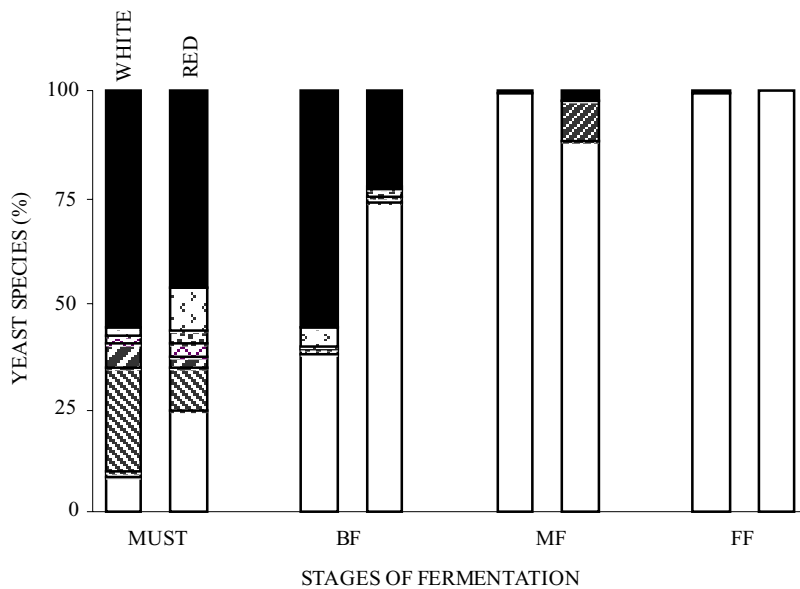


Figure 2. Biodiversity of yeast species during alcoholic fermentation analysed as a function of the vinification type. BF: Beginning of fermentation, MF: Mid fermentation, FF: Final of fermentation.

□ *Saccharomyces*, ■ *Candida stellata*, ▨ *Hanseniaspora uvarum*, ▩ *Candida colliculosa*, ▧ *Metschnikowia pulcherrima*, ▤ *Schizosaccharomyces* spp., ▥ *Zygosaccharomyces bailii*, ▦ *Kluyveromyces thermotolerans*, □ (non identified).

Effects of the type of vinification

Non-*Saccharomyces* species were more prevalent at the beginning of white fermentations than in the red ones (Figure 2); *C. stellata* was the predominant species in both type of wines.

However, non-*Saccharomyces* in MF were only detected in red fermentations (*Schizosaccharomyces*, 9.6% and *C. stellata*, 2.7%) whereas they had practically disappeared in the white ones (*C. stellata*, 0.6%). The population sizes of red and white fermentations were very similar (data not shown), with a maximum of about 5×10^7 cfu ml⁻¹ in MF.

***Saccharomyces* strains**

Strain variability

The 886 colonies of *Saccharomyces* isolated represented 112 different mtDNA patterns, i.e. 112 different *Saccharomyces* strains. All of these strains were identified as *S. cerevisiae* on the basis of mtDNA restriction patterns. The degree of variability, measured as the percentage of different strains found amongst the colonies analysed, was extremely high. This high diversity was similar for the different years in both wine regions (Table 1), ranging from 14.6% (Priorat, 1997) to 27.7% (Terra Alta, 1998).

Table 1. Overall analysis of variability of *Saccharomyces cerevisiae* strain.

		Total no. colonies studied	Total no. different strains	Variability (%)	RSY^a	Total no. of new strains^b	RS^c in both regions
TERRA ALTA	1996	121	28	22.3	0	68	8
	1997	115	26	22.6	14		3
	1998	130	36	27.7	8		11
PRIORAT	1996	161	35	21.7	0	66	8
	1997	274	40	14.6	17		3
	1998	85 ^d	19	22.3	11		11

^a RSY: Number of strains identified in previous years.

^b Number of new strains found in each wine region during the 3 years of the study.

^c RS: Repeated strains.

^d White fermentations only.

The number of strains found during fermentation in each area in one year was around 30, except for Priorat in 1998 when only white fermentations were studied (Table 1). A percentage of these strains were detected in previous years (from 20 to 55.5%). The total number of different mtDNA restriction patterns found at Terra Alta and Priorat over the three years was 68 and 66 respectively. Common strains were detected between the cellars of the same wine-producing

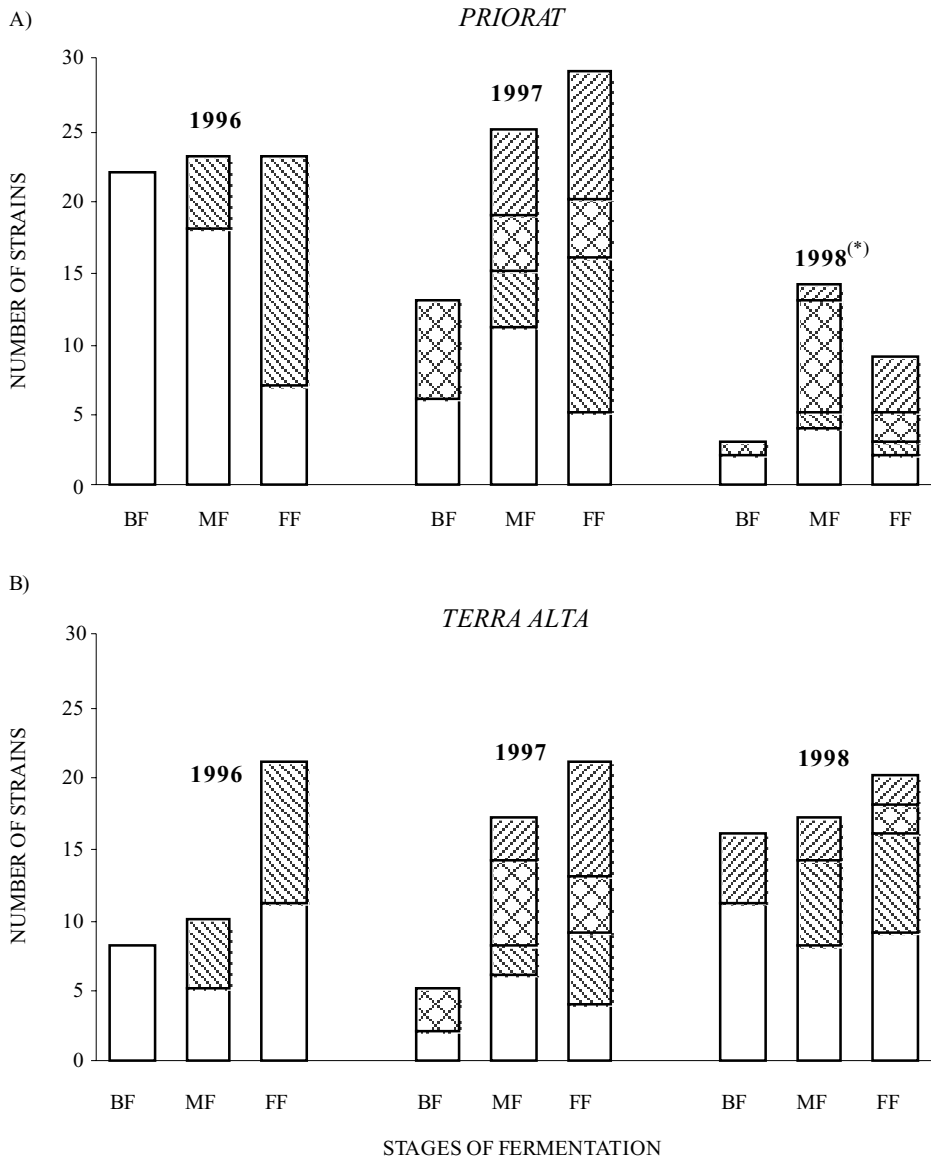


Figure 3. Biodiversity of different *Saccharomyces* strains during fermentation in the three years of the study. BF: Beginning of fermentation, MF: Mid fermentation, FF: Final of fermentation. A) Priorat; B) Terra Alta. (*) Only white vinification was considered.

□ New strains, ▨ Strains found in previous stages of the fermentation, ▩ Strains found in previous years, ▤ Strains found in previous years and in previous stages of fermentation.

region (3 strains in Terra Alta and 20 in Priorat). This phenomenon was also observed between the two different areas: 22 strains were isolated in both wine regions.

The killer phenotype was sought in all the strains. Most of the strains were sensitive (110 out of 112) and two were neutral (data not shown). Hence killer strains were not detected.

The number of patterns at each stage of the fermentation in both wine-producing areas is shown in Figure 3. The sequential presence of different strains throughout the fermentations was consistent in all of the vinifications. Strains that were new and found in previous years were observed at each of the stages studied (obviously all of the strains were new in 1996). Some of these strains were also isolated in several phases along the process, but no clear dominant strain was ever observed in all of the stages. Only the percentage of a given strain increased at the end of the fermentation.

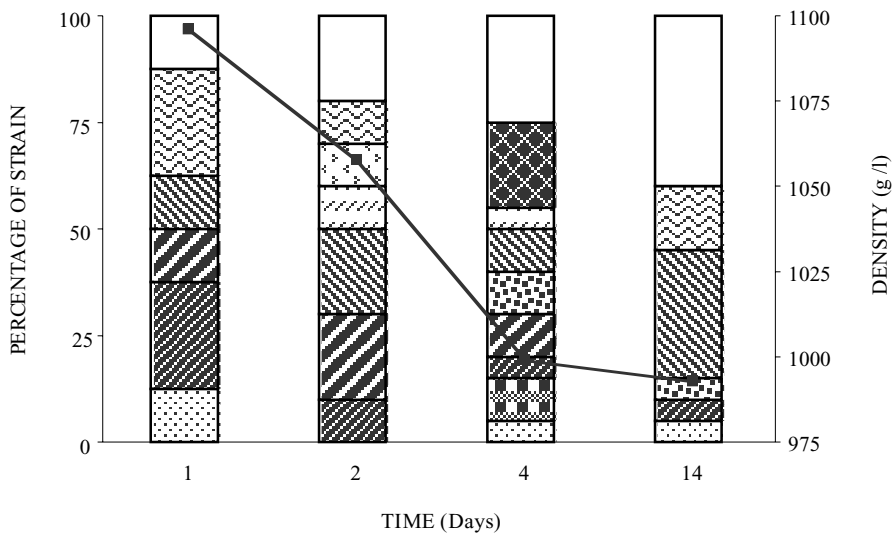


Figure 4. *Saccharomyces* strain diversity in a red fermentation from Terra Alta.

■ TA02, ■ TA06, ■ TA07, ■ TA08, ■ TA12, ■ TA35, ■ TA36, ■ TA37, ■ TA38, ■ TA40, □ the remaining minor *Saccharomyces* species, —■— Must density (g l^{-1}).

Saccharomyces strain diversity in a red fermentation is represented in Figure 4. As mentioned above, the diversity was similar in all the phases of fermentation but some strains

represented a higher percentage of the total population in the last days of the process (TA35 and TA38 represented 45 %).

DISCUSSION

In agreement with previous ecological studies on wine fermentations (Heard and Fleet, 1985; Schütz and Gafner, 1994; Constantí *et al.*, 1997, 1998), the alcoholic fermentation was carried out by *S. cerevisiae* in both wine regions; species of non-*Saccharomyces* were principally detected in large numbers in the early stages of the process. In this period, the main species was *C. stellata* followed by *H. uvarum*, a finding which is not in agreement with previous studies where *H. uvarum* was the most abundant non-*Saccharomyces* species at the beginning of fermentation (Querol *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1991; Fleet and Heard, 1993; Schütz and Gafner, 1994; Constantí *et al.*, 1997, 1998). This difference could be related to the special fermentation conditions in both wine regions: high sugar concentrations, high levels of added SO₂ and a lack of temperature control (ranging from 18-32°C). Furthermore, *C. stellata* has been detected at later stages of fermentations as well as *Schizosaccharomyces* spp. The presence and growth of *C. stellata* might be encouraged in juices with high concentrations of sugar (Benda, 1981; Lafon-Lafourcade, 1983). The significant contribution of members of this species during fermentations conducted in Spain has been reported previously (Mora *et al.*, 1990). The persistence of this species in red wine fermentations could be due to the practice of macerating with grape skins during the process. *Schizosaccharomyces*, a fission yeast which is seldom isolated from grape, is characterized by a high fermentative capacity at high temperatures (optimal growth about 30°C) and resistance to SO₂ (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; Florenzano *et al.*, 1977). Its presence at different phases of the fermentations studied here might be due to an increase in fermentation temperature and the oversulfiting of the musts.

The identification of all of the *Saccharomyces* strains as *S. cerevisiae* was also in agreement with previous reports for this area and for neighbouring wine regions (Constantí *et al.*, 1997; Sabaté *et al.*, 1998). Martini and Martini (1990) disagreed with wine technologists who claimed that strains of the species *S. bayanus* were particularly resistant to high ethanol concentrations and hence were considered to be the most useful starters for refermentation processes. As mentioned above, wines from both wine regions had high ethanol concentrations (around 14%) but even so none of the isolated strains were identified as *S. bayanus*. The uncontrolled temperature (higher

than 18°C) could also have contributed to the dominance of *S. cerevisiae* as *S. bayanus* has generally been found in cold areas and is defined as a cryotolerant species (Castellari *et al.*, 1992).

The degree of variability was a good parameter with which to evaluate the number of strains actively involved in fermentation. The variability average found in this study (22%) was clearly higher than corresponding results from previous studies: 8.6% (Querol *et al.*, 1994); 2.2 to 4.2% (Schütz and Gafner, 1994) and 20.7% (Nadal *et al.*, 1996). This high variability might be due to a number of reasons. Firstly, there were no yeasts with the killer phenotype and only two neutral strains found in the present study. Previous ecological studies have reported a high percentage of yeasts with the killer or neutral phenotype. Frezier and Dubourdieu (1992) did not detect any strain sensitive to the K2 toxin and Versavaud *et al.* (1995) correlated the killer phenotype with the predominant *S. cerevisiae* isolates, while the secondary strains were generally of the neutral or sensitive phenotype. Secondly, in contrast with earlier work (Hallet *et al.*, 1989; Versavaud *et al.*, 1993; Querol *et al.*, 1994) in our study, there was no predominant strain which carried out the process, but a large number of strains fermenting sequentially. Some predominant strains were found at a certain stage of fermentation but none of them were capable of outgrowing the others at any stage of the process. We conclude, therefore, that the present fermentations were the result of a sequence of different populations of *Saccharomyces*.

Finally, no commercial starters had previously been inoculated in these cellars. The use of active dry yeasts reduces the number of indigenous *Saccharomyces* strains in favour of the starter, although there is still a significant development of natural strains during the early stages of fermentation (Querol *et al.*, 1992a). This reduction in diversity is observed even when spontaneous fermentations are allowed in cellars which have previously been inoculated (Constantí *et al.*, 1998).

Our ability to isolate new strains shows that yeast population changes from year to year. However, some strains were found over the three consecutive years in the same cellar which could indicate the formation of natural microbiota resident in the wineries. The appearance of new strains, year after year, points towards a high diversity in the resident microbiota. Furthermore, not only are some strains present in different cellars in the same area but also in cellars of both areas. This could be easily explained because, both wine regions are geographically close (ca. 50 Km), and the exchange of strains could simply be caused by displacement via humans or insects.

The relationships between strains were determined by constructing a dendrogram deduced from mtDNA restriction fragments (data not shown). The subclusters did not show any correlation with the geographical origin, type of wine or year of isolation. This analysis also demonstrated that there was a high degree of similarity between both wine regions.

Many ecological studies of wine fermentations performed over the last few years have concentrated on yeast populations in the same cellar or in different cellars of the same wine region. However, in the present study the development of yeast populations in cellars from two wine regions was examined over three consecutive years. Traditional methods of winemaking and the fact that there was no previous inoculation were the most likely causes of the large diversity of species and strains. Two main species were found in all processes: *C. stellata* at the beginning and *S. cerevisiae* during the rest of the fermentation. *S. cerevisiae* strains did not predominate throughout the process though the percentages of some strains increased at the end of the fermentation probably as a result of restricted growth conditions due to the lack of nutrients and high alcohol contents.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants ALI96-0497 and PETRI 95-0179-0P from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Spain.

REFERENCES

- Amerine, M.A. and Kunkee, R.E.** (1968) Microbiology of winemaking. *Ann. Rev. Microbiol.* 22, 323-358.
- Amerine, M.A., Berg, H.W., Kunkee, R.E., Ough, C.S., Singleton, V.L.U.L. and Webb, A.D.** (1982) *The Technology of Wine Making*, 4th edn. AVI Publishing Company, Westport, Conn.
- Angelo, J. and Siebert, K.J.** (1987) A new medium for the detection of wild strains in brewing culture yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 45, 135-140.
- Benda, I.** (1981) Wine and brandy. In: Prescott and Dunn's *Industrial Microbiology*, 4th edn. (Ed. G. Reed) pp. 293-402. AVI Publishing Company, Westport, Conn.
- Castellari, L., Pacchioli, G., Zambonelli, C., Tini, V. and Grazia, L.** (1992) Isolation and initial characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Ital. J. Food Sci.* 3, 179-186.
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. and Guillamón, J.M.** (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339-344.
- Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A. and Guillamón, J.M.** (1998) Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 169-175.
- Cuinier, C.** (1978) Changes in the microflora of Chinon wines during winemaking. *Vignes vins* 269, 29-33.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A.** (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329-337.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M.** (1993) Yeasts: growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood, Chur.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. and Ribéreau-Gayon, P.** (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034-1038.
- Florenzano, G., Balleni, W. and Materassi, R.** (1977) Contributo alla ecologia dei lieviti *Schizosaccharomyces sulla*. *Vitis* 16, 38-44.
- Frezier, V. and Dubourdieu, D.** (1992) Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 375-380.
- Guillamón, J.M., Barrio, E., Huerta, T. and Querol, A.** (1994) Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 708-714.
- Guillamón, J.M., Barrio, E. and Querol, A.** (1996) Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 122-132.

- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A.** (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
- Hallet, J.N., Craneguy, B., Zucca, J. and Poulard, A.** (1989) Caractérisation des souches levuriennes des moûts et des lies par le polymorphisme de restriction de leur ADN mitochondrial. In: *Actualités oenologiques* 89. (Eds. P. Ribéreau-Gayon and A. Lonvaud) pp. 227-232. C.R. 4th Int. Symp. Oenol. Bordeaux. Dunod, Paris, France.
- Heard, G.M. and Fleet, G.H.** (1985) Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 727-728.
- Heard, G.M. and Fleet, G.H.** (1986) Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Austr.* 38, 22-25.
- Jacobs, C.J., Fourie, I. and van Vuuren, H.J.J.** (1988) Occurrence and detection of killer yeast on Chenin blanc grapes and grapes skins. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 9, 28-31.
- Lafon-Lafourcade, S.** (1983). Wine and brandy. In: *Biotechnology*, Vol. 5 (Ed. G. Reed) pp. 81-161. Verlag Chemie: Heidelberg.
- Lema, C., García-Jares, C., Orriols, I. and Angulo, L.** (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 206-216.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. and Villa, T.G.** (1991) Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 141-144.
- Martini, A. and Martini, A.V.** (1990) Grape must fermentation past and present. In: *Yeast Technology*. (Eds. J.F.T. Spencer and M. Spencer) pp. 105-123. SpringerVerlag: Berlin.
- Mateo, J.J., Jiménez, M., Huerta, T. and Pastor, A.** (1991) Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to aroma of wines. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 153-160.
- Mora, J., Barbas, J.I. and Mulet, A.** (1990) Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 156-159.
- Nadal, D., Colomer, B. and Piña, B.** (1996) Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1944-1950.
- Poulard, A.** (1984) Influence of several factors affecting variability of the yeast microflora of musts and wines. *Vignes vins* 326, 18-21.
- Querol, A., Jiménez, M. and Huerta, T.** (1990) A study on microbiological and enological parameters during fermentation of must from poor and normal grapes harvest in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci.* 55, 1603-1606.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D.** (1992a) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2952.

- Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D.** (1992b) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D.** (1994) Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 315-323.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. and Sudraud, P.** (1975) *Traité d'Oenologie. Sciences et Techniques du vin, Vol. 2.* Dunod ed., Paris.
- Sabaté, J., Cano, J., Querol, A. and Guillamón, J.M.** (1998) Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 452-455.
- Schütz, M. and Gafner, J.** (1993) Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 551-558.
- Schütz, M. and Gafner, J.** (1994) Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 253-257.
- Sponholz, W.R. and Dittrich, H.H.** (1974) Die bildung von SO₂-bindenden Gärungs-Nebenprodukten, höheren Alkoholen und Estern bei einigen Reinzachthefestämmen und bei einigen für die Weinbereitung wichtigen "wilden" Hefen. *Wein Wissenschaft* 29, 301-304.
- Vaughan-Martini, A. and Martini, A.** (1995) Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Ind. Microbiol.* 14, 514-522.
- Versavaud, A., Dulau, L. and Hallet, J.N.** (1993) Etude écologique de la microflore levurienne spontanée du vignoble des Charentes et approche moléculaire de la diversité infraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Fr. Oenol. (Cah Sci)* 142, 20-28.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L. and Hallet, J.N.** (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3521-3529.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.** (1990) Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols. A guide to methods and applications.* (Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White) pp. 315-322. Academic Press, San Diego.

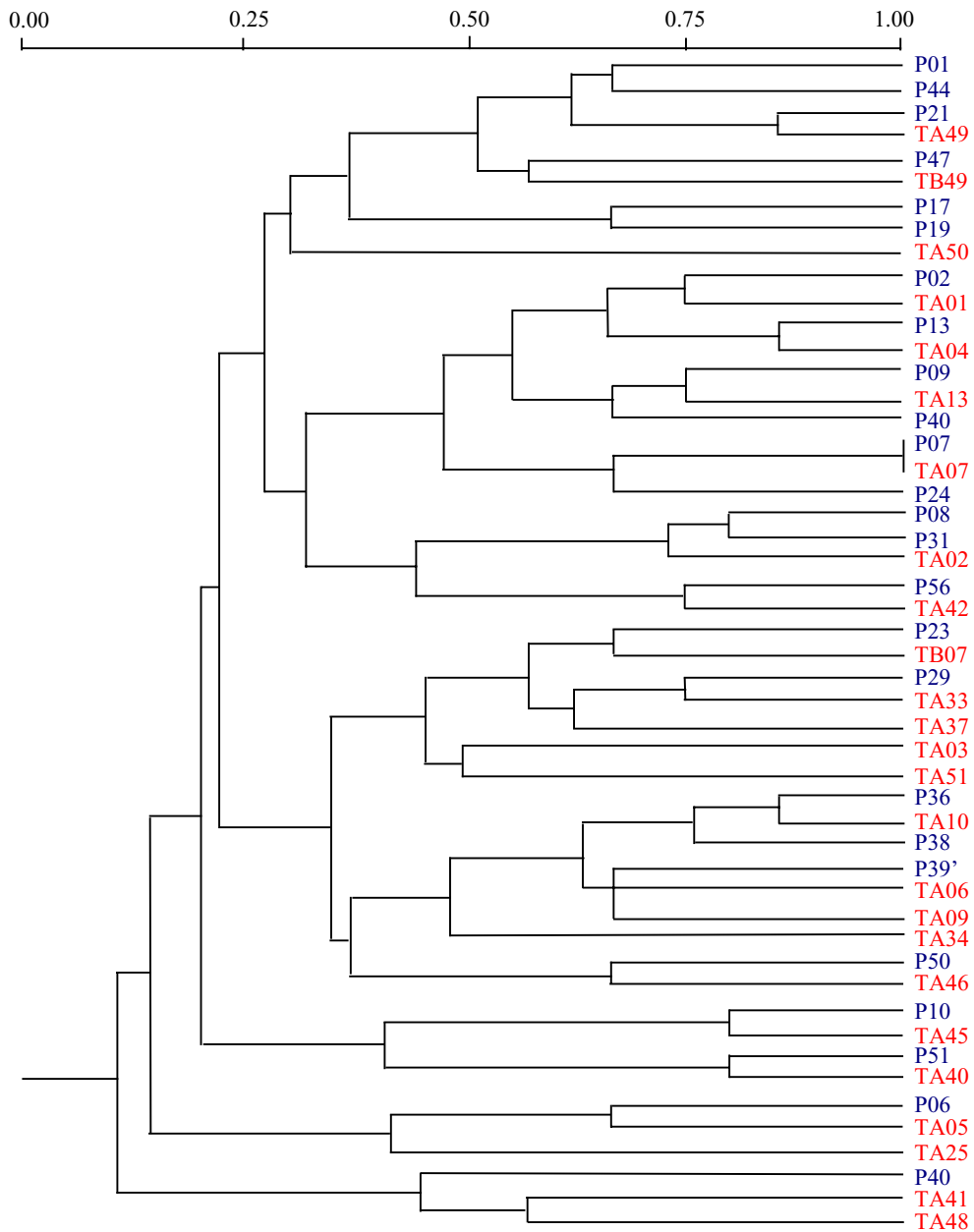


Figure not included in the paper. Dendrogram obtained by the UPGMA method, using the similarity between the mtDNA restriction patterns (measured as Dice coefficient or fraction of shared restriction bands) of 50 strains of *Saccharomyces* chosen between the 112 strains isolated in our study (P: Priorat strains; TA: Terra Alta strains).

CAPÍTULO 3:

**EFFECTS OF FERMENTATION TEMPERATURE ON THE
STRAIN POPULATION OF *Saccharomyces cerevisiae***

M.J. Torija, N. Rozès, M. Poblet, J.M. Guillamón y A. Mas

International Journal of Food Microbiology
(aceptado para su publicación)

ABSTRACT

The influence of fermentation temperature (from 15 to 35°C) on a mixed strain population was studied. Mitochondrial DNA analysis was used to differentiate *Saccharomyces cerevisiae* strains and the frequency of each strain during the alcoholic fermentation was determined. The chemical analyses of resulting wines were carried out. The temperature determined how *Saccharomyces* strains developed and how effectively they fermented. Some strains performed better at high temperatures and others at low temperatures. The maximal population size was similar at all temperatures. At low temperatures, however, it was reached later though it remained constant throughout the alcoholic fermentation. On the other hand, viable cells decreased at high temperatures, especially at 35°C. Obviously, the composition of the wines changed as the temperature of fermentation changed. At low temperatures, alcohol yield was higher. Secondary metabolites to alcoholic fermentation increased as the temperature increased. Glycerol levels were directly affected by temperature.

INTRODUCTION

Alcoholic fermentation is a combination of complex interactions involving must variety, microbiota and winemaking technology. Obviously, some factors strongly affect alcoholic fermentation, and, as a consequence the quality of the wine. The most important ones are the clarification of grape juice, the levels of the sulphur dioxide, the temperature of fermentation, the composition of the grape juice, inoculation with selected yeasts and the interaction with other microorganisms (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). One of these factors, the temperature of fermentation, directly affects the microbial ecology of the grape must and the biochemical reactions of the yeasts (Fleet and Heard, 1993).

Several authors have suggested that some species of non-*Saccharomyces* have a better chance of growing at low temperatures than *Saccharomyces* (Sharf and Margalith, 1983; Heard and Fleet, 1988) because they can increase their tolerance to ethanol (Gao and Fleet, 1988). Also, the number of different species as well as their endurance during alcoholic fermentation is conditioned by both the temperature of the must and the temperature during fermentation. These changes determine the chemical and organoleptic qualities of the wine (Fleet and Heard, 1993). Temperature is also known to affect yeast metabolism and, as a result, the formation of secondary metabolites such as glycerol, acetic acid, succinic acid...(Lafon-Lafourcade, 1983).

In a previous ecological study (Torija *et al.*, 2001) we isolated several strains from a *Saccharomyces cerevisiae* "natural" population, which were used in the present study. This population had a high diversity of strains, probably related to the absence of killer phenotype, control of temperature and lack of previous inoculation with commercial strains. Very little is known about how fermentation temperature affects the dynamics of the *Saccharomyces* strain population. Competition during alcoholic fermentation carried out at different temperatures could therefore be a way of testing the natural endurance of indigenous strains. This could be used as a criterion for rapidly selecting one of several strains and at the same time, studying resistance to temperature in a controlled situation i.e. under laboratory conditions. Inoculating selected yeasts to ensure that alcoholic fermentation begins properly has become common practice in enology, and new molecular biology techniques for identifying strains have made it easier to confirm the imposition of inoculated yeasts (Querol *et al.* 1992a).

The aim of this paper is therefore to evaluate how temperature affects the dynamics of a known population of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. We used the 20 most consistent strains present in natural vinifications. We report how *Saccharomyces* strains isolated from the same wine-producing area interact during alcoholic fermentations at different temperatures and how this affects the composition and characteristics of the wine.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains

The strains had previously been isolated and identified in an ecological study at wineries in the Priorat region (Spain) (Torija *et al.*, 2001). Twenty strains of *Saccharomyces cerevisiae* with killer sensitive phenotype were used. These strains were cultured for 48 h at room temperature on fresh YPD medium (Glucose 20 g l⁻¹; Peptone Bacteriological (Cultimed, Panreac, Barcelona, Spain) 20 g l⁻¹; Yeast extract (Cultimed) 10 g l⁻¹) before they were used in the fermentations.

Fermentation experiments

The medium was made from concentrated white must (Concentrados Palleja, Riudoms, Spain), that was diluted to obtain a final sugar concentration of 200 g l⁻¹. Total acidity was adjusted to 6 g l⁻¹ with tartaric acid and the total sulphur dioxide was adjusted to 60 mg l⁻¹ with potassium metabisulphite. The must pH was 3.3.

Fermentations were performed in 500 ml bottles filled with 450 ml of media and covered with a cotton cap. Twenty strains were inoculated in the same flask at the initial population of 1×10^5 cfu ml⁻¹ each, which made the total population 2×10^6 cfu ml⁻¹.

The fermentations were incubated in duplicate at five different temperatures (15, 20, 25, 30 and 35°C) without shaking. Every day the CO₂ released was assessed by measuring weight loss and the growth of yeast was measured by counting the viable yeast. Final fermentation was considered when no residual sugars were left (< 2 g l⁻¹). Maximal fermentation rate was the maximal slope obtained from the representation of sugar consumption towards fermentation day and was expressed as concentration of consumed sugars (in g l⁻¹) per day.

Viable yeasts were determined by plating them on YPD agar at an adequate dilution. For the molecular study, 40-50 colonies were taken randomly and isolated from each plate. Sampling was done half-way through fermentation (MF; density, g l⁻¹ \cong 1,040) and at final fermentation (FF; density, g l⁻¹ \cong 990). It has to be considered that only 40-50 randomly selected colonies were analysed at each point, so the results should to be taken with the appropriate restraint of the random selection.

Mitochondrial DNA restriction analysis

DNA was extracted and mitochondrial DNA restriction patterns of the strains were determined as previously was described by Querol *et al.* (1992b) with the restriction endonuclease *HinfI* (Boehringer Mannheim, Germany). Restriction fragments were separated on a horizontal 0.8% agarose (Ecogen, Barcelona, Spain) gel in TBE buffer (Tris 89 mM; boric acid 89 mM; EDTA 2 mM; pH 8).

Chemical analysis

Fermentable sugar concentration and ethanol were analysed using a modified Rebelein method (Rebelein, 1973) and ebulliometry, respectively (García Barceló, 1990). Titratable acidity was analysed by titration with 0.1 M sodium hydroxide solution and phenolphthalein as the indicator (Ough and Amerine, 1987). Residual sugars, glycerol, acetaldehyde, and acetic and succinic acid were assayed using specific Boehringer Mannheim enzymatic kits.

RESULTS

Effect of temperature on yeast growth

Temperatures grouped in three different profiles of fermentation kinetics (see Figure 1 and Table 1). Fermentations at 15 and 20°C began more slowly, as we can see by their longer lag phase and slower rate of maximal fermentation, especially at 15°C. This caused a delay in reaching the maximal population (10^8 cfu ml⁻¹), but once it was reached it remained at these high values for the whole process, *i.e.* there was a long stationary phase and no declining phase.

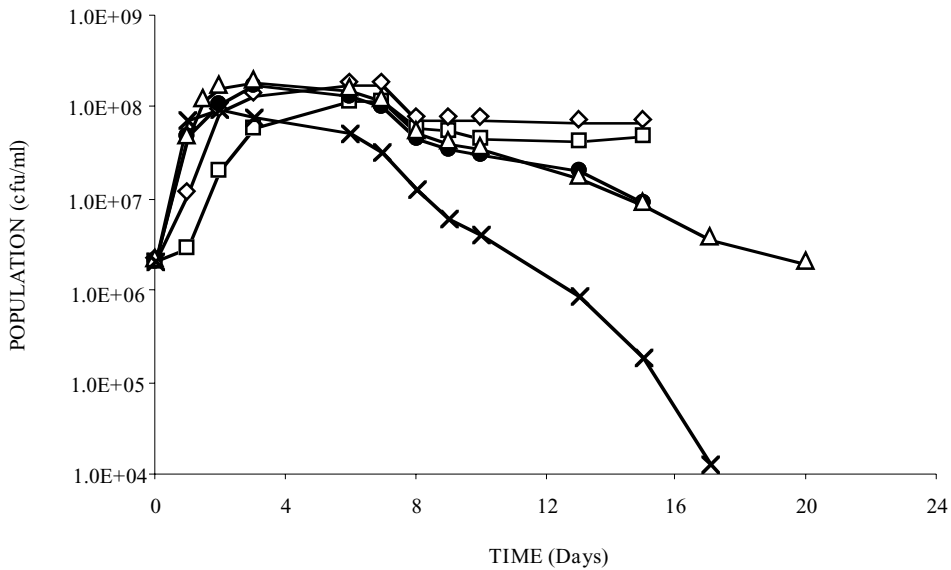


Figure 1. Variation in population size during alcoholic fermentation at different temperatures.
 o 15°C, ◊ 20°C, λ 25°C, Δ 30°C, × 35°C

Fermentations at 25 and 30°C reached similar maximal populations, although the initial fermentation rates were faster than at low temperatures. After the eighth day of fermentation, the population decreased down to values of 10^6 cfu ml⁻¹. Finally, fermentations at 35°C had no lag phase, but they had a quick exponential phase, and reached the maximal population earlier. However, the fermentation proceeded with a very short stationary phase. The decline phase began on the sixth day of fermentation and reached values as low as 10^2 cfu ml⁻¹ at the end of the process. Cell viability therefore fell as temperature increased.

Interestingly, the length of fermentation, just like the maximal population, was similar for all the temperatures studied, although high temperature fermentations needed more time to consume all the available sugars. So, although these fermentations started faster, the higher cell death may have caused a final decrease in the use of available sugars. In contrast, low temperature fermentations, which started more slowly, consumed faster all the sugars because the high biomass was maintained throughout the process.

Table 1. Effect of fermentation temperatures on yeast population, length and rate of fermentation.

	Day of maximal population	Maximal population reached (cfu ml ⁻¹)	Length of fermentation (days)	Maximal fermentation rate (g l ⁻¹ day ⁻¹)
15°C	6	1.18×10 ⁸	15	9.41
20°C	3	1.46×10 ⁸	15	20.87
25°C	3	1.73×10 ⁸	15	52.87
30°C	3	1.95×10 ⁸	20	63.23
35°C	2	0.97×10 ⁸	20	69.69

Effect of temperature on strain variability

We analysed the relative performances of the strains at different temperatures in competition (Fig. 2A and 2B) at the same starting population sizes (5%). In mid fermentation, only more extreme and the optimal temperatures were studied. At 35°C, at the end of fermentation, only one strain survived both the high temperature and the sugar content and, therefore, the ethanol content. However, more strains were present in the middle of fermentation when the alcohol concentration was lower and, therefore, the synergic effect of ethanol and temperature was less restrictive. At 25 and 30°C, one strain (P29), led the fermentations, with a presence that ranged from 25% to 42%. This strain showed a better performance of high temperatures because it always increased by the end of fermentation at these temperatures.

At low temperatures, no strain led the fermentation; up to four strains had a relative presence of 12,5-17,5% at the end of the fermentation but their percentages in the middle of the process were almost undetectable. Interestingly, five strains did not appear at any temperature, while four strains were identified at the end of fermentation irrespective of the temperature (except at 35°C when only one was isolated), although their percentages were different according to the

temperatures. Also, the percentages of the strains changed during fermentation; some strains that were especially abundant in the middle phases clearly disappeared at the end of fermentation.

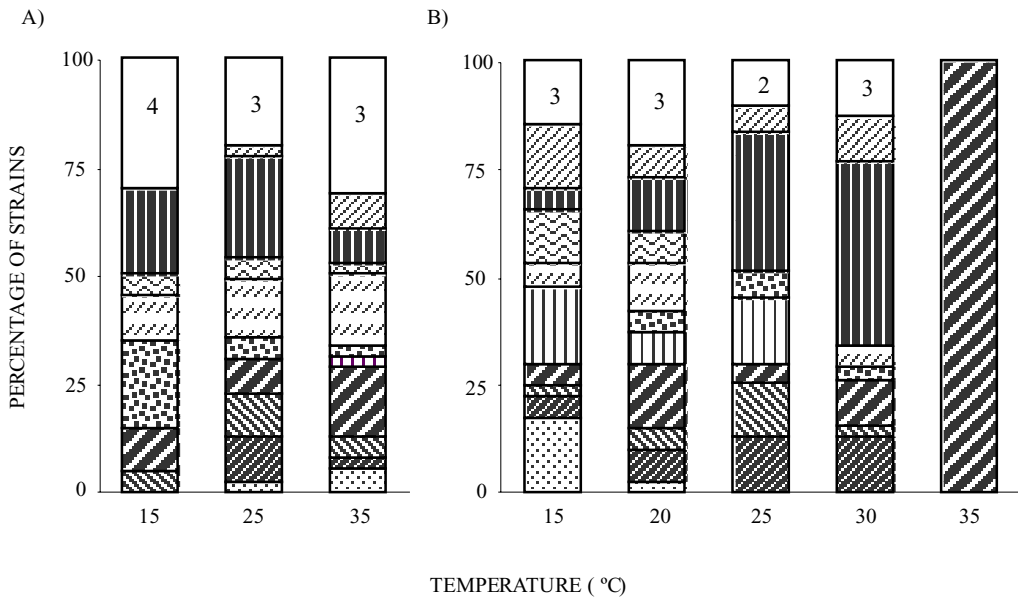


Figure 2. Percentages of *Saccharomyces cerevisiae* strains present at: A) Mid fermentation and B) the end of fermentation.

P01,
 P04,
 P06,
 P07,
 P08,
 P12,
 P21,
 P25,
 P29,
 P33,
 Others (the number on top of the bars represent the numbers of different minority strains, <10%)

For the most usual vinification temperatures (Fig. 3), the results were grouped as high temperatures (25-35°C) and low temperatures (15-20°C). High temperatures are common for the production of red wines, which are generally fermented without cooling, while white wines are generally fermented at lower, controlled temperatures. From this, the strains could be chosen to make red or white wines according to their best performing temperatures. In our study, there were two main strains for the red wine process (P07 and P29). Although P07 is the only survivor strain at 35°C, P29 is probably the most suitable strain for the temperatures that are normally used to produce red wines (25-30°C), since 35°C may be too high for winemaking. For white wines, there was no dominant strain; six strains had similar percentages at the end of fermentation.

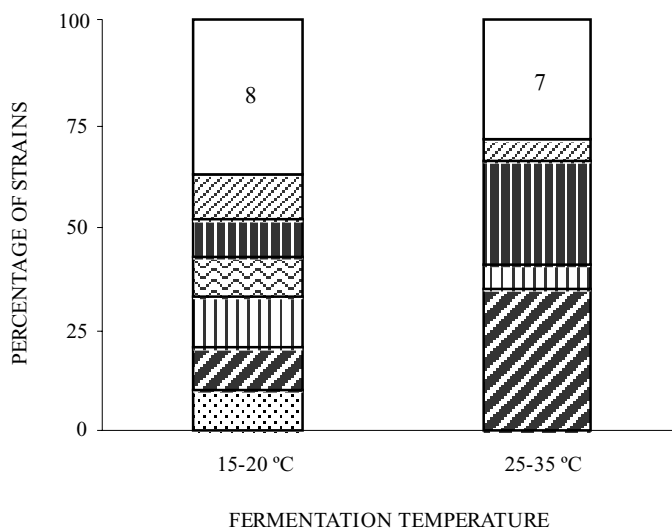


Figure 3. Percentages of *Saccharomyces cerevisiae* strains grouped for "vinification" temperatures.

▣ P01, ▤ P07, ▥ P08, ▦ P25, ▧ P29, ▨ P33, □ Others (the numbers on top of the bars represent the numbers of different minority strains, <10%)

Effect of temperature on analytical parameters

Chemical analyses were performed on the resulting wines (Table 2), all of which had residual sugars below 2 g l^{-1} . As expected, ethanol yield decreased as the temperatures increased. Acetic acid and, in particular, glycerol increased as the temperature increased. Acetaldehyde had maximal concentration when the fermentation was performed at 20°C , and minimal concentration at 35°C . The sum of all the secondary products (glycerol, acetic and succinic acid and acetaldehyde) increased as fermentation temperatures increased. In fact, these results may indicate two shifts in the yield of fermentation products. Although the differences between the yield at $15\text{-}20^\circ\text{C}$ and the yield at $25\text{-}30^\circ\text{C}$ may be considered unimportant (3 g l^{-1}), if we also take into account the loss of CO_2 there is a considerable reduction. On the other hand, the changes between 30 and 35°C are dramatic.

Table 2. Chemical analyses of wines (end products)

Concentration (g l ⁻¹)	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Ethanol	93.60 ±0.56 ^a	93.04 ±0.88	90.00 ±0.56	89.60 ±0.00	79.52 ±1.84
Glycerol	6.05 ±0.11	6.59 ±0.07	6.91 ±0.11	7.18 ±0.02	7.38 ±0.08
Acetaldehyde	0.05 ±0.00	0.09 ±0.01	0.04 ±0.00	0.04 ±0.00	0.02 ±0.00
Succinic acid	0.74 ±0.06	0.89 ±0.04	0.77 ±0.06	0.92 ±0.08	0.70 ±0.03
Acetic acid	0.08 ±0.01	0.13 ±0.01	0.14 ±0.00	0.13 ±0.01	0.22 ±0.04
Sum of products	100.52	100.74	97.86	97.87	87.84
CO₂	89.53	88.99	86.08	85.70	76.06
Products + CO₂	190.05	189.73	183.94	183.57	163.90
Ethanol yield^b	47.51	47.23	45.68	45.48	40.36

^a Mean ±SD

^b Ethanol produced (g l⁻¹) ×100 / initial sugars (g l⁻¹)

DISCUSSION

Few studies have analysed how temperature affects the population dynamics of *Saccharomyces* strains during alcoholic fermentation (Epifanio *et al.* 1999). Nearly all focused on different species of yeasts (Sharf and Margalith, 1983, Heard and Fleet, 1988, Mateo *et al.*, 1991).

As expected, the growth in yeast varied according to temperature. The usual growth curve, with a series of short-lag, exponential, stationary and decline phases, was observed at 25 and 30°C, whereas at 35°C a high amount of yeast died. This high yeast mortality may have induced a slower final of fermentation and can produce stuck fermentations with higher sugar contents. In fact, these results agree with previous reports that yeast viability decreases as the temperature increases (Ough, 1966; Nagodawithana *et al.*, 1974; Casey *et al.*, 1984). This decrease was thought to be due to a greater accumulation of intracellular ethanol at higher temperatures, which would produce cell toxicity (Nagodawithana *et al.*, 1974) and would alter the structure of the membrane, decreasing its functionality (Lucero *et al.*, 2000). However, at low temperatures there was no decline phase, so, the stationary phase lasted until the end of fermentation.

Changing the temperatures clearly improved the development of some *Saccharomyces* strains. Some strains were predominant at low temperatures but others predominated at high ones. Our results agree with those of Fleet and Heard (1993) who reported that temperature affected the development of the indigenous yeast strains, and suggested that different strains were better or less suited for different temperatures (ranging from 10 to 30°C). For example, when *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* were growing in the same medium, the latter could even dominate the

fermentation at low temperatures (Sharf and Margalith, 1983; Heard and Fleet, 1988). However, as we took a semiquantitative approach in all these ecological studies (i.e. we analysed only a small percentage of all the population), these results do not mean that only those strains that are found in the population analysis can ferment at a given temperature. In fact, some of these strains were tested in pure culture at different temperatures and they fermented correctly. Another interesting result was that some strains were ubiquitous at all temperatures, which means that they were competitive in a broader temperature range than the others. However, the most important data for real winemaking is probably the ability of some strains to finish the fermentation, since any delay would allow undesirable compounds to appear.

It is well known that fermentation at 35°C is very restrictive and that this fermentation probably ended because only one strain survived this high temperature. In our laboratory and experimental cellar we had stuck fermentations at 35°C that still had a high concentration of sugar, and this also happened in commercial cellars. The effect of higher temperatures is a premature end of fermentation, which means that fermentation is incomplete and the ethanol concentration is low (Larue *et al.*, 1980). We might therefore assume that, at these restrictive temperatures, almost all the fermentations would proceed with difficulty and that there would be a higher probability of stuck fermentations, unless a resistant strain appeared, as in our case.

The percentage of the different *Saccharomyces* strains changed considerably during fermentation. This may be related to their sensitivity to ethanol toxicity; some strains always disappeared when the concentration of ethanol in the medium was high. Also, the ethanol tolerance of some yeast species depends on the temperature (Casey and Ingledew, 1986; D'Amore and Stewart, 1987; Gao and Fleet, 1988), and this could be the case of some *Saccharomyces* strains. This may explain why the presence of some strains decreased at some temperatures, but were able to finish the fermentation at other temperatures.

The resistance of a strain to specific temperature and ethanol concentration may be related to the natural conditions of their isolation area. In the AOC Priorat, red wines with a high alcohol content predominate, and fermentations are normally done at 25-30°C. So, at lower temperatures, which are more usual for white wines, there were no 'preferred' strains. Mixed inocula could be used to ensure fermentation at high sugar content and low temperatures.

However, temperature affected not only the fermentation kinetics (rate and length of fermentation) but also the yeast metabolism, which determined the chemical composition of the

wine. As expected, the final concentration of alcohol decreased as the temperature increased, which has been related to a drop in the ethanol yield and a reduced used of substrate (Casey and Ingledew, 1986). In our experiments, the substrate was completely used, and although losses due to evaporation at high temperatures are expected, the main cause of this reduction is probably the increase of products of other metabolic pathways such as glycerol, acetic acid, etc. However, these secondary products could not completely explain why ethanol yield dropped so much as the temperature increased. We have not studied all the possible secondary products, yet the concentrations of those we have not studied are negligible though some of them could be relevant for tasting (i.e. esters, higher alcohols, ...). Glycerol and succinic acid are the main secondary products in alcoholic fermentations led by *S. cerevisiae*. Although the total concentration of secondary products increased, the concentration of acetaldehyde decreased as the temperature increased, contrary to what had previously been reported (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975). The difference in ethanol yield at different temperatures may also be related to biomass production, but at 35°C the difference is too great for it to be explained in this way. So, adjustment of yeast metabolism to extreme conditions should account for this difference.

The temperature of fermentation can clearly affect the development of the different *Saccharomyces* strains. As a consequence, wine quality and characteristics are strongly affected by the *Saccharomyces* strain population dynamics and their endurance to different temperatures can be a criterion for indigenous microbiota selection for further purposes such as fermentation starters. The yield of ethanol and other fermentation by-products are also related to temperature during fermentation. So, temperature of fermentation could also be used in winemaking to control some of the chemical characteristics of the wines such as glycerol or ethanol concentrations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by grants 2FD1997-1854 and AGL2000-0205-P4-03 from the *Dirección General de Investigación*, of the *Ministerio de Ciencia y Tecnología*, Spain.

REFERENCES

- Casey, G.P., Magnus, C.A. and Ingledeu, W.M.** (1984) High gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 639-646.
- Casey, G.P. and Ingledeu, W.M.** (1986) Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13, 219-280.
- D'Amore, T. and Stewart, G.** (1987) Ethanol tolerance of yeast. *Enz. Microb. Technol.* 9, 322-330.
- Epifanio, S.I., Gutierrez, A.R., Santamaría, M.P. and López, R.** (1999) The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 219-224.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M.** (1993) Yeasts: growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Chur: Switzerland.
- García Barceló, J.** (1990) Técnicas analíticas para vinos. (Ed. J. García Barceló) GAB: Barcelona.
- Gao, C. and Fleet, G.H.** (1988) The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 405-410.
- Heard, G.M. and Fleet, G.H.** (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 23-28.
- Lafon-Lafourcade, S.** (1983) Wine and brandy. In: *Biotechnology, Volume 5. Food and Feed Production with microorganisms*. (Eds. H.J. Rehm and G. Reed) pp. 81-163. Verlag Chemie: Weinheim.
- Larue, F., Lafon-Lafourcade, S. and Ribéreau-Gayon, P.** (1980) Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 808-811.
- Lucero, P., Peñalver, E., Moreno, E. and Lagunas, R.** (2000) Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4456-4461.
- Mateo, J.J., Jiménez, M., Huerta, T. and Pastor, A.** (1991) Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to aroma of wines. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 153-160.
- Nagodawithana, T.W., Castellano, C. and Steinkraus, K.H.** (1974) Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. *Appl. Microbiol.* 28, 383-391.
- Ough, C.S.** (1966) Fermentation rates of grape juice. III Effects of initial ethyl alcohol, pH and fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* 17, 74.
- Ough, C.S. and Amerine, M.A.** (1987) *Methods for analysis of must and wines*. Wiley-Interscience Publication: California.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D.** (1992a) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2952.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D.** (1992b) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.

Rebelein H. (1973) Rapid method for the determination of the alcohol, sugar and total SO₂ contents (by distillation) in wine and fruit juices and also for determining blood alcohol. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 2, 112-121.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. and Sudraud, P. (1975) *Sciences et Techniques du vin. Traité d'Oenologie II.* Dunod: Paris.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. (2000) *Handbook of Enology, Volume I: The Microbiology of Wine and Vinifications.* Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England.

Sharf, R. and Margalith, P. (1983) The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 311-313.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M. Guillamón, J.M. and Mas, A. (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine areas during three consecutive years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 345-352.

CAPÍTULO 4:

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* DE LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN TERRA ALTA

INTRODUCCIÓN

Un estudio paralelo al explicado en el capítulo anterior para cepas de la D.O. Priorat se llevó a cabo con cepas aisladas de la D.O. Terra Alta (Torija *et al.*, 2001). El diseño experimental de estas fermentaciones fue similar al que se utilizó con las cepas de la D.O. Priorat (Capítulo 3). Las principales diferencias se encuentran evidentemente en las 20 cepas utilizadas, y en que el mosto tiene una concentración de azúcares más elevada (214 g/l). Al igual que se hizo con las cepas de la D.O. Priorat, en la elección de estas 20 cepas se tuvo principalmente en cuenta las fermentaciones alcohólicas espontáneas estudiadas, descartándose aquellas cepas cuya contribución hubiera sido mínima o puntual. Todas las cepas eran de fenotipo killer sensible.

El seguimiento y los análisis realizados tanto durante como a final de fermentación fueron los mismos que ya se han explicado para las fermentaciones con cepas de la D.O. Priorat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de fermentación

Todas las fermentaciones finalizaron excepto la que se llevó a cabo a 35°C. A esta temperatura, aunque la fermentación empezó de forma rápida, presentando la mayor velocidad máxima, se produjo una parada de fermentación cuando todavía quedaban unos 27 g/l de azúcares fermentables en el medio (Tabla 1). Esta parada de fermentación no resulta sorprendente, ya que está descrito que las elevadas temperaturas (por encima de 30°C) pueden ser un factor limitante en la finalización de la fermentación (Sharf y Margalith, 1983; Bisson, 1999; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Tabla 1. Efecto de la temperatura sobre la población máxima, la duración de la fermentación y la tasa máxima de consumo de azúcar.

	Día de población máxima	Población máxima (ufc ml ⁻¹)	Tiempo de fermentación (días)	Tasa máxima de consumo (g l ⁻¹ día ⁻¹)
15°C	13	1,0×10 ⁸	36	20,52
20°C	9	2,7×10 ⁸	36	27,25
25°C	6	0,9×10 ⁸	22	52,90
30°C	3	0,6×10 ⁸	23	52,90
35°C	3	0,3×10 ⁸	20 (Parada Ferm.)	55,88

Los perfiles de población parecían agruparse dependiendo de la temperatura de fermentación en 3 grupos (15-20°C; 25-30°C; 35°C), con claras diferencias entre ellos (Figura 1 y Tabla 1). Las fermentaciones más largas se produjeron a las temperaturas más bajas, las cuales presentaban un descenso inicial de la población (fase de latencia más larga), un retraso para alcanzar su población máxima, así como una menor tasa de consumo de los azúcares fermentables. De todas maneras, una velocidad máxima elevada no garantiza que la fermentación acabe sin problemas, como se ha explicado para las fermentaciones a 35°C.

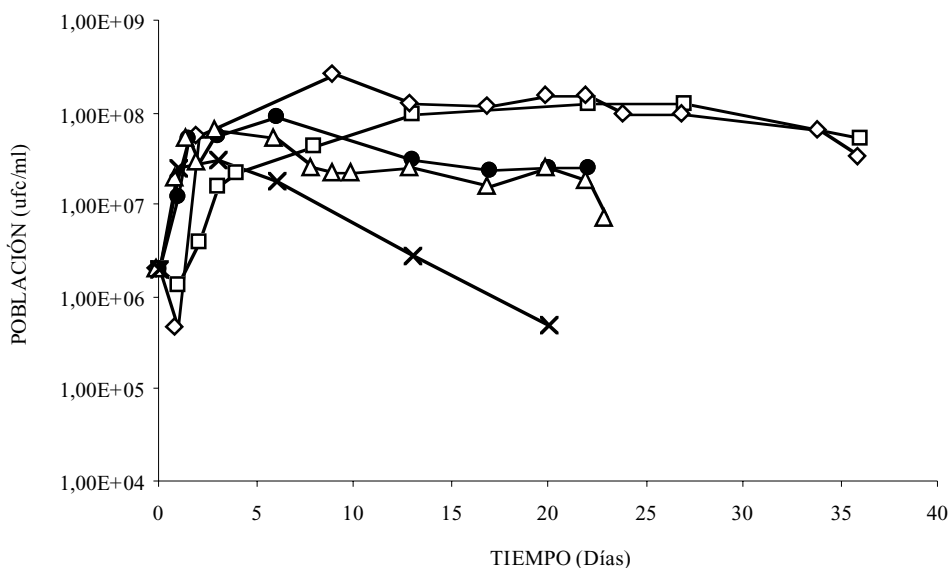


Figura 1. Evolución de la población viable durante las fermentaciones alcohólicas a diferentes temperaturas. o 15°C, ◊ 20°C, λ 25°C, Δ 30°C, × 35°C

La temperatura de fermentación influye claramente la población máxima alcanzada y la viabilidad celular a lo largo del proceso. Así, la población máxima aumenta al disminuir la temperatura (exceptuando el valor de 15°C, que es inferior al de 20°C, temperatura que presenta la mayor población máxima). Algo similar sucede con la fase estacionaria, ya que ésta es mayor cuánto menor es la temperatura. De hecho, mientras las fermentaciones a 15-20°C no presentan fase de declive, las fermentaciones a 35°C carecen prácticamente de fase estacionaria, con una reducción pronunciada de la viabilidad celular ya en los primeros días de fermentación. Este

descenso de la viabilidad al aumentar la temperatura (Casey *et al.*, 1984) se ha atribuido a una mayor acumulación intracelular de etanol a altas temperaturas que puede producir toxicidad celular (Nagodawithana *et al.*, 1974), así como alterar su estructura de membrana (Lucero *et al.*, 2000). La velocidad de fermentación, en cambio, aumenta con la temperatura, aunque a partir de 25 °C, éste aumento es mínimo.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el estudio realizado con las cepas de la D.O. Priorat (Capítulo 3), se observan claras diferencias, en la cinética de fermentación.

- 1.- Las fermentaciones alcohólicas inoculadas con cepas de la D.O. Priorat finalizaron independientemente de la temperatura de fermentación.
- 2.- Las fermentaciones realizadas con las cepas de la D.O. Priorat fueron más rápidas y presentaron una duración similar entre temperaturas, a pesar de que las diferencias en las velocidades máximas entre temperaturas eran más pronunciadas.

Viendo estas diferencias, parece que las cepas de la D.O. Priorat muestran una mayor eficiencia en fermentaciones con estas condiciones. De todas maneras, se ha de recordar que la concentración inicial de azúcar en las fermentaciones con cepas de la D.O. Terra Alta era superior a las de la D.O. Priorat en unos 17 g/l (\approx 1 grado alcohólico probable más), lo que puede justificar algunas de las diferencias entre estas fermentaciones, ya que es la fermentación de los últimos gramos de azúcar en sinergia con el incremento de la concentración de etanol en el medio, lo que suele causar ralentizaciones y paradas de fermentación.

Variabilidad de las cepas de *Saccharomyces*

La temperatura tiene un gran efecto sobre las cepas de *S. cerevisiae* que llevan a cabo la fermentación alcohólica, ya que éstas aparecen en mayor o menor porcentaje dependiendo de la temperatura a la que se realice el proceso. Además, no hay ninguna cepa que se imponga de forma clara al resto en ninguna de las temperaturas ni fases de la fermentación estudiadas (diferente de lo que ocurría en las fermentaciones de Priorat con la cepa P07 a 35°C). De hecho, todas las cepas que se inocularon inicialmente se detectaron o a mitad o a final de la fermentación en alguna de las temperaturas estudiadas.

A 15°C, a mitad de fermentación (Figura 2A), la cepa mayoritaria, dentro de los bajos porcentajes de todas las cepas, fue TA04, mientras que a final de fermentación (Figura 2B), la cepa mayoritaria fue TA13 con un 30%, seguida de TA07, TA09 y TA10. Algo similar sucedía en la

fermentación a 20°C, aunque los porcentajes relativos de las cepas variaban, siendo TA10 y TA13 las cepas mayoritarias. Además, la variabilidad, a esta temperatura era muy elevada, ya que 16 de las 20 cepas inoculadas se detectaron a final de fermentación, por 10 cepas a 15°C. Esto puede ser debido a que 15°C es una temperatura más restrictiva y por tanto, hay un menor número de cepas capaces de fermentar a esta temperatura.

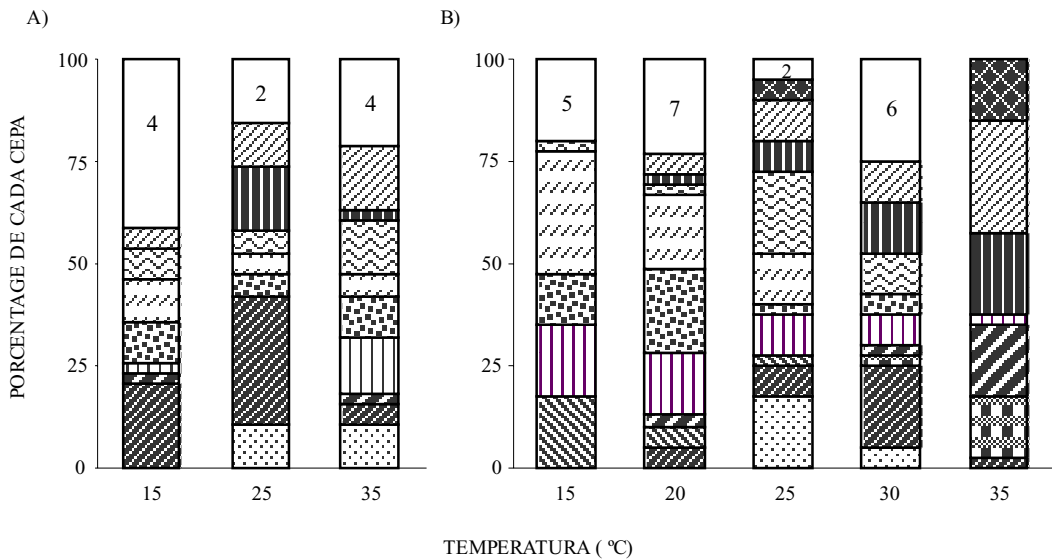


Figura 2. Porcentajes de las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, dependiendo de la temperatura de fermentación. A) Mitad de fermentación; B) Final de fermentación.

□ TA02, ▨ TA04, ▩ TA06, ▧ TA07, ▦ TA08, ▤ TA09, ▣ TA10, ▢ TA13, □ TA14, ■ TA15, ▟ TA19, ▞ TA22, □ Otras (los números indican el número de cepas minoritarias que están representadas, porcentaje < 10%)

A 25°C, a mitad de fermentación (Figura 2A), la cepa mayoritaria también fue TA04, tal y como ocurría a 15°C. A final de fermentación (Figura 2B), el porcentaje de esta cepa disminuyó, mientras aumentaba la contribución de otras cepas (TA14, TA02 y TA13). A 30°C, las cepas que eran mayoritarias a 25°C disminuían en sus porcentajes (siendo extremo para la cepa TA13 que no fue detectada), mientras que TA04, TA15 y TA19 tenían una mayor presencia.

Por lo que respecta a 35°C, no hay que olvidar que estas fermentaciones sufrieron una parada cuando todavía quedaba azúcar en el medio. Por tanto, en el momento de la toma de la

última muestra las células se encontraban en plena fase de declive, por lo que las cepas que se identificaron en este punto (y que se presentan en la Figura 2B), no son capaces de contrarrestar el efecto sinérgico ejercido por la elevada temperatura y el aumento del etanol en el medio. Así, a mitad de fermentación (Figura 2A), las cepas mayoritarias eran TA19, TA14 y TA09. En el último punto tomado de esta fermentación, la cepa mayoritaria seguía siendo TA19, que había aumentado su porcentaje hasta un 27,5%.

La variación en los porcentajes de las cepas a lo largo de una misma fermentación puede deberse a que según se va desarrollando el proceso la concentración de etanol en el medio aumenta, mientras que los nutrientes disminuyen, lo que significa unas condiciones más restrictivas para las levaduras. Se ha descrito que los efectos de la temperatura y el alcohol son sinérgicos, ya que actúan sobre las mismas funciones celulares, principalmente la membrana plasmática (Bisson, 1999). Además, la tolerancia al etanol de las levaduras se ha demostrado que varía dependiendo de la temperatura de fermentación (Casey y Ingledew, 1986; D'Amore y Stewart, 1987; Gao y Fleet, 1988), ya que en estudios realizados con cepas de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (*Kloeckera apiculata* y *Candida stellata*), se ha observado que las cepas de no-*Saccharomyces* pueden llegar a dominar a las de *Saccharomyces* a bajas temperaturas (Sharf y Margalith, 1983; Heard y Fleet, 1988), probablemente debido a que se incrementa su tolerancia al etanol.

Teniendo en cuenta que las temperaturas 15-20°C pueden considerarse como las típicas de las vinificaciones en blanco, y 25-30°C, las de vinificaciones en tinto, se hizo un agrupamiento de las cepas según la temperatura de vinificación (Figura 3). La temperatura de 35°C se ha incluido con las más altas, porque aunque es una temperatura extrema para vinificar, en las bodegas donde se han aislado las cepas no había un riguroso control de la temperatura y por tanto, en un día caluroso y en plena fermentación alcohólica se podría llegar a esta temperatura.

El resultado más destacable de esta agrupación es que las cepas que tienen una presencia importante a bajas temperaturas, son las minoritarias a altas temperaturas y viceversa. De hecho, las mayores diferencias en los porcentajes y contribución de las diferentes cepas a la fermentación alcohólica se aprecian cuando se produce un aumento significativo de la temperatura, ya que si se comparan temperaturas próximas (15-20°C), o como en el estudio de Epifanio *et al.* (1999), (14-18°C), las diferencias en el desarrollo de las cepas debido a la temperatura son mínimas.

Así, a bajas temperaturas, las cepas mayoritarias (en orden de mayor a menor porcentaje) fueron TA13, TA09, TA10 y TA07, mientras que a altas temperaturas lo fueron TA19, TA15, TA14 y TA04 (Figura 3). Esto confirma que hay cepas que son más o menos adecuadas para este tipo de fermentaciones dependiendo de la temperatura a la que se lleven a cabo (Fleet y Heard, 1993).

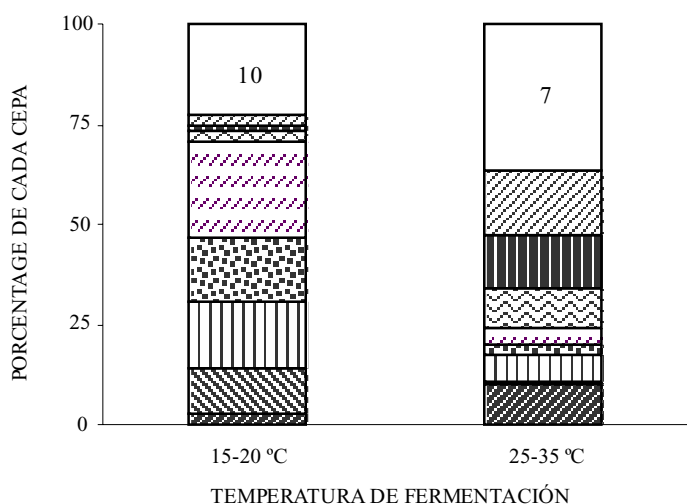


Figura 3. Porcentajes de las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* agrupadas según las temperaturas más usuales utilizadas en las vinificaciones en blanco y tinto.

■ TA04, ■ TA07, ▨ TA09, ▩ TA10, ▧ TA13, ▦ TA14, ■ TA15, ▨ TA19, □ Otras (los números indican el número de cepas minoritarias que están representadas, porcentaje < 10%)

Otro dato interesante es que a bajas temperaturas, en menor o mayor porcentaje, aparecían todas las cepas inoculadas, cosa que no ocurría en las fermentaciones a altas temperaturas donde solo se identificaron 14 de las 20 cepas. Por tanto, en estas experiencias se observa que las altas temperaturas parecen favorecer la implantación de unas cepas respecto a otras. Esto es todavía más evidente en las fermentaciones que se realizaron con cepas de la D.O. Priorat (Capítulo 3), ya que a altas temperaturas había 2 cepas que se imponían sobre el resto (P07 y P29). Las fermentaciones a 35°C merecen un comentario aparte, porque se trata de una temperatura muy restrictiva para las levaduras, que se pone de manifiesto en las fermentaciones con cepas de la D.O. Terra Alta, donde se produce una parada, confirmando lo descrito en la bibliografía (Larue *et al.*, 1980). El hecho de

que en las fermentaciones a 35°C con cepas de la D.O. Priorat la fermentación termine sin problemas, se debe a que hay una cepa (P07) que se impone al resto y que es capaz de soportar tanto las altas temperaturas como el alto contenido en etanol. De todas maneras, no hay que olvidar que las fermentaciones con las cepas de la D.O. Terra Alta presentaban una concentración superior de azúcares, que podía ser un factor limitante más para el crecimiento de las cepas. Pero lo que parece es que las altas temperaturas son más restrictivas para las levaduras que las bajas, o por lo menos que a altas temperaturas hay una mejor adaptación de unas cepas respecto a otras.

Análisis químicos de los vinos obtenidos

Como se esperaba, la producción de etanol disminuía según aumentaba la temperatura de fermentación (Casey y Ingledew, 1986) (Tabla 2). De todas maneras, la baja concentración de etanol producido en el caso de la fermentación a 35°C, se debía en buena parte a los gramos de azúcar que no fueron consumidos. Esta menor producción de etanol a temperaturas elevadas puede explicarse en parte, por la mayor evaporación y porque las altas temperaturas activan el metabolismo de las levaduras, y por tanto aceleran la glucólisis, lo que comporta una mayor producción de piruvato. Este piruvato en las primeras horas de fermentación no puede ser transformado en etanol porque las células presentan una actividad muy baja de los enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa y porque el acetaldehído formado se combina con el anhídrido sulfuroso, por lo que se forman otros productos en lugar de etanol. Éstos suelen ser los procedentes de la fermentación gliceropirúvica (Boulton *et al.*, 1996).

Aunque parece que en nuestro caso esta mayor producción de los compuestos de la fermentación gliceropirúvica a altas temperaturas no se cumplía en todos los casos (Tabla 2), si se estandarizan los resultados teniendo en cuenta la fermentación de los 100 primeros gramos de azúcar se observa que sí que hay un aumento de los productos de la fermentación gliceropirúvica al incrementarse la temperatura.

El glicerol aumentaba al incrementarse la temperatura de fermentación, excepto para 30°C, donde su concentración disminuía. El ácido succínico, por su parte, tenía su máximo a 20°C, para luego disminuir, siendo a 35°C donde presentaba sus niveles más bajos (Tabla 2).

El acetaldehído, al igual que el ácido succínico, presentaba su máxima concentración a 20°C y su mínimo a 35°C. La producción de ácido acético era relativamente elevada, sobre todo si se compara con los niveles que se habían detectado en el estudio con cepas de la D.O. Priorat

(máxima producción a 35°C, con 0,22 g/l). En este caso, la máxima concentración también se detectó a 20°C mientras el mínimo se produjo a 30°C.

Tabla 2. Análisis químicos de los productos finales

Concentración (g l ⁻¹)	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Etanol	103,60 ±0,00 ^a	98,56 ±0,24	96,80 ±1,12	90,24 ±0,32	78,40±2,24
Glicerol	6,68 ±0,16	6,72 ±0,18	7,16 ±0,24	6,98 ±0,15	7,87 ±0,03
Acetaldehído	0,03 ±0,00	0,05 ±0,00	0,03 ±0,00	0,04 ±0,00	0,01 ±0,0
Ácido succínico	1,10 ±0,14	1,28 ±0,24	1,14 ±0,15	0,86 ±0,13	0,65 ±0,03
Ácido acético	0,47 ±0,01	0,88 ±0,04	0,67 ±0,04	0,43 ±0,04	0,51 ±0,01
Suma de productos	111,87	107,49	105,80	98,55	87,44
CO₂^c	99,09	94,27	92,59	86,32	75,00
Productos + CO₂	210,96	201,76	198,39	184,87	162,44
Rendimiento etanol^b	48,41	46,05	45,23	42,17	36,63

^a Media ± Desviación estándar

^b Etanol producido (g l⁻¹) × 100 / concentración de azúcares iniciales (g l⁻¹)

^c la concentración de CO₂ está calculada de forma equimolar a partir de la concentración de etanol

Por tanto, al hacer el balance final de los productos obtenidos a partir de la fermentación de los 214 g/l de azúcar presentes en el medio al inicio de la fermentación se observó que mientras a 15°C se tenía una recuperación prácticamente total (211 g/l, sin contar otros productos secundarios que no habían sido analizados y la producción de biomasa), según se aumentaba la temperatura la diferencia cada vez era mayor, siendo 29 g/l en el caso de las fermentaciones a 30°C (sin contar 35°C ya que sus resultados no eran comparables debido a la parada de fermentación). Esta diferencia podía explicarse en parte, como ya se dijo en el estudio de las cepas de la D.O. Priorat, por la evaporación y la producción de biomasa, debido a que hay una mayor mortalidad. De todas maneras, las diferencias son excesivas para explicarse únicamente de esta forma, y es posible que éstas se deban a que a altas temperaturas algunas vías metabólicas estén saturadas y por tanto, su efectividad sea menor. Es evidente que para confirmar este punto, se tendría que realizar un estudio más completo al respecto, en el que se determinaran otras variables como la biomasa y la composición de la misma, la actividad y eficiencia de las diferentes vías metabólicas implicadas a diferentes temperaturas, la formación de otros posibles productos secundarios, etc.

Si se comparan los resultados analíticos de estos vinos con los obtenidos con cepas de la D.O. Priorat, parece que estas cepas produzcan más etanol, ácido succínico o glicerol, pero estas diferencias son debidas simplemente a que el mosto inicial de este experimento era más rico en

azúcares (aprox. 17 g/l). Si se estandarizan estos valores, considerando la producción de estos metabolitos para 100 g de azúcar, lo que se observa es que el rendimiento en etanol es muy similar en las cepas de ambas D.O.s, lo que confirma que las diferencias en los grados alcohólicos obtenidos eran debidas a la mayor concentración de azúcar inicial y no a una mayor eficiencia en la producción de etanol por parte de las cepas de la D.O. Terra Alta. Con respecto al resto de metabolitos, la producción de glicerol es muy similar en ambas D.O.s, mientras que la producción de acético es claramente superior en las cepas de la D.O. Terra Alta. De todas maneras, probablemente esta mayor concentración de ácido acético se debe al mayor contenido de azúcares en el medio, ya que se ha descrito que la concentración de ácido acético producido depende de la concentración de azúcar en el medio y que es independiente de la cantidad que sea fermentada (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). El ácido succínico y el acetaldehído, por su parte, tienen evoluciones contrapuestas, mientras la concentración de ácido succínico en las cepas de la D.O. Terra Alta es mayor entre 15-25°C y menor a las temperaturas más elevadas con respecto a las cepas de la D.O. Priorat, la producción de acetaldehído sigue la tendencia contraria.

Por tanto, la temperatura de fermentación tiene un gran efecto tanto en las cepas de *Saccharomyces* que pueden llevar a cabo la fermentación, como en el producto final que se va a obtener, lo cual explica que la temperatura sea una variable muy importante si se quiere tener un mayor control sobre la fermentación alcohólica.

BIBLIOGRAFÍA

- Bisson, L.F.** (1999) Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 107-119.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. y Kunkee, R.E.** (1996) Principles and practices of winemaking, pp.102-192. Chapman and Hall, New York.
- Casey, G.P., Magnus, C.A. y Ingledew, W.M.** (1984) High gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 639-646.
- Casey, G.P. y Ingledew, W.M.** (1986) Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13, 219-280.
- D'Amore, T. y Stewart, G.** (1987) Ethanol tolerance of yeast. *Enz. Microb. Technol.* 9, 322-330.
- Epifanio, S.I., Gutiérrez, A.R., Santamaría, M.P. y López, R.** (1999) The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 219-224.
- Fleet, G.H. y Heard, G.M.** (1993) Yeasts: growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology.* (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Chur: Switzerland.
- Gao, C. y Fleet, G.H.** (1988) The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata*, and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 405-410.
- Heard, G.M. and Fleet, G.H.** (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 23-28.
- Larue, F., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P.** (1980) Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 808-811.
- Lucero, P., Peñalver, E., Moreno, E. y Lagunas, R.** (2000) Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4456-4461.
- Nagodawithana, T.W., Castellano, C. y Steinkraus, K.H.** (1974) Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. *Appl. Microbiol.* 28, 383-391.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A.** (2000) Handbook of Enology, Volume I: The Microbiology of Wine and Vinifications. Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England.
- Sharf, R. y Margalith, P.** (1983) The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 311-313.
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. y Mas, A.** (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine areas during three consecutive years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 345-352.

CAPÍTULO 5:

PRUEBAS DE SELECCIÓN EN BODEGA

INTRODUCCIÓN

El siguiente paso tras un proceso de selección de levaduras es estudiar su comportamiento en fermentaciones industriales. Esta parte del estudio de selección de una levadura es muy importante, ya que la comercialización final de una cepa va a depender del desarrollo de la fermentación, así como de la composición y calidad del vino obtenido.

Cuando se inocula una cepa de levadura en un mosto en fermentación, ésta ha de competir con la microbiota indígena sobre la que ha de imponerse para que esta práctica sea eficaz. Para identificar las cepas que llevan a cabo las fermentaciones, y por tanto, saber si se ha impuesto la cepa inoculada, se utilizan técnicas de Biología Molecular (Querol *et al.*, 1992a).

Tras los estudios de competencia masiva realizados con las cepas de las D.O.s Priorat y Terra Alta, las cepas seleccionadas se probaron en la Finca Experimental Mas dels Frares (perteneciente a la Facultad de Enología). Las cepas que mejor resultado dieron en estas fermentaciones también se inocularon en bodegas de las Denominaciones de Origen donde fueron aisladas. Los resultados están estructurados siguiendo el orden cronológico en el que se efectuaron las diferentes pruebas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se comentan cuáles fueron los análisis que de forma general se realizaron en todas las campañas. Aquéllos análisis que sean específicos de una campaña se explicarán en dicha campaña.

Las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de la D.O. Priorat se utilizaron para inocular variedades tintas (Garnacha negra o Cabernet Sauvignon), ya que es una zona donde tienen especial relevancia los vinos tintos. Las cepas aisladas de la D.O. Terra Alta se inocularon en variedades blancas (Garnacha Blanca o Macabeo), ya que en este caso se trata de una zona donde los principales productos son los vinos blancos.

Al partir de cultivos en placa para la preparación de los inóculos, se realizaron varios subcultivos para la obtención de un pie de cuba con un tamaño de población adecuado para el volumen que se iba a inocular en cada caso (Figura 1).

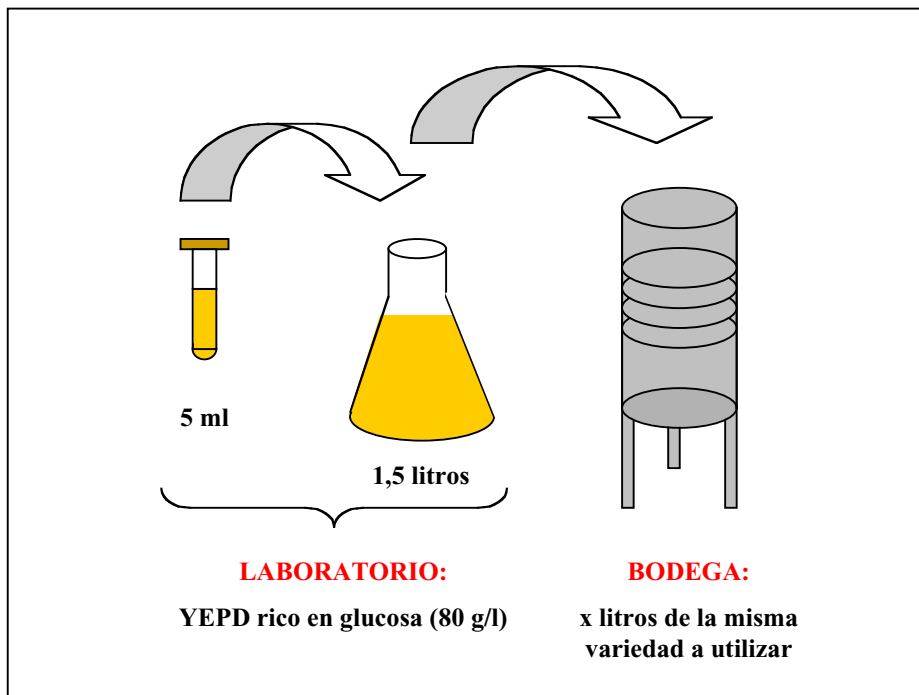


Figura 1. Esquema de los subcultivos necesarios para obtener el tamaño de inóculo adecuado. El tiempo de cada repicado es 24 horas. En bodega, el pie de cuba se realiza, si es posible, con la misma variedad que se va a inocular, y el volumen del inóculo depende del volumen del depósito que se utilice y del crecimiento de la cepa, teniendo en cuenta que se quiere inocular una población inicial de 2×10^6 cel/ml.

Las variables estudiadas en estas fermentaciones fueron:

- La densidad (mediante un densímetro)
- La población por conteo de viables en medio YEPD sólido
- Estudio de las especies de no-*Saccharomyces* por RFLPs del ADN ribosomal (Guillamón *et al.*, 1998)
- Estudio de las cepas de *Saccharomyces* y por tanto, seguimiento de la imposición de la cepa inoculada por RFLPs del ADN mitocondrial (Querol *et al.*, 1992a). Debido a que se trataba de una comprobación de la imposición sólo se analizaron 10 colonias en cada punto

- Análisis químicos básicos:
 - Etanol por ebuliometría (García Barceló, 1990)
 - Glicerol, acetaldehído y ácidos acético y succínico por métodos enzimáticos (Boehringer Mannheim, Alemania)
- Análisis organoléptico: cata con expertos

1. CAMPAÑA 1997

Debido a la proximidad de la campaña y a la posibilidad que proporciona la disponibilidad de una bodega experimental (Finca Mas dels Frares), se planificaron las primeras inoculaciones en bodega ya en esta vendimia. Como no fue posible disponer de todos los resultados de la selección masiva por competencia, se utilizaron únicamente los resultados de final de fermentación a 25°C, tanto para la elección de las cepas de la D.O. Priorat como de la D.O. Terra Alta que se iban a inocular.

1.1. INOCULACIÓN DE CEPAS DE *S. cerevisiae* AISLADAS EN LA D.O. PRIORAT

MATERIALES Y MÉTODOS

La variedad utilizada fue el Cabernet Sauvignon.

Las cepas seleccionadas para esta primera prueba en bodega fueron dos de las mayoritarias en las fermentaciones masivas a 25°C (P08 y P29). El volumen del depósito era 200 litros y el del inóculo (pie de cuba) 40 litros. La población inicial en los depósitos inoculados con las cepas P08 y P29 fue $1,8 \times 10^6$ ufc/ml y $3,1 \times 10^6$ ufc/ml, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo de la fermentación alcohólica fue muy similar para ambas cepas en lo que respecta a la velocidad de consumo de los azúcares (8 días), pero no en la tasa de crecimiento de las levaduras (Figura 2). La cepa P29 alcanzó niveles de población superiores que la cepa P08. Estas diferencias no pueden ser atribuidas a la mayor población inicial de P29, ya que en T=1 día, las poblaciones en ambas fermentaciones se igualaron. Por tanto, estas bajas poblaciones alcanzadas por la cepa P08 podían ser debidas a que las condiciones de fermentación utilizadas no fueran las idóneas para el desarrollo de esta cepa, aunque esto no le supuso ningún problema

durante el proceso. Ambas cepas presentaron una fase estacionaria corta, empezando su fase de declive ya al tercer día. La temperatura de fermentación se mantuvo entre 23-26°C durante todo el proceso

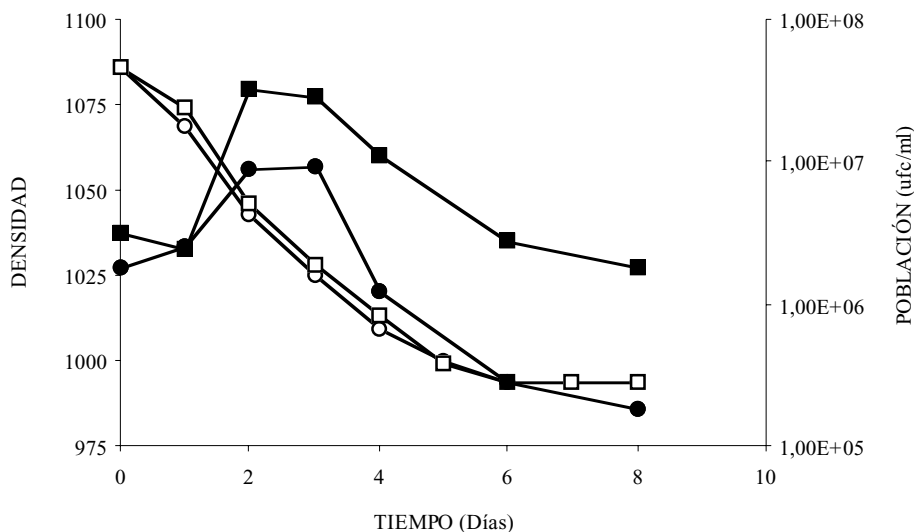


Figura 2. Evolución de la densidad y la población viable de las fermentaciones inoculadas con las cepas P08 y P29.

Y Densidad P08, o Densidad P29, λ Población viable P08, v Población viable P29

El análisis poblacional mostró la presencia de algunas cepas de no-*Saccharomyces* durante los primeros días de fermentación, principalmente de *Candida stellata*, pero a partir del segundo día, la imposición de las cepas inoculadas en ambos casos fue total (Figura 3). La aparición de especies de no-*Saccharomyces* durante los primeros días de fermentación era normal ya que éstas son los principales microorganismos en la superficie de la uva (Martini *et al.*, 1996; Constantí *et al.*, 1997). Además, en un estudio ecológico realizado en esta bodega durante 6 campañas consecutivas (1995-2000), se evidenció que las especies mayoritarias de no-*Saccharomyces* en esta bodega son *Candida stellata* y *Hanseniapora uvarum* (Beltran *et al.*, 2002).

En los vinos resultantes, se analizó el grado alcohólico, glicerol, acetaldehído y ácidos succínico y acético (Tabla 1). No se encontraron diferencias importantes entre los dos vinos. Aún

así, el mosto fermentado con la cepa P29 presentaba a final de fermentación una mayor cantidad de glicerol, ácido succínico y acetaldehído y menor de ácido acético. El grado alcohólico era muy similar.

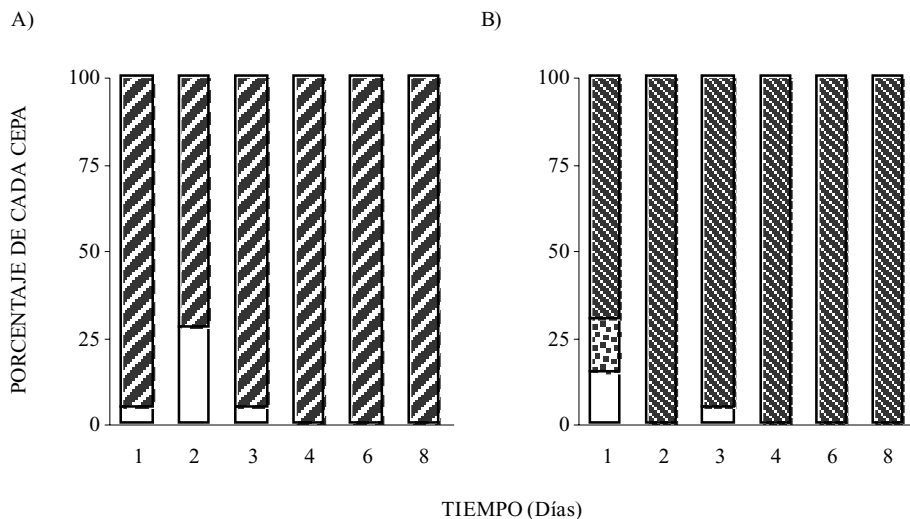


Figura 3. Seguimiento de la microbiota de levaduras presente a lo largo de la fermentación alcohólica. A) Fermentación inoculada con la cepa P08; B) Fermentación inoculada con la cepa P29.

□ *Candida stellata*, ▣ *Hanseniaspora uvarum*, ▨ P08, ▩ P29

Tabla 1. Resultados analíticos de los vinos fermentados con las cepas P08 y P29.

Concentración (g/l)	P08	P29
Etanol (% v/v)	11,22	11,15
Glicerol	6,05	6,87
Ácido succínico	0,98	1,09
Ácido acético	0,53	0,42
Acetaldehído	0,13	0,17

Además de los análisis químicos, también se realizó una cata con expertos para ver si los vinos mostraban diferencias organolépticas (Tabla 2).

El número de catadores fue 17 y las preguntas que se plantearon en el panel de cata fueron las siguientes:

1.- ¿Hay diferencias entre los vinos?	Sí - No
2.- ¿Cuál es el más agradable en nariz?	1 - 2
3.- ¿Cuál es el más aromático?	1 - 2
4.- ¿Cuál es el más equilibrado?	1 - 2
5.- ¿Cuál prefieres?	1 - 2

Con los resultados obtenidos se hizo un estudio estadístico (Aenor, 1997):

Probabilidad	Límite de confianza
95 %	$X_1 = (N+1)/2 + 0,82 \sqrt{N} - 0,4$
99 %	$X_2 = (N+1)/2 + 1,16 \sqrt{N} - 0,4$
99,9 %	$X_3 = (N+1)/2 + 1,56 \sqrt{N} - 0,2$

En nuestro caso, como N=17

95%	----->	$X_1 = 12$
99%	----->	$X_2 = 13,4$
99,9%	----->	$X_3 = 15,2$

Tabla 2. Resultados de la cata de los vinos de Cabernet Sauvignon inoculados con las cepas P08 y P29. Vino 1: vino obtenido con la cepa P08; Vino 2: vino obtenido con la cepa P29, NS: No sabe.

Pregunta			
1.- ¿Hay diferencias entre los vinos?	Sí: 14	No: 3	NS: 0
2.- ¿Cuál es el más agradable en nariz?	Vino 1: 9	Vino 2: 6	NS: 2
3.- ¿Cuál es el más aromático?	Vino 1: 12	Vino 2: 2	NS: 3
4.- ¿Cuál es el más equilibrado?	Vino 1: 8	Vino 2: 6	NS: 3
5.- ¿Cuál prefieres?	Vino 1: 8	Vino 2: 4	NS: 5

Tras los cálculos estadísticos, se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

Los vinos 1 y 2 eran diferentes con una probabilidad del 99%. En las preguntas 2, 4 y 5 no habían diferencias significativas mientras que en la 3, el vino 1 (cepa P08) era más aromático con una probabilidad del 95%.

Aunque con el análisis estadístico no había diferencias significativas en la preferencia de los catadores por los vinos, observando los datos, el doble de catadores eligió el vino 1 (Pregunta 5). Los resultados de la cata y de los análisis químicos confirman que la cepa de *Saccharomyces* tiene influencia en el vino final obtenido (Vezinhet y Pineau, 1990; Fleet y Heard, 1993), ya que en este caso, se han encontrado algunas diferencias significativas entre los vinos y la única diferencia entre ambas fermentaciones radicaba en la cepa utilizada.

1.2. INOCULACIÓN DE CEPAS DE *S. cerevisiae* AISLADAS EN LA D.O. TERRA ALTA

MATERIALES Y MÉTODOS

La variedad utilizada fue la Garnacha Blanca.

Las cepas seleccionadas fueron TA02 y TA10. La cepa TA02 era una de las mayoritarias en las fermentaciones a 25°C, mientras que la cepa TA10 era una de las minoritarias. La elección de una cepa minoritaria tenía como objetivo comprobar si podía imponerse en una fermentación en bodega. Las cepas se inocularon tras un desfangado estático de 24 horas. La población inicial en los depósitos tras la inoculación de las cepas TA02 y TA10 era de $1,6 \times 10^7$ y $1,1 \times 10^7$ ufc/ml, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ambas levaduras necesitaron el mismo tiempo para consumir todos los azúcares fermentables (12 días), aunque la tasa de crecimiento fue algo superior para la cepa TA02 (Figura 4). Las fermentaciones presentaron una fase estacionaria larga, prácticamente sin fase de declive, manteniendo un tamaño poblacional elevado a lo largo de toda el proceso, cosa que no ocurría con las cepas de la D.O. Priorat donde las fermentaciones exhibían una fase de declive pronunciada. La temperatura de fermentación no superó los 23°C en la fermentación con TA02, pero en cambio llegó a 25°C con la cepa TA10.

En ambas fermentaciones se impuso de forma rápida la cepa inoculada (Figura 5). La presencia de no-*Saccharomyces* se redujo a pequeños porcentajes de cepas de *Candida stellata* en diversas fases del proceso. Esta mínima contribución a la fermentación de las especies de

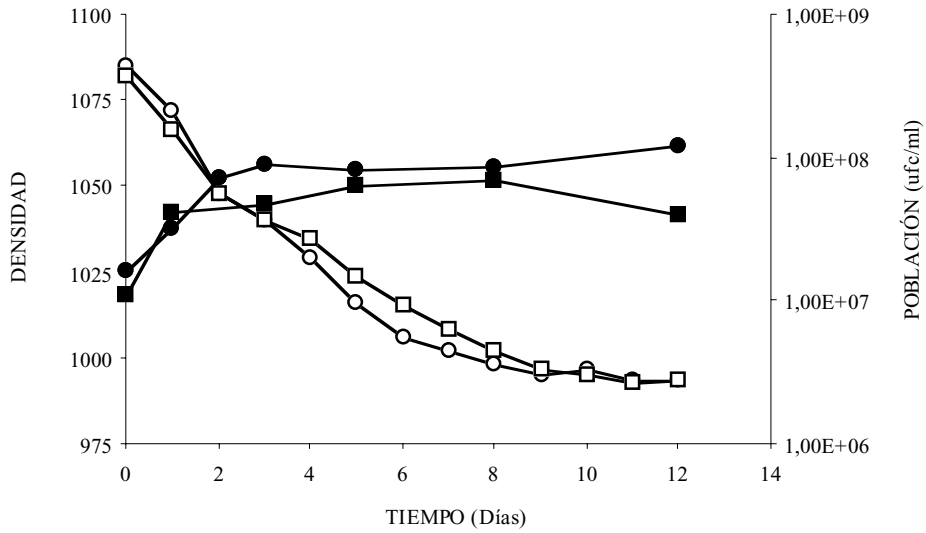


Figura 4. Evolución de la densidad y población viable de las fermentaciones inoculadas con las cepas TA02 y TA10.

Y Densidad TA02, o Densidad TA10, λ Población viable TA02, v Población viable TA10

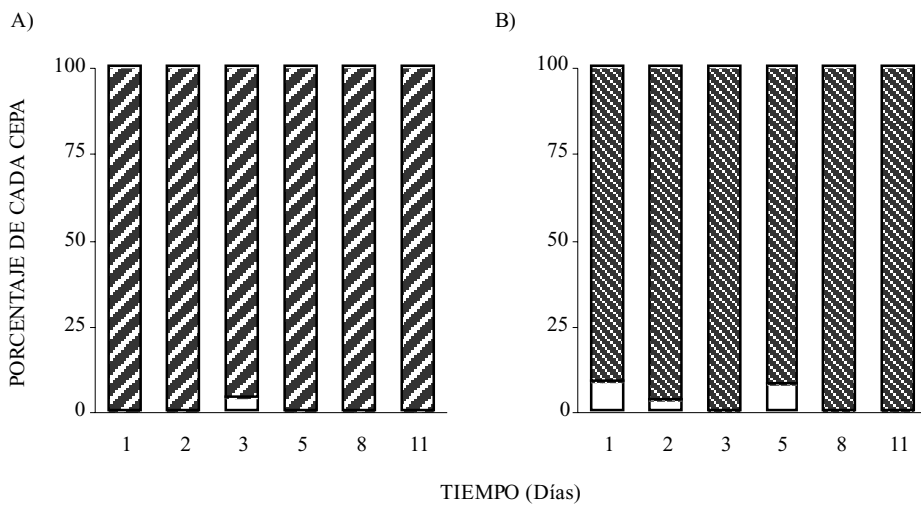


Figura 5. Seguimiento de la imposición de las cepas inoculadas durante la fermentación alcohólica. A) Fermentación inoculada con la cepa TA02; B) Fermentación inoculada con la cepa TA10.

□ *Candida stellata*, ▨ TA02, ▩ TA10

no-*Saccharomyces* se debe al desfangado que se realiza justo antes de la inoculación, que elimina la mayor parte de las levaduras autóctonas, tanto *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces*. Por tanto, el pequeño porcentaje de levaduras que queda es rápidamente contrarrestado por la cepa inoculada.

El hecho de que la cepa TA10 se haya impuesto en esta fermentación en bodega cuando en las fermentaciones masivas en laboratorio a 25°C era una de las minoritarias puede explicarse por varios motivos: (i) su menor tasa de crecimiento podía ser un problema en su detección en las fermentaciones masivas, (ii) la elevada tasa de población inoculada (10^7 ufc/ml), lo que puede favorecer su imposición, y (iii) su menor desarrollo en condiciones de competencia por los nutrientes frente a cepas con una mejor capacidad fermentativa. Aunque en estas fermentaciones también estaba en competencia con otras cepas, la población inicial inoculada de esta cepa en el depósito era muy superior a la de cualquier otra cepa autóctona (después del desfangado), cosa que no ocurría en las fermentaciones de laboratorio donde los inóculos iniciales de todas las cepas eran iguales.

A los vinos obtenidos se les realizaron una serie de análisis básicos (Tabla 3). El vino fermentado con la cepa TA02 presentaba un mayor grado alcohólico, casi medio grado más, y una mayor concentración de glicerol y ácido succínico. Los niveles de acetaldehído y ácido acético eran prácticamente idénticos.

Tabla 3. Resultados analíticos de los vinos fermentados con las cepas TA02 y TA10.

Concentración (g/l)	TA02	TA10
Etanol (% v/v)	12,65	12,24
Glicerol	7,69	7,32
Ácido succínico	1,07	0,76
Ácido acético	0,24	0,26
Acetaldehído	0,18	0,17

Al igual que con los vinos inoculados con las cepas de la D.O. Priorat, se realizó una cata con expertos. Las preguntas y los cálculos estadísticos realizados fueron los mismos que para las cepas de la D.O. Priorat, por lo que aquí sólo se expondrán los resultados.

Con estos resultados (Tabla 4) y después de realizado el estudio estadístico correspondiente, se puede decir que los vinos 1 y 2 eran diferentes con una probabilidad de 99,9%, mientras que en las restantes 4 preguntas no habían diferencias significativas. Es decir, todos los

catadores encontraban diferencias entre los dos vinos, pero no había unanimidad sobre cuál era mejor, ya que la mitad se decantaba por uno y la otra mitad por el otro.

Tabla 4. Resultados de la cata de los vinos de Garnacha Blanca inoculados con las cepas TA02 y TA10. Vino 1: vino fermentado con la cepa TA02; Vino 2: vino fermentado con la cepa TA10, NS: No sabe.

Pregunta			
1.- ¿Hay diferencias entre los vinos?	Sí: 17	No: 0	NS: 0
2.- ¿Cuál es el más agradable en nariz?	Vino 1: 9	Vino 2: 7	NS: 1
3.- ¿Cuál es el más aromático?	Vino 1: 9	Vino 2: 7	NS: 1
4.- ¿Cuál es el más equilibrado?	Vino 1: 8	Vino 2: 9	NS: 0
5.- ¿Cuál prefieres?	Vino 1: 8	Vino 2: 9	NS: 0

Estos resultados vuelven a confirmar que las características y calidad del vino están claramente influenciados por la cepa de levadura que realiza la fermentación.

2. CAMPAÑA 1998

Tras las pruebas realizadas en la campaña anterior, y con todos los resultados de la competencia masiva llevada a cabo en el laboratorio, se plantearon unas nuevas experimentaciones para esta campaña. Las cepas se probaron previamente en el laboratorio con mosto de uva blanca concentrado, que se diluyó a diferentes concentraciones de azúcar (12-14%). Las fermentaciones acabaron correctamente y las cepas inoculadas se impusieron, por lo que, el siguiente paso era probarlas de nuevo en bodega.

2.1. INOCULACIÓN DE CEPAS DE *S. cerevisiae* AISLADAS EN LA D.O. PRIORAT

2.1.1. PRUEBAS EN LA FINCA EXPERIMENTAL DEL MAS DELS FRARES (D.O. TARRAGONA)

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta campaña se realizó el seguimiento de 6 depósitos de Cabernet Sauvignon (5 de 60 litros y 1 de 600 litros). El depósito de mayor tamaño se usó para comprobar si el volumen afectaba a la imposición o composición y calidad del vino final.

Para estas pruebas se seleccionaron 5 cepas: P04, P07, P08, P10 y P29. Todas las cepas elegidas excepto la cepa P10 eran de las mayoritarias en el estudio de competencia realizado en el laboratorio. La cepa P29, además de en el depósito pequeño como el resto de las cepas, se inoculó en el depósito de 600 litros. La preparación de los inóculos se realizó tal y como se ha explicado en la Figura 1. Para los depósitos pequeños, el último subcultivo no fue necesario. La población inicial en cada uno de los depósitos pequeños fue:

P04: $0,6 \times 10^6$ ufc/ml; **P07:** $1,3 \times 10^6$ ufc/ml; **P08:** $0,6 \times 10^6$ ufc/ml; **P10:** $1,4 \times 10^6$ ufc/ml;
P29: $0,6 \times 10^6$ ufc/ml.

Análisis químicos adicionales realizados:

- Acidez total (Ough y Amerine, 1987) y volátil (García Barceló, 1990) por valoración con NaOH.
- Duración de la Fermentación Maloláctica por análisis del ácido málico mediante método enzimático (Boehringer Mannheim)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las fermentaciones se desarrollaron de forma rápida (10 días). La cinética de fermentación fue muy similar entre ellas, siendo la cepa P10, la que inicialmente consumía más lentamente los azúcares, aunque finalizó en el mismo tiempo que el resto (Figura 6).

En la tasa de crecimiento, las diferencias fueron mayores (Figura 7). La cepa P29 fue la que alcanzó una población máxima más elevada, 10^8 ufc/ml, a pesar de que, junto con las cepas P04 y P08, era la que presentaba una población inicial menor, confirmando que se trata de una cepa que en estas condiciones tiene un crecimiento rápido, tal y como ya se apreció en la campaña anterior. De hecho, en el estudio de competencia realizado en el laboratorio, ésta era la cepa mayoritaria a temperaturas elevadas (25-30°C). En la situación opuesta se encuentra la cepa P10, una de las minoritarias en las fermentaciones en laboratorio, que a pesar de partir de la mayor población inicial, presenta una población máxima inferior.

La cinética de fermentación de la cepa P29 en el depósito de 600 litros fue muy similar al del depósito de 60 litros, con una duración y una evolución de la población prácticamente idéntica.

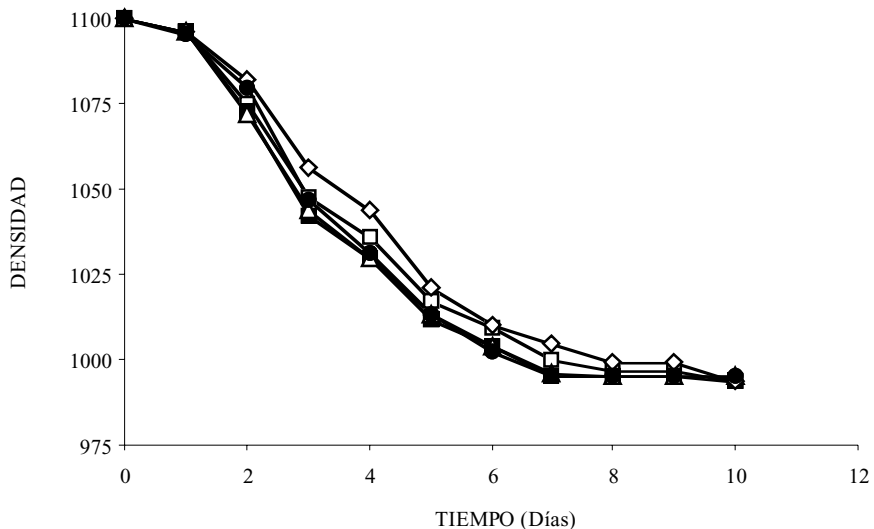


Figura 6. Evolución de la densidad a lo largo de las fermentaciones alcohólicas inoculadas con las 5 cepas de la D.O. Priorat (depósitos de 60 litros).

o P04, v P07, Δ P08, ◇ P10, λ P29

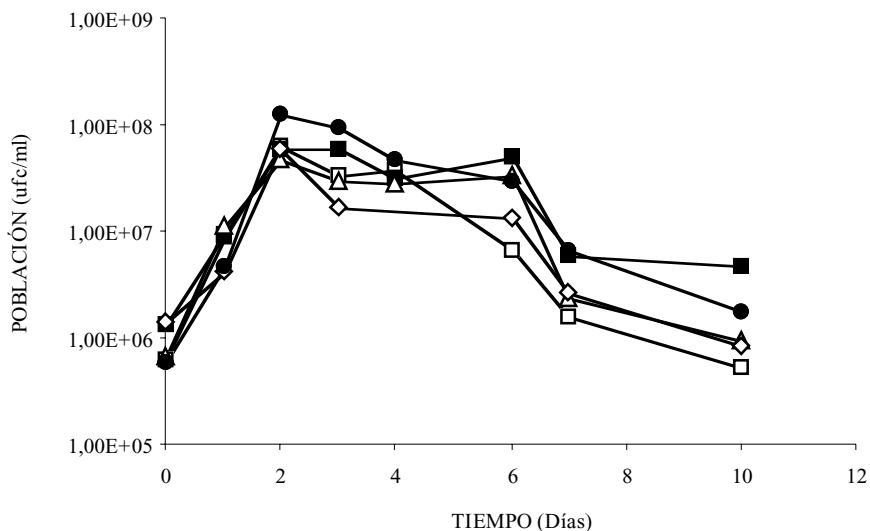


Figura 7. Evolución de la población viable a lo largo de las fermentaciones alcohólicas realizadas con las 5 cepas de la D.O. Priorat en depósitos de 60 litros.

o P04, v P07, Δ P08, ◇ P10, λ P29

La imposición de todas las cepas inoculadas fue total a final de fermentación, incluso en el caso de la cepa P10 que era minoritaria en las experiencias en laboratorio (Tabla 5). Los motivos de la imposición de esta cepa (P10) son similares a los explicados para la cepa TA10 en la campaña anterior. Por su parte, al inicio de fermentación, en algunos depósitos, se identificaron pequeños porcentajes de cepas de no-*Saccharomyces* (*Candida stellata* y *Hanseniaspora uvarum*). El hecho de que no en todos los depósitos se aislaron cepas de no-*Saccharomyces* (aunque se parta de la misma materia prima) pudo ser debido tanto a un problema de muestreo como a una imposición más rápida de algunas de las cepas inoculadas.

Tabla 5. Resultados del seguimiento mediante técnicas de Biología Molecular de las levaduras que llevaron a cabo las fermentaciones alcohólicas (T=1 Inicio de fermentación; T=10 Final de fermentación)

Depósito inoculado con P04:	T=1	100% P04
	T=10	100% P04
Depósito inoculado con P07:	T=1	7,7% <i>Candida stellata</i> 92,3% P07
	T=10	100% P07
Depósito inoculado con P08:	T=1	100% P08
	T=10	100% P08
Depósito inoculado con P10:	T=1	3,8% <i>Hanseniaspora uvarum</i> 96,2% P10
	T=10	100% P10
Depósito inoculado con P29:	T=1	19,2% <i>Candida stellata</i> 7,7% <i>Hanseniaspora uvarum</i> 73,1% P29
	T=10	100% P29
Depósito grande inoculado con P29:	T=1	100% P29
	T=10	100% P29

En ninguno de los depósitos estudiados se detectó la presencia de otras cepas de *S. cerevisiae*. Aunque las cepas de *S. cerevisiae* se cree que se encuentran principalmente en el ambiente de bodega (Martini, 1993; Fleet y Heard, 1993; Vaughan-Martini y Martini, 1995), donde las mejor adaptadas permanecen a lo largo de las campañas, la presencia de elevados porcentajes de cepas autóctonas durante una fermentación inoculada suele ser síntoma de que la cepa inoculada tiene problemas de fermentación, ya que la población inicial del inóculo es muy superior a la de las cepas autóctonas.

Los análisis realizados a estos vinos fueron: pH, grado alcohólico, acidez total y volátil y la duración de la fermentación maloláctica (Tabla 6). La cepa de *S. cerevisiae* que lleva a cabo la fermentación alcohólica se cree que condiciona la posterior fermentación maloláctica (Reguant, 2001). La fermentación maloláctica es un proceso que suele iniciarse una vez ha acabado la fermentación alcohólica y consiste en la transformación del ácido málico en ácido láctico. Esta reacción en el vino la realizan las bacterias lácticas, siendo la principal especie *Oenococcus oeni*. La fermentación maloláctica supone un descenso de la acidez y por tanto, un aumento del pH del vino. El seguimiento de esta fermentación consiste en analizar la concentración de ácido málico a lo largo del proceso, considerándose acabada cuando ésta sea cero.

Tabla 6. Análisis químicos de los vinos fermentados con las cepas de la D.O. Priorat.

	pH	Etanol (%, v/v)	Acidez Total (g/l Ac. Tart.)	Acidez volátil (g/l Ac. Acét.)	Días en finalizar la FML^a
P04	3,49	12,91	7,65	0,29	59
P07	3,65	13,04	6,30	0,42	24
P08	3,59	12,97	6,94	0,48	39
P10	3,58	12,80	6,53	0,33	26
P29	3,63	12,42	6,38	0,44	26
P29g	3,96	12,95	5,51	0,44	11

^a FML: Fermentación maloláctica espontánea

Todos los análisis se realizaron al final de la fermentación alcohólica. El grado alcohólico de los vinos oscilaba entre 12 y 13%, siendo la cepa P07 la que producía la mayor cantidad de etanol. La acidez total de la mayoría de los vinos estaba alrededor de 6,5, mientras que la acidez volátil oscilaba entre 0,3 y 0,5, siendo máxima en el vino fermentado con la cepa P08.

Como se ha descrito, la duración de la fermentación maloláctica estaba condicionada por la cepa de *S. cerevisiae* que realizaba la fermentación alcohólica. Esto es consecuencia de la diferente composición del medio tras fermentaciones con levaduras distintas: (i) mayor o menor producción o consumo de sustancias beneficiosas o perjudiciales para las bacterias lácticas, (ii) capacidad de autólisis de las diferentes levaduras y (iii) diferencias en el pH final del medio tras fermentaciones alcohólicas con distintas levaduras. De hecho, el desarrollo de las bacterias lácticas está afectado por numerosas variables como el etanol, acidez total, temperatura, aireación o sulfitación (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

La máxima duración de la fermentación maloláctica tuvo lugar tras la fermentación alcohólica llevada a cabo por la cepa P04, mientras que fue mínima en el depósito grande inoculado con la cepa P29, es decir, que la fermentación maloláctica parecía influenciada por el tamaño del depósito (Tabla 6). De todas maneras, las diferencias en la duración de la fermentación maloláctica entre los dos depósitos donde la fermentación alcohólica la realizó la cepa P29 posiblemente se debían más a que las condiciones en las que se desarrollaron las bacterias lácticas eran diferentes (menor acidez y mayor contenido de etanol en el depósito grande) que al propio volumen. Así, el volumen del depósito pudo condicionar el desarrollo de la fermentación alcohólica, ya que en nuestra bodega experimental, los remontajes necesarios para la aireación y extracción de color de los mostos durante la vinificación en tinto, se realizan de forma automatizada cuando se trata de depósitos grandes, mientras que son manuales en depósitos pequeños y por tanto, una mayor extracción de nutrientes y una oxigenación más uniforme se produce en los depósitos grandes, lo que puede beneficiar el desarrollo de las levaduras, e incluso de las bacterias lácticas.

Con estos vinos también se hizo una cata con expertos. En esta ocasión no se hizo un cuestionario, sino que fue una cata comentada.

El orden de preferencia establecido por los catadores según la calidad de los vinos obtenidos fue:

- | |
|--|
| <p>1º Vino inoculado con la cepa P08
2º Vino inoculado con la cepa P29
3º Vino inoculado con la cepa P07</p> |
|--|

2.1.2. PRUEBAS EN BODEGAS DE LA D.O. PRIORAT

Dos de las cepas utilizadas en nuestra Finca Experimental también se inocularon en dos bodegas de la zona de Priorat, para observar su desarrollo en sus hábitats naturales.

Las cepas elegidas fueron P08 y P29, que ya habían sido utilizadas durante dos campañas en nuestra bodega experimental con un buen resultado.

BODEGA JAUME SABATÉ (VILELLA BAIXA)

MATERIALES Y MÉTODOS

Las variedades utilizadas fueron Garnacha Negra y Cariñena. Las fermentaciones se llevaron a cabo en dos depósitos de 5000 litros: uno inoculado con la cepa P29 y el otro con una cepa comercial de *S. cerevisiae* Enoferm M2 (Lallemand, que servía de control). El inóculo de la cepa P29 se preparó a partir del cultivo de laboratorio (ver Figura 1), mientras que la inoculación de la cepa comercial fue a partir de levadura seca activa (LSA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ambas fermentaciones presentaron una duración similar (18 días). La población viable en ambas fermentaciones fue máxima al tercer día de fermentación, aunque los niveles alcanzados fueron superiores para la cepa P29 ($7,3 \times 10^7$ ufc/ml frente a $4,9 \times 10^7$ ufc/ml en el depósito inoculado con Enoferm M2). A partir de este día, empezó una lenta fase de declive, detectándose a final de fermentación poblaciones elevadas en ambas fermentaciones ($\approx 5 \times 10^6$ ufc/ml). Las temperaturas máximas alcanzadas en las fermentaciones con las cepas P29 y Enoferm M2 fueron 27°C y 25°C, respectivamente.

La cepa P29 se impuso totalmente a final de fermentación, cosa que no ocurría al inicio (Tabla 7). La falta de imposición de la cepa el primer día de fermentación probablemente se debió a que el llenado del depósito se realizó en dos días y la cepa se inoculó una vez el depósito estuvo lleno. Durante las horas que duró el proceso de llenado, la fermentación alcohólica empezó con las cepas autóctonas (aunque esto no se viera reflejado en la densidad por la adición continua de mosto), por lo que la cepa P29 necesitó más de un día para imponerse. Por lo tanto, esta fermentación sirvió para corroborar que esta cepa era capaz de imponerse sobre las cepas

autóctonas a pesar de que éstas ya estaban en pleno crecimiento. Esta imposición posiblemente se vio beneficiada por el hecho de que se trataba de una cepa aislada en esa D.O.

Tabla 7. Resultados del seguimiento mediante técnicas de Biología Molecular de las levaduras que realizaron las fermentaciones alcohólicas (T=1, Inicio de fermentación; T=18, Final de fermentación)

Depósito inoculado con P29:	
T=1	20% P29 80% Otras cepas de <i>Saccharomyces</i>
T=18	100% P29
Depósito inoculado con ENOFERM M2:	
T=1	50% P29 50% Enoferm M2
T=18	90% P29 10% Enoferm M2

Por lo que respecta al depósito inoculado con la cepa Enoferm M2, esta cepa nunca logró imponerse totalmente. A final de fermentación la cepa mayoritaria era P29 con un 90%. La imposición de la cepa P29 sobre Enoferm M2 puede deberse a varios motivos: (i) mejor adaptación de la cepa por haber sido seleccionada en la zona (Martini y Vaughan-Martini, 1990), (ii) el hecho de que el depósito fermentado con la cepa P29 se llenara y por tanto, se inoculara un día antes junto con la utilización del mismo material de bodega (manguera, bomba, etc.) pudo beneficiar la denominada "contaminación cruzada" entre depósitos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Beltran *et al.*, 2002).

Tabla 8. Análisis de los vinos de la Bodega Jaume Sabaté

	pH	Etanol (%, v/v)	Acidez Total (g/l Ac. Tart.)	Acidez volátil (g/l Ac. Acét.)
P29	3,55	15,51	6,19	0,35
Enoferm M2	3,69	15,67	5,48	0,40

Ambos vinos presentaban características muy similares, destacando el elevado grado alcohólico, típico de la D.O. Priorat (Tabla 8). La similitud entre los vinos era lógica ya que prácticamente las dos fermentaciones habían sido realizadas con la misma cepa (P29). Por tanto, las pequeñas diferencias existentes entre los vinos podían deberse a la propia variación del método analítico o a la contribución de otras cepas principalmente al inicio de fermentación (las cepas autóctonas, aunque no hayan sido detectadas y la cepa Enoferm M2) así como a las diferencias en la materia prima. De hecho, un estudio realizado por Querol *et al.* (1992b) ha demostrado que la rápida imposición de la levadura seca activa reduce el número de cepas de *Saccharomyces* autóctonas pero no las elimina totalmente durante los primeros días de fermentación, con lo que todavía pueden tener un importante efecto en el aroma y características del vino.

BODEGA CLOS MOGADOR (GRATALLOPS)

La cepa que se inoculó fue la P08 y la variedad utilizada el Pinot Noir. La fermentación acabó sin ningún problema y hubo una imposición total de la cepa inoculada.

2.2. INOCULACIÓN DE CEPAS DE *S. cerevisiae* AISLADAS EN LA D.O. TERRA ALTA

2.2.1. PRUEBAS EN LA FINCA EXPERIMENTAL DEL MAS DELS FRARES (D.O. TARRAGONA)

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta campaña se hizo el seguimiento de 6 depósitos de Garnacha Blanca (5 de 60 litros y 1 de 600 litros). El motivo para utilizar un depósito grande, como ya se explicó en la experiencia con cepas de la D.O. Priorat era comprobar la importancia del volumen del depósito en el desarrollo de la fermentación alcohólica.

De los 5 depósitos pequeños, 4 se inocularon con una única cepa (TA02; TA07; TA13; TA19), y en uno se preparó un inóculo mixto (TA02, TA07, TA09, TA13 y TA19), para comprobar si la fermentación experimentaba alguna mejora en su desarrollo o producto. En el depósito de 600 litros se inoculó la cepa TA02. La preparación de los inóculos se realizó tal y como se explicó en la Figura 1. Para los depósitos pequeños, el último subcultivo no fue necesario.

La población inicial de los depósitos inoculados de forma individual fue:

TA02: $2,0 \times 10^6$ ufc/ml; **TA07:** $2,8 \times 10^6$ ufc/ml; **TA13:** $0,3 \times 10^6$ ufc/ml; **TA19:** $2,2 \times 10^6$ ufc/ml

La población de cada cepa en el inóculo mixto fue:

TA02: $4,5 \times 10^5$ cel/ml; **TA07:** $0,7 \times 10^5$ cel/ml; **TA09:** 13×10^5 cel/ml; **TA13:** $5,7 \times 10^5$ cel/ml; **TA19:** $4,4 \times 10^5$ cel./ml. Por tanto, la población total inoculada en el depósito era $2,8 \times 10^6$ cel/ml

Análisis químicos adicionales realizados:

- Anhídrido sulfuroso libre y total (García Barceló, 1990) por valoración con KIO_4
- Acidez total por valoración con NaOH (Ough y Amerine, 1987).
- Determinación de las sustancias volátiles por HPLC (Lema *et al.*, 1996)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las fermentaciones fueron muy lentas (Figura 8), aunque las ralentizaciones se produjeron sobre todo en las últimas fases del proceso.

Las fermentaciones más largas fueron aquéllas inoculadas con las cepas TA13 y TA19 que necesitaron 49 días para consumir todos los azúcares. El resto de fermentaciones (TA02, TA07 e inóculo mixto) acabaron en 36 días. En general, fue una campaña en la que hubo problemas de paradas de fermentación en las vinificaciones en blanco.

La población viable fue máxima para las cepas TA02 y TA19 y mínima para la cepa TA13, aunque la población inicial de este inóculo también era menor (Figura 9). De hecho, las fermentaciones llevadas a cabo con las cepas TA13 y TA19 tardaron el mismo tiempo en finalizar a pesar de que la población de la cepa TA19 fue mucho mayor a lo largo de todo el proceso.

La fermentación que se llevó a cabo con la cepa TA02 en el depósito grande, aunque también fue lenta, tardó menos que la misma cepa en el depósito pequeño, siendo la evolución del tamaño de población de ambas muy similar (datos no mostrados).

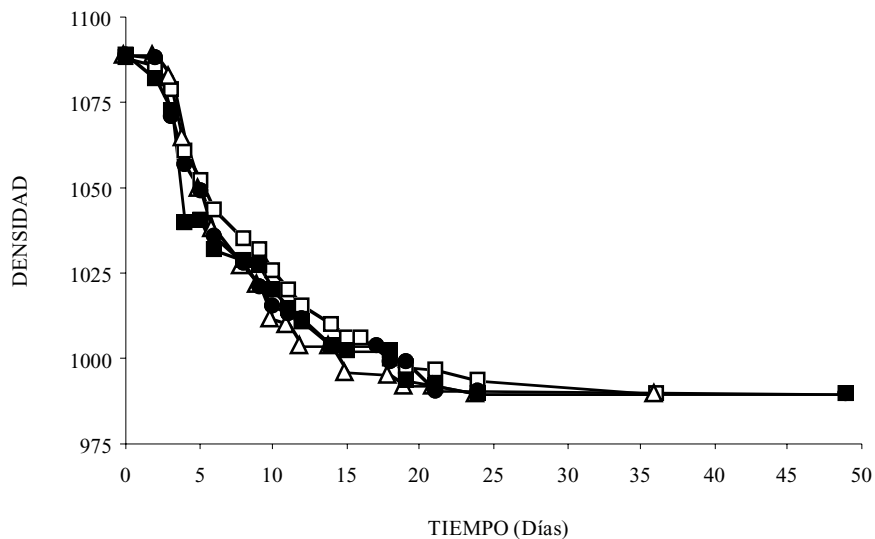


Figura 8. Evolución de la densidad a lo largo de las fermentaciones alcohólicas realizadas con las 4 cepas de la D.O. Terra Alta, que habían sido inoculadas de forma individual (depósitos 60 litros).

○ TA02, △ TA07, ▼ TA13, λ TA19

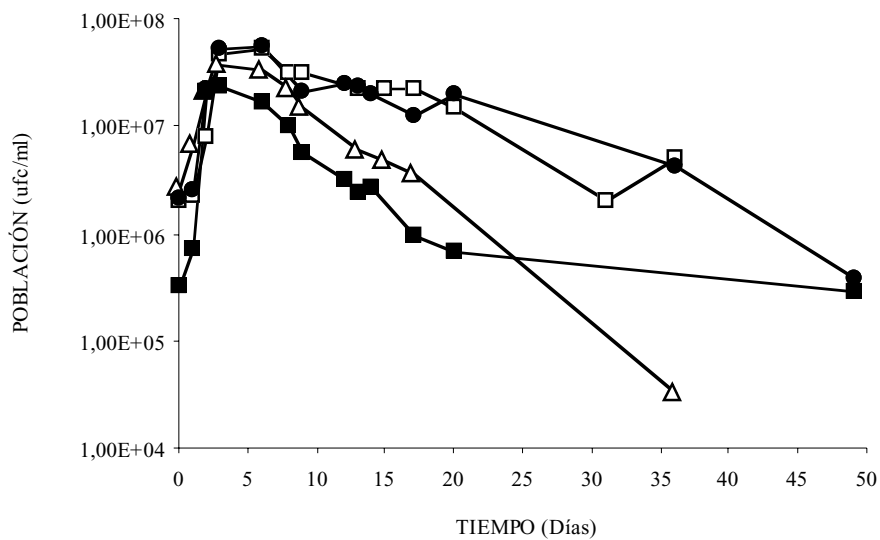


Figura 9. Evolución de la población viable a lo largo de las fermentaciones alcohólicas realizadas con las 4 cepas de la D.O. Terra Alta (depósitos 60 litros).

○ TA02, △ TA07, ▼ TA13, λ TA19

En estas fermentaciones no se estudió la posible contribución de las cepas de no-*Saccharomyces*, ya que al tratarse de vinificaciones en blanco, el desfangado previo facilita la imposición de las cepas inoculadas, al disminuir la población de levaduras autóctonas. De hecho, en estas fermentaciones, la imposición de las cepas inoculadas de forma individual fue total (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados del seguimiento mediante técnicas de Biología Molecular de las levaduras que llevaron a cabo las fermentaciones alcohólicas (T=1, Inicio de fermentación; T=31, 36, 49, Final de fermentación)

Depósito inoculado con TA02:	T=1	100% TA02
	T=36	100% TA02
Depósito inoculado con TA07:	T=1	100% TA07
	T=36	100% TA07
Depósito inoculado con TA13:	T=1	100% TA13
	T=49	100% TA13
Depósito inoculado con TA19:	T=1	100% TA19
	T=49	100% TA19
Depósito grande inoculado con TA02:	T=1	100% TA02
	T=31	100% TA02

En el depósito en el que se había inoculado la mezcla de levaduras, también se realizó un seguimiento para determinar la contribución a la fermentación alcohólica de cada una de las cepas (Tabla 10). Se tomaron dos muestras por punto estudiado (una muestra de la parte inferior del depósito y otra de la parte superior) para tener una visión más completa de lo que estaba sucediendo en el depósito, ya que las cepas pueden tener diferente velocidad de sedimentación (cepas floculantes). Los tiempos estudiados fueron: inicio de fermentación (T=1), mitad de fermentación (T=9) y final de fermentación (T=36). En este último punto, como las cepas ya se

encontraban en plena fase de declive, sólo se tomó muestra de la parte inferior del depósito, porque se supuso que todas las cepas estarían depositadas en el fondo.

Tabla 10. Seguimiento de la presencia de cada una de las cepas del inóculo mixto a lo largo de la fermentación alcohólica.

	T=1		T=9		T=36
	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
TA02	12,5%				17,6%
TA07		10%			
TA09		10%			
TA13	75%	40%	90%	90%	58,8%
TA19	12,5%	40%	10%	10%	23,5%

Aunque inicialmente había diferencias entre las muestras tomadas en la parte superior e inferior del depósito, en la mitad de fermentación la distribución de las cepas era idéntica. Las cepas mayoritarias durante todo el proceso fueron TA13 y TA19, a pesar de que la cepa que presentaba mayor población en el inóculo inicial era TA09. Esto parece indicar que hay cepas que pueden mejorar su rendimiento fermentativo cuando se encuentran en un inóculo mixto, como ocurre con las cepas TA13 y TA19. Estas cepas que cuando fermentaban de forma individual fueron las que tardaron más días en consumir todos los azúcares, eran las cepas mayoritarias en la fermentación mixta, esto puede deberse a que la presencia de otras cepas favorece su desarrollo debido probablemente a la producción de sustancias que le sean beneficiosas.

Los análisis realizados a estos vinos están representados en las Tablas 11 (análisis químicos básicos) y 12 (compuestos volátiles).

El grado alcohólico de todos los vinos era muy similar, entre 12,5 y 13%. Los valores del resto de parámetros estudiados tampoco presentaban claras diferencias. En general, estos vinos tenían niveles de acidez total bajos tratándose de vinos blancos, donde una acidez superior es beneficiosa. El vino fermentado con el inóculo mixto mostraba una analítica muy similar a aquéllos de las cepas individuales. Con respecto al volumen del depósito, prácticamente no había diferencias entre los vinos, al contrario de lo que se observaba en la fermentación con la cepa de la D.O. Priorat (vinificación en tinto). De hecho, como ya se dijo en su momento, estas diferencias detectadas en los vinos fermentados con la cepa de la D.O. Priorat probablemente se debían más al

tratamiento diferente del mosto a lo largo de la fermentación entre los depósitos que al propio volumen.

Tabla 11. Análisis de los vinos obtenidos tras las fermentaciones con cepas de la D.O. Terra Alta.

	Etanol (%, v/v)	Sulfuroso libre/total	pH	Acidez total (g/l Ac. Tart.)	Ác. Acético (g/l)
TA02	12,84	17/78	2,98	4,35	0,49
TA07	12,73	11/79	3,06	3,97	0,35
TA13	12,84	17/96	3,04	4,27	0,31
TA19	12,51	18/85	3,04	4,57	0,49
TA mixta	12,96	14/79	3,02	4,20	0,39
TA02 grande	12,80	16/83	3,08	4,42	0,43

Los compuestos volátiles (alcoholes superiores, ácidos grasos y sus respectivos ésteres) son los principales responsables del aroma del vino, por lo que son de gran importancia en los vinos blancos, tan apreciados por su perfil aromático. La formación de estos compuestos por parte de las levaduras está totalmente ligada a su metabolismo (Lambrechts y Pretorius, 2000).

Los resultados de este estudio confirman que el perfil aromático de un vino depende de la cepa que se haya utilizado en la fermentación.

Los vinos más aromáticos fueron los fermentados con la cepa TA13 o con el inóculo mixto (la cepa TA13 era la mayoritaria en la fermentación del inóculo mixto), mientras que los vinos fermentados con la cepa TA02 presentaban el perfil aromático más pobre (independientemente del volumen del depósito).

Los alcoholes superiores son los compuestos cuantitativamente más importantes en el aroma de los vinos, aunque únicamente el 2-feniletanol proporciona un aroma agradable. En cambio, la mayoría de sus ésteres proporcionan notas aromáticas positivas (Lambrechts y Pretorius, 2000). En estas fermentaciones, el compuesto volátil cuya concentración era más elevada, fue el 2-feniletanol (aroma de rosa), siendo los vinos fermentados con las cepas TA13, TA19 y el inóculo mixto los que presentaron una mayor producción. Entre los ésteres, el lactato de etilo y el acetato de isoamilo (aroma de plátano) fueron los mayoritarios. De hecho, las principales diferencias en los perfiles aromáticos de estos vinos se debían a estos tres compuestos.

Tabla 12. Compuestos volátiles de los vinos fermentados con las cepas de la D.O. Terra Alta (mg/l).

	TA02	TA07	TA13	TA19	TA mixta	TA02 g
Ac. Isoamilo	5,94	6,01	4,76	3,69	3,99	5,27
Ac. Hexilo	0,12	0,17	0,08	0,11	0,19	0,14
Ac. 2-feniletanol	0,17	0,22	0,22	0,15	0,20	0,15
ΣAcetatos	6,23	6,40	5,06	3,95	4,38	5,56
1-Hexanol	0,82	1,03	0,79	0,91	0,89	0,86
2-Feniletanol	24,77	31,33	44,21	43,05	47,91	18,41
ΣAlcoholes	25,59	32,36	45,00	47,91	53,18	19,27
Lactato de etilo	3,65	6,96	10,35	7,10	8,26	6,59
Succinato de dietilo	0,24	0,29	0,57	0,51	0,42	0,28
Total	35,71	46,01	60,98	55,52	61,86	31,70
C4C2	1,52	2,05	2,34	1,03	1,47	1,82
C6C2	0,57	0,61	0,87	0,65	0,86	0,80
C8C2	2,86	2,44	3,87	4,39	3,89	4,82
C10C2	0,11	0,06	0,07	0,36	0,06	0,31
C12C2	0,02	0	0,01	0,02	0,01	0,01
ΣEsteres A.G.	5,08	5,16	7,16	6,45	6,29	7,76
C4	0	0,53	0,37	0	0,65	0
C6	3,32	4,50	6,74	3,82	5,77	4,81
C8	4,61	4,99	6,48	5,82	6,66	6,41
C10	1,34	1,02	1,54	2,45	1,03	1,86
C12	0,05	0	0,17	0,02	0	0,03
ΣA.G.	9,32	11,04	15,30	12,11	14,11	13,11

Los ácidos grasos de cadena media son producidos por las levaduras como intermediarios en la biosíntesis de los ácidos grasos de cadena larga, y junto a sus ésteres, son componentes naturales de las bebidas alcohólicas (Lambrechts y Pretorius, 2000). Estos ácidos grasos pueden actuar como inhibidores de la fermentación alcohólica, aunque su toxicidad depende directamente de su solubilidad, la cual varía según el contenido en etanol del medio (Viegas *et al.*, 1989). De todas maneras, las ralentizaciones de estas fermentaciones no pueden explicarse por estos motivos ya que los niveles hallados no se consideran tóxicos para las levaduras.

En estos vinos, los ácidos grasos y ésteres más relevantes fueron los ácidos hexanoico y octanoico (olor a rancio), y el butanoato y octanoato de etilo (con aromas afrutados y florales). La concentración de estos compuestos variaba dependiendo de la cepa utilizada, siendo la TA13 la más productora. De hecho, se sabe que la concentración y proporción de ácidos grasos de cadena

media que son excretados al medio depende de la cepa de levadura, de la composición del medio y de las condiciones de fermentación (temperatura, pH y aireación), (Lambrechts y Pretorius, 2000).

2.2.2. PRUEBAS EN BODEGAS DE LA D.O. TERRA ALTA

BODEGA BARBARA FORÈS (GANDESA)

En esta bodega se inoculó la cepa TA10, que había sido inoculada la campaña anterior en nuestra bodega experimental. La variedad utilizada fue la Garnacha Blanca y el volumen del depósito 200 litros. El inóculo se preparó a partir de cultivo fresco en el laboratorio.

La fermentación se paró a una densidad de 1010.

Debido a los problemas detectados durante esta campaña con las cepas utilizadas en vinificaciones en blanco (fermentaciones muy lentas e incluso paradas), la selección de una cepa para este tipo de vinificación se pospuso, ya que se requería un estudio más exhaustivo para entender cuáles podían haber sido los causantes de estas ralentizaciones y paradas de fermentación.

3. CAMPAÑA 1999

Tras la cata de los vinos obtenidos con cepas de la D.O. Priorat (con la participación de un representante de la empresa Lallemand), en la que se designó a la cepa P08 como la que proporcionaba unos vinos con un mejor perfil aromático (ya que con el resto de parámetros las tres cepas P08, P29, P07 tenían un perfil adecuado para su selección), esta cepa se envió a la planta piloto de Lallemand en Toulouse (Francia) para hacer las pruebas de secado y viabilidad tras la rehidratación. Como los resultados fueron favorables, se produjeron 300 gramos de la cepa en forma de levadura seca activa (LSA) para las siguientes pruebas en bodega.

De todas maneras, cabe recordar en este punto que durante el estudio ecológico realizado en las Denominaciones de Origen Terra Alta y Priorat (Torija *et al.*, 2001, Capítulo 2) se identificaron algunas cepas que habiéndose aislado en bodegas de D.O.s diferentes, presentaban un perfil de ADN mitocondrial idéntico, con lo que se trataba de la misma cepa. Concretamente éste era el caso de la cepa P08 que también había sido aislada en la D.O. Terra Alta.

D.O. Priorat		D.O. Terra Alta
P08	=	TA20

Por lo tanto, la cepa seleccionada pasó a denominarse PTA08.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las fermentaciones realizadas durante esta campaña no fueron los esperados debido a ciertos problemas con la LSA. Esta cepa que durante el estudio de selección no floculaba, presentaba esta nueva característica tras el proceso de secado o producción. Los procesos de secado suelen implicar la presencia de desecantes que con facilidad promueven la floculación de las levaduras, como sucedió en nuestro caso. Además, al carecer de la cantidad suficiente de LSA para inocular depósitos de gran tamaño, se tuvieron que preparar pies de cuba previos, con los problemas y descenso de efectividad en el uso de las LSA que esto puede conllevar.

Durante esta campaña se hicieron pruebas en diferentes bodegas con resultados dispares:

Bodega experimental Mas dels Frares (D.O. Tarragona):

2 depósitos de Garnacha Negra: Imposición total de la cepa inoculada.

Bodega Barbara Forès (D.O. Terra Alta):

1 depósito de Garnacha Negra: Imposición de un 60%.

Bodega Jaume Sabaté (D.O. Priorat):

1 depósito de Garnacha Negra: No hubo imposición (La preparación de este pie de cuba lo realizó el responsable de la bodega).

4. CAMPAÑA 2000

Para esta campaña ya teníamos a nuestra disposición la cepa PTA08 en forma de LSA, comercializada bajo el nombre RV1.

Así que conjuntamente con la empresa Lallemand, S.A. (y su empresa distribuidora en España, SEPSA), se planificó un estudio para caracterizar mejor la cepa, pero utilizando para ello

una bodega donde se pudieran inocular depósitos de gran volumen. Las pruebas se realizaron en la Cooperativa de Batea (D.O. Terra Alta).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un seguimiento de dos depósitos de 500 Hl de Garnacha negra, cuyo volumen de llenado fue de un 80%. Uno de los depósitos se inoculó con la cepa RV1 y el otro con la cepa comercial de *S. cerevisiae* 2323 (Lallemand, S.A.), que era la que se utilizaba normalmente en esta bodega (control). La dosis de LSA fue 20 g/Hl.

Características del experimento:

Variedad utilizada: Garnacha Negra		
Sanidad e integridad de la uva: Óptima		
Adición de Sulfuroso: 6 g/Hl a la entrada de la uva		
Temperatura del mosto: 28°C		
	<u>RV1</u>	<u>2323</u>
Densidad	1101	1102
Acidez Total (g/l Ác. Tart.)	5,62	4,50
Temperatura de fermentación: 26°C		

Análisis químicos adicionales realizados:

- Anhídrido sulfuroso libre y total (García Barceló, 1990) por valoración con KIO_4
- Acidez total (Ough y Amerine, 1987) y acidez volátil (García Barceló, 1990) por valoración con NaOH
- Estudio de los principales parámetros de color:

Características cromáticas del vino (OIV, 1990):

Medida de las absorbancias a distintas longitudes de onda del vino centrifugado.

A_{420} (componente amarilla); A_{520} (componente roja); A_{620} (componente azul)

Intensidad colorante (IC) = $A_{420} + A_{520} + A_{620}$

Matiz (T) = Importancia relativa del color amarillo = $(A_{420}/A_{520}) \times 100$

Compuestos fenólicos totales (OIV, 1990):

Medida de la absorbancia a 280 nm (A_{280}). Al tratarse de un vino negro se diluyó 1:100.

Análisis de los antocianos totales (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965; ver Anexo 1)

Responsables del color rojo del vino.

Análisis de los taninos totales (Glories, 1978; ver Anexo 1)

Responsables de la astringencia y sabor amargo del vino, así como del color amarillo de los vinos tintos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El arranque de la fermentación alcohólica con la cepa RV1 (8 horas) fue más rápido que con la cepa 2323 (18 horas), aunque la duración de la fermentación fue idéntica en ambas fermentaciones (10 días). No hubo prácticamente formación de espuma.

La tasa de crecimiento de ambas cepas fue limitada, con bajas poblaciones máximas ($2,0 \times 10^7$ ufc/ml y $2,5 \times 10^7$ ufc/ml para las cepas RV1 y 2323, respectivamente).

La posible imposición de las cepas se analizó a principio, mitad y final de fermentación:

La cepa 2323 no se impuso en ningún momento de la fermentación, identificándose ya desde el inicio del proceso 6 cepas diferentes.

La cepa RV1, en cambio, fue la única detectada tanto al inicio como a la mitad de su fermentación. Al final del proceso, la imposición fue de un 67%, ya que se identificó otra cepa de *S. cerevisiae* (33%).

La fermentación con la cepa 2323 es un ejemplo de que no siempre la inoculación garantiza la imposición de la cepa, con lo que a pesar de haber inoculado, en este depósito se realizó una fermentación espontánea.

El vino obtenido con la cepa RV1 presentaba un mayor grado alcohólico y una menor concentración de glicerol y ácido succínico (Tabla 13). También se detectaron bajos niveles de acetaldehído y acidez total. La acidez volátil, por su parte, era similar a la de otras pruebas realizadas con esta cepa, pero algo superior a la obtenida en el vino inoculado, que no fermentado, con la cepa 2323.

Tabla 13. Resultados de los análisis químicos realizados a los vinos de la Cooperativa de Batea

	RV1	2323
Etanol (% v/v)	14,7	14,4
Acidez total (g/l Ác. Tartárico)	3,86	4,84
pH	3,63	3,41
SO₂ libre/total (mg/l)	16/43	21/63
Acidez volátil (g/l de Ác. acético)	0,42	0,35
Glicerol (g/l)	9,4	11,2
Ácido succínico (g/l)	0,54	0,65
Acetaldehído (g/l)	0,02	0,18

Aunque la cepa de levadura se ha descrito que no tiene gran efecto sobre el color de vino, ya que éste depende principalmente de la variedad, hay algunas diferencias entre el color de los vinos obtenidos (Tabla 14). En conjunto, el color del vino del depósito inoculado con la cepa 2323 es mayor, debido principalmente a su componente del color rojo (ésta depende de los antocianos y del pH). De todas maneras, el color que se obtiene en el vino fermentado con la cepa RV1 es muy aceptable, ya que presenta una buena concentración de antocianos, lo que lo convierte en un buen color para un vino joven.

Tabla 14. Análisis del color de los vinos tintos obtenidos.

	RV1	2323
A₄₂₀	2,51	2,84
A₅₂₀	3,88	5,29
A₆₂₀	0,64	0,9
(IC)	7,03	9,03
Matiz	64,7	53,7
A₂₈₀	48,7	51,1
Antocianos totales (mg/l)	388	421
Taninos totales (g/l)	3,51	3,68

Por tanto, como resultado de este trabajo, se seleccionó una cepa, la RV1, adecuada para la elaboración de vinos tintos con un alto grado alcohólico (ver patente y folleto comercial, Anexo 2).

BIBLIOGRAFÍA

- Aenor** (1997) Análisis sensorial. Tomo I: Alimentación. Recopilación de normas UNE, pp. 75-81. Madrid.
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M.T., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N. y Mas, A.** (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentations: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* (aceptado).
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. y Guillamón, J.M.** (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339-344.
- Fleet, G.H. y Heard, G.M.** (1993) Yeast growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology.* (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers: Switzerland.
- García Barceló, J.** (1990) Técnicas analíticas para vinos. (Ed. J. García Barceló), GAB: Barcelona.
- Glories, Y.** (1978) Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Tesis doctoral, Université Bordeaux II, Bordeaux, France.
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. y Querol, A.** (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
- Lambrechts, M.G. y Pretorius, I.S.** (2000). Yeast and its importance to wine aroma - A review. *A. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97-129.
- Lema, C., García-Jares, C., Orriols, I. y Angulo, L.** (1996) Contribution of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 206-216.
- Martini, A. y Vaughan-Martini, A.** (1990) Grape must fermentation: past and present. In: *Yeasts Technology.* (Eds. J.F.T. Spencer y M. Spencer) pp. 105-123, Springer-Verlag: Berlin.
- Martini, A.** (1993) Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* 3, 165-176.
- Martini, A., Ciani, M. y Scorzzetti, G.** (1996) Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 435-440.
- OIV** (1990) Recueil des Méthodes International d'Analyse des Vins et des Moûts. A. Dedon Confecit: Paris.
- Ough, C.S. y Amerine, M.A.** (1987) Methods for analysis of must and wines. Wiley-Interscience Publication: California.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D.** (1992a) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D.** (1992b) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2952.

Reguant, C. (2001) Identificació molecular de soques de *Oenococcus oeni* i efecte de diverses condicions de vinificació sobre la seva dinàmica de poblacions. Tesis doctoral, Univesitat Rovira i Virgili, Tarragona.

Ribéreau-Gayon, P. y Stonestreet, E. (1965) Le dosage des anthocyanes dans les vins rouges. Bull. Soc. Chim. 9, 2649-2652.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A. (2000) Handbook of Enology, vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. y Mas, A. (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine areas during three consecutive years. Antonie van Leeuwenhoek 79, 345-352.

Vaughan-Martini, A. y Martini, A. (1995) Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. J. Ind. Microbiol. 14, 514-522.

Vezinhet, F. y Pineau, J. (1990) La levurage. Progrés Agricole et Viticole 107, 219-221.

Viegas, C.A., Rosa, M.F., Sa-Correia, I. y Novais, J.M. (1989) Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 55, 21-28.

CAPÍTULO 6:

DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de la ecología de microorganismos en fermentaciones industriales es de un gran interés, básico por un lado, ya que nos proporciona un mayor conocimiento de los procesos y aplicado por otro, porque nos puede permitir la selección de microorganismos que posteriormente tengan una aplicación industrial. En zonas como las D.O.s Terra Alta y Priorat, este estudio tiene especial relevancia, al tratarse de dos regiones donde la industria vitivinícola es muy importante y la utilización de iniciadores de fermentación está en su fase de expansión, asociada a la producción de vinos de calidad.

En los mostos se aislaron principalmente cepas de no-*Saccharomyces* con una presencia, en general, mínima de cepas de *Saccharomyces*, confirmando la teoría de que las cepas de *Saccharomyces* son difíciles de aislar en la uva (Martini, 1993; Fleet y Heard, 1993; Vaughan-Martini y Martini, 1995). La especie mayoritaria en ambas Denominaciones (excepto en la D.O. Terra Alta en 1998) fue *Candida stellata*. Aunque se ha descrito que la principal especie de no-*Saccharomyces* en el mosto, y por tanto, en los inicios de la fermentación es *Hanseniastopora uvarum* (Querol *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1991; Fleet y Heard, 1993; Schütz y Gafner, 1994; Constantí *et al.*, 1997; 1998), las condiciones de estas fermentaciones favorecen el crecimiento de *Candida stellata* (mostos ricos en azúcar, altos niveles de SO₂ y falta de control de la temperatura). De hecho, un estudio ecológico realizado recientemente (Beltran *et al.*, 2002) ha demostrado que la predominancia de una especie u otra no depende de la variedad utilizada, mas bien de la añada, pudiendo alternarse la presencia mayoritaria de una u otra a lo largo de las campañas en una misma bodega. La contribución de estas especies a la fermentación alcohólica suele limitarse a los primeros días de fermentación, cuando los niveles de etanol todavía son bajos y las cepas de *Saccharomyces* no están en pleno desarrollo. De todas maneras, en estas fermentaciones se han aislado pequeños porcentajes de cepas de no-*Saccharomyces* en las últimas etapas de la fermentación, confirmando que estas especies pueden sobrevivir más de lo que inicialmente se pensaba (Fleet *et al.*, 1984).

La fermentación alcohólica, por tanto, fue llevada a cabo por cepas de *S. cerevisiae*. La variabilidad hallada en este estudio (68 y 66 cepas diferentes de *S. cerevisiae* en las D.O.s Terra Alta y Priorat, respectivamente durante tres campañas consecutivas) es superior a las descritas en otros estudios ecológicos (Querol *et al.*, 1994; Schütz y Gafner, 1994; Nadal *et al.*, 1996; Beltran *et al.*, 2002). Esta elevada variabilidad puede deberse a varios motivos (i) este estudio se llevó a cabo en bodegas donde nunca se había inoculado, y se ha demostrado que la microbiota autóctona

de una bodega se ve modificada cuando se inoculan cepas comerciales. El principal efecto de esta inoculación es la reducción de la variabilidad de las cepas de *Saccharomyces* de la microbiota autóctona (Constantí *et al.*, 1998; Beltran *et al.*, 2002), (ii) todas las cepas aisladas eran de fenotipo killer sensible (excepto dos que eran neutras) y (iii) a diferencia de lo que ocurría en otros estudios (Hallet *et al.*, 1989; Versavaud *et al.*, 1993; Querol *et al.*, 1994), en éste no se aislaron cepas predominantes o mayoritarias sino un número elevado de cepas que fermentaban de forma secuencial.

Además, el hecho de que se hayan aislado cepas durante campañas consecutivas confirma la existencia de una flora residente de bodega. Estas cepas, en general, serán aquéllas que sean más resistentes y que estén mejor adaptadas a las características propias de la zona y que por tanto, podrían ser adecuadas para utilizarse como iniciadores de fermentación. Otro dato interesante es que había cepas que se identificaron en las dos Denominaciones de Origen, esto puede deberse a que como son dos zonas muy próximas entre ellas y que comparten similares características climáticas, se produzcan intercambios de cepas, probablemente debidos a los insectos, pájaros, etc. La similitud entre ambas Denominaciones fue ratificada por el hecho de que las cepas de ambas zonas presentaban perfiles de restricción del ADN mitocondrial muy similares, y por tanto, fue imposible diferenciarlas mediante un análisis de agrupamiento.

En los últimos años, la industria enológica ha sufrido una importante transformación convirtiéndose en un área con importantes inversiones e intereses. Esto ha generado un mercado que exige un producto de calidad y con unas características concretas y repetitivas, por lo que la aleatoriedad que proporcionaban las fermentaciones espontáneas en los productos obtenidos se tenía que reducir. Una de las prácticas que los enólogos pueden emplear para tener un mayor control de la fermentación, es la utilización de iniciadores de fermentación. Así, la existencia de cepas de *S. cerevisiae* específicas de las diferentes regiones vitivinícolas, lo que parece ser un indicativo de la adaptación por parte de estas cepas a unas características concretas (condiciones climáticas y sustrato), (Guillamón *et al.*, 1996; Nadal *et al.*, 1996), ha reafirmado la creencia que la selección e inoculación de cepas propias de las zonas favorece tanto al proceso fermentativo como a la obtención de un producto con las características típicas de la región (Martini y Vaughan-Martini, 1990).

La selección de las cepas para su uso como iniciadores de fermentación se basó en dos criterios: la competencia masiva y la temperatura.

La selección masiva por competencia consiste en la elección de las cepas que presenten una mejor adaptación y capacidad fermentativa, basándose en la propia competencia entre ellas por los nutrientes del medio. Como parámetro de selección adicional se utilizó la temperatura, una variable muy importante tanto en el desarrollo de las propias levaduras como en las características del vino final. De todas maneras, el criterio definitivo de selección fueron las características fermentativas así como la calidad del producto final.

Durante este proceso de selección, se observó que el desarrollo de las cepas de *S. cerevisiae* está muy condicionado por la temperatura de fermentación, tal y como ya se había descrito para las cepas de no-*Saccharomyces* (Sharf y Margalith, 1983; Heard y Fleet, 1988). La presencia de unas cepas u otras a lo largo de la fermentación, depende en gran medida de la temperatura. De todas maneras, cuando se comparan temperaturas próximas entre sí, la composición de la población de *Saccharomyces* prácticamente no varía (Epifanio *et al.*, 1999). En cambio, si se comparan altas y bajas temperaturas, se observa que la composición de las cepas mayoritarias es completamente diferente. Las cepas que son predominantes a altas temperaturas no lo son a bajas temperaturas y viceversa, confirmando que la temperatura de fermentación condiciona el desarrollo de las poblaciones de levaduras (Fleet y Heard, 1993). Este punto es importante porque la producción de vinos tintos y blancos se realiza a diferentes temperaturas, debido principalmente a sus características diferenciales. Esto significa que cuando se plantea una selección de cepas hay que tener en cuenta en qué tipo de vinificación se va a utilizar, para favorecer la imposición de la cepa utilizándola en las condiciones donde su desarrollo sea mejor. Cabe destacar que la temperatura de fermentación en la que una cepa es mayoritaria no tiene porqué coincidir con su temperatura óptima. La temperatura óptima de varias cepas puede ser la misma, por lo que a esa temperatura será más difícil que haya una cepa mayoritaria, en cambio, a una temperatura restrictiva, aquélla que tenga un mejor desarrollo destacará más sobre el resto.

Un comentario especial requiere las fermentaciones a 35°C, ésta es una temperatura muy restrictiva para las cepas de *S. cerevisiae*, por lo que generalmente a esta temperatura se suelen producir paradas de fermentación (Larue *et al.*, 1980). El hecho de que esto no suceda en las fermentaciones llevadas a cabo con cepas de la D.O. Priorat se debe a que en esta zona se aisló una cepa que era resistente al efecto sinérgico de la temperatura y las elevadas concentraciones de etanol que se dan a final de fermentación. Sin la presencia de esta cepa es muy probable que esta fermentación también se parara, como ocurre en las fermentaciones de la D.O. Terra Alta. De

todas maneras, la mayor concentración de azúcar presente en el medio en las fermentaciones con cepas de la D.O. Terra Alta plantea dudas acerca de si el motivo de la parada es la falta de cepas resistentes a esa temperatura o las condiciones más restrictivas a final de fermentación ocasionadas por este alto contenido en azúcares.

La otra característica diferencial de las fermentaciones llevadas a cabo a diferentes temperaturas es el producto obtenido. La temperatura de fermentación influencia el metabolismo de las levaduras con lo que la concentración de los diferentes metabolitos en el vino también se ve afectada. Las bajas temperaturas favorecen una mayor concentración de etanol (Casey y Ingledew, 1986) debido principalmente a que las vías metabólicas a bajas temperaturas funcionan a una velocidad menor y por tanto, no están tan saturadas en las primeras fases de fermentación como ocurre a altas temperaturas. Este descenso en el rendimiento de producción de etanol, es compensado por una activación de otras vías metabólicas, principalmente la gliceropirúvica, con lo que los vinos fermentados a mayor temperatura suelen presentar mayor contenido en glicerol, ácido succínico etc. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975, Boulton *et al.*, 1996). En estas fermentaciones, el contenido de glicerol si que aumentaba al incrementar la temperatura pero en cambio el succínico no seguía una evolución clara. De todas maneras, las diferencias en el rendimiento en etanol que surgen de realizar la fermentación a 15°C o hacerlo a 30-35°C, es demasiado elevado para ser explicado únicamente por la producción de metabolitos secundarios, con lo que otros motivos deben ser la causa de estas diferencias. Como se ha apuntado en los capítulos anteriores, las causas que pueden motivar estas diferencias sólo pueden hipotetizarse con los resultados que se tienen, ya que se necesitaría un estudio más exhaustivo de las vías metabólicas implicadas en la fermentación alcohólica a diferentes temperaturas, al igual que un conocimiento de la producción de biomasa a lo largo de la fermentación, ya que aunque a bajas temperaturas las poblaciones viables alcanzadas son superiores, el incremento de la temperatura provoca una mortalidad mayor que debe requerir de una producción de biomasa mayor. Es posible que las fermentaciones a altas temperaturas produzcan una gran cantidad de biomasa al principio de la fermentación, lo que unido al rápido inicio de la fase de declive (mayor mortalidad) provoque un mayor gasto de energía en el mantenimiento del tamaño de población. En cambio, en las fermentaciones a bajas temperaturas, la producción de biomasa es más progresiva, y una vez se ha alcanzado la población máxima, la menor mortalidad probablemente requiere una menor utilización de las fuentes de

carbono para mantener estos niveles de población. Además, también se han de tener en cuenta las pérdidas que provoca la mayor evaporación a temperaturas elevadas.

Tras este estudio de selección, se realizaron algunas pruebas de inoculación en bodega y lo que se observó es que las cepas inoculadas normalmente se imponen a la flora autóctona de la zona, debido principalmente a que el tamaño de población inoculado es muy superior al de cualquier otra cepa en el mosto. Cuando la cepa inoculada no se impone es porque existe algún problema, habitualmente relacionado con una falta de competitividad fermentativa por parte de esta cepa respecto a las autóctonas, condiciones diferentes a las que la cepa está adaptada, y por tanto para las que está seleccionada o por una preparación inadecuada del pie de cuba.

La inoculación de una cepa, en general, reduce el número de cepas autóctonas presentes durante la fermentación. De hecho, en las fermentaciones estudiadas durante este trabajo, la presencia de otras cepas de *Saccharomyces* fue mínima. En cambio, algunas cepas de no-*Saccharomyces* sí que fueron detectadas, lo cual es lógico ya que se trata de las cepas mayoritarias en el mosto y las que inician la fermentación alcohólica.

En las pruebas en bodega realizadas con cepas de la D.O. Terra Alta (vinificaciones en blanco, por tanto, temperaturas relativamente bajas), las fermentaciones fueron lentas e incluso se produjeron algunas paradas de fermentación. Sin embargo, estos problemas no eran demasiado sorprendentes porque ya las fermentaciones llevadas a cabo en el laboratorio con estas cepas a bajas temperaturas fueron procesos lentos. Los motivos de estas ralentizaciones pueden asociarse a que estas cepas fueron aisladas de mostos en fermentación donde no se ejercía un control estricto de la temperatura, y por tanto, no deben estar adaptadas para fermentar a bajas temperaturas. Una alternativa a este problema podría ser el uso de inóculos mixtos. De todas maneras, la utilización de cultivos mixtos requiere un estudio más exhaustivo tanto por la elección de las cepas a utilizar como porque uno de los objetivos fundamentales de la inoculación es la repetitividad del producto, y con este tipo de inóculos, ésta puede quedar en entredicho.

Por lo que respecta a las pruebas realizadas con cepas aisladas en la D.O. Priorat, la imposición en todos los casos fue total, salvo en el año en que se tuvieron problemas con la preparación de los pies de cuba a partir de LSA. Además, la cepa finalmente seleccionada para su comercialización (RV1) se trata de una cepa que había sido identificada en ambas D.O.s y que ha sido probada en fermentaciones realizadas en ambas zonas con una total imposición. La comparación de la inoculación de estas cepas con otros inóculos comerciales, parece confirmar la

idea de que las cepas que han sido aisladas en una zona están mejor adaptadas a sus condiciones, ya que en ambos casos, las cepas propias de la región se impusieron, mientras que los otros inóculos comerciales tuvieron un porcentaje de imposición mínimo o inexistente.

Por tanto, este trabajo de ecología de levaduras en las D.O.s Terra Alta y Priorat ha tenido como resultado, a través de la colaboración entre la Universidad y la empresa privada Lallemand, S.A., el primer microorganismo registrado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por la Universidad Rovira i Virgili y explotado comercialmente como RV1. Pruebas para la comercialización de otra cepa de las seleccionadas en este estudio, P29, se están realizando debido a sus buenos resultados en las fermentaciones en bodega.

BIBLIOGRAFÍA

- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N. y Mas, A.** (2002) Analysis of yeast population during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* (aceptado)
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. y Kunkee, R.E.** (1996) Principles and practices of winemaking, Chapman and Hall, New York.
- Casey, G.P. y Ingledeu, W.M.** (1986) Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13, 219-280.
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. y Guillamón, J.M.** (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339-344.
- Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A. y Guillamón, J.M.** (1998) Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 169-175.
- Epifanio, S.I., Gutiérrez, A.R., Santamaría, M.P. y López, R.** (1999) The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 219-224.
- Fleet, G.H. y Heard, G.M.** (1993) Yeast growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology.* (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers: Switzerland.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P.** (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034-1038.
- Guillamón, J.M., Barrio, E. y Querol, A.** (1996) Characterization of wine yeasts strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographical or ecological origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 122-132.
- Hallet, J.N., Craneguy, B., Zucca, J. y Poulard, A.** (1989) Caractérisation des souches levuriennes des moûts et des lies par le polymorphisme de restriction de leur ADN mitochondrial. In: *Actualités oenologiques* 89. (Eds. P. Ribéreau-Gayon y A. Lonvaud) pp. 227-232. C.R. 4th Int. Symp. Oenol. Bordeaux. Dunod, Paris, France.
- Heard, G.M. y Fleet, G.H.** (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 23-28.
- Larue, F., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P.** (1980) Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 808-811.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. y Villa, T.G.** (1991) Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 141-144.
- Martini, A. y Vaughan-Martini, A.** (1990) Grape must fermentation: past and present. In: *Yeasts Technology.* (Eds. J.F.T. Spencer y M. Spencer) pp. 105-123, Springer-Verlag: Berlin.
- Martini, A.** (1993) Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* 3, 165-176.

Nadal, D., Colomer, B. y Piña, B. (1996) Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1944-1950.

Querol, A., Jiménez, M. y Huerta, T. (1990) A study on microbiological and enological parameter during fermentation of must from poor and normal grapes harvest in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci.* 55, 1603-1606.

Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1994) Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 315-323.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. y Sudraud, P. (1975) *Sciences et Techniques du vin. Traité d'Oenologie II.* Dunod: Paris.

Schütz, M. y Gafner, J. (1994) Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 253-257.

Sharf, R. y Margalith, P. (1983) The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 311-313.

Vaughan-Martini, A. y Martini, A. (1995) Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Ind. Microbiol.* 14, 514-522.

Versavaud, A., Dulau, L. y Hallet, J.N. (1993) Etude écologique de la microflore levurienne spontanée du vignoble des Charentes et approche moléculaire de la diversité infraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Fr. Oenol. (Cah Sci)* 142, 20-28.

SEGUNDA PARTE:

**MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A
BAJAS TEMPERATURAS**

CAPÍTULO 7:

**EFFECT OF FERMENTATION TEMPERATURE AND
Saccharomyces SPECIES ON THE CELL FATTY ACID
COMPOSITION AND PRESENCE OF VOLATILE
COMPOUNDS IN WINE**

M.J. Torija, G. Beltran, M. Novo, M. Poblet, J.M. Guillamón, A. Mas y N. Rozès

International Journal of Food Microbiology
(enviado para su publicación)

ABSTRACT

Low temperature alcoholic fermentations are becoming more frequent due to the production of wines with better aromatic profiles. However, their biggest drawback is the high risk of stuck and sluggish fermentations. Changes in the plasma membrane composition may be an adaptive response to low temperature fermentations. The production of volatile compounds and the changes in the membrane fatty acids were determined by GC to show the degree of cell adaptation and performance at low temperatures (13°C) taking 25°C as reference. The tests were done in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and one strain of *Saccharomyces bayanus*. Low temperatures restricted yeast growth and lengthened the fermentations. The analysis of plasma membrane fatty acids showed that dry yeasts had similar levels of unsaturation, between 70 and 80%, with no medium chain fatty acids (MCFA). Long-chain saturated fatty acids (SFA) were the most frequent membrane fatty acids throughout the fermentations. Lipid composition changed with the growth temperature. The optimal membrane fluidity at low temperatures was modulated by changes in the unsaturation degree in *S. cerevisiae* strains. In *S. bayanus*, however, this change in the unsaturated fatty acid (UFA) percentage was not observed at different growth temperatures but the concentration of MCFA at low fermentation temperatures was higher. Concentrations of volatile compounds were higher in wines produced at lower temperatures and depended on the strain.

INTRODUCTION

Temperature is one of the most important parameters for the development of alcoholic fermentation, since it can affect both the kinetics of the process (duration and rate of fermentation) and the final quality of the wine (production of secondary metabolites) (Lafon-Lafourcade, 1983; Fleet and Heard, 1993). Winemakers' interest in fermenting at low temperatures, 10-15°C, is currently increasing since the enhancement of the production and retention of flavour volatiles can improve the wine aromatic profile (Killian and Ough, 1979; Kunkee, 1984). These low temperatures, however, can easily cause sluggish or stuck fermentations.

Although it is not known exactly what causes stuck fermentations, some important factors are must composition (grape variety, climate, etc.), and/or technological practices such as must clarification and fermentation temperature (Ingledeew and Kunkee, 1985; Ayestaran *et al.*, 1995). Moreover, some metabolites as ethanol, acetic acid, acetaldehyde and medium-chain fatty acids

may have a toxic effect on *Saccharomyces cerevisiae* (the principal yeast in alcoholic fermentation) (Bisson, 1999). Although the mechanism by which these metabolites affect yeast is still unknown, membrane composition is one of the most likely targets, as has been reported for ethanol (Ingram and Buttke, 1984; Casey and Ingledew, 1986). Yeast plasma membrane may play an important role in the transport and tolerance of these compounds, and, thus, small changes in plasma membrane can modify the cell metabolism (Keenan *et al.*, 1982; Hazel and Williams, 1990; Valero *et al.*, 1998).

In fact, membrane fatty acid composition is highly variable and clearly influenced by environmental factors such as temperature, oxygen, nutrient limitation and growth rate (Hunter and Rose, 1972; Ratledge and Evans, 1989). The membrane fatty-acyl composition of yeasts, like that of many other microorganisms, changes with temperature: the lower the temperature, the more unsaturated the membrane fatty-acyl composition (Watson, 1987). Variation in fatty acid composition can also be specific to some microbial groups so fatty acid profiles can be a useful taxonomic criterion (Rozès *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1993). However, the fatty acid composition of a cell can also be influenced by the environment's lipid composition, since it can include fatty acids from the medium in its own phospholipids (Benchekroun and Bonaly, 1992; Rosi and Bertuccioli, 1992).

In grapes, unsaturated fatty acids are the major component of total lipids. The most abundant is linoleic acid followed by oleic, linolenic and palmitoleic acid. Of the saturated fatty acids, palmitic acid is the most abundant (Bertrand and Miele, 1984; Castela *et al.*, 1985). However, the initial fatty acid content of the must depends on the technological procedures applied to the grapes and musts such as pressing, maceration or clarification (Bertuccioli and Rosi, 1984).

Furthermore, the fatty acid composition of the medium also depends on the fermentation conditions, i. e., oxygen availability, as a result of yeast metabolism. So, when the fermentation is carried out in anaerobic conditions, medium-chain fatty acids are always produced (Hammond, 1993; Ravaglia and Delfini, 1993). In contrast, when the fermentation is carried out in aerobic or semi-aerobic conditions, fewer medium-chain fatty acids and more unsaturated fatty acids are produced (Suomalainen and Lehtonen, 1979). Fatty acids and their esters have an essential role in alcoholic fermentation (Larue *et al.*, 1984). In fact, it has been shown that hexanoic, octanoic, decanoic and dodecanoic acids and their esters together with ethanol can inhibit the growth of

yeast (Geneix *et al.*, 1984; Ravaglia and Delfini, 1993). Long-chain fatty acids, on the other hand, seem to have a positive action (Soufleros and Bertrand, 1988).

The aim of the present study was to analyse the changes in yeast performance during low temperature fermentations. Because the membrane fatty acid changes to adjust to low temperatures, the composition of cell membrane fatty acids was analysed in three different strains belonging to the two most likely species of *Saccharomyces* present in alcoholic fermentation. Because the most important result of low temperature fermentation is wine aroma, the presence of volatile compounds was also determined.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains

Three commercial wine yeast strains were used: two strains of *S. cerevisiae* (called A and B) and one of *S. bayanus*. They were identified by molecular methods (Guillamón *et al.*, 1998). The *S. bayanus* was commercially labelled as *S. uvarum*. Strain A of *S. cerevisiae* was a flocculating yeast.

Fermentations

The medium was made from concentrated white must (Concentrados Palleja, Riudoms, Spain), which was diluted with water to obtain a final sugar concentration of 240 g l⁻¹ (a density of about 1100). This would yield 14% ethanol (v/v). Fermentations were done in 2-litre bottles filled with 1.8 l of medium and fitted with closures that enabled the carbon dioxide to escape and the samples to be removed but which excluded the atmospheric oxygen. The population inoculated in every flask was 2×10⁶ cells ml⁻¹ from dry yeast rehydrated in water at 37°C.

The fermentations were incubated in triplicate at two different temperatures (13 and 25°C) without shaking. Every day the density was measured by weighing 5 ml and reducing sugars were determined by an enzymatic method (Boehringer Mannheim, Germany).

The growth of yeast was calculated by counting the viable yeast after plating them on YPD agar (Glucose 20 g l⁻¹; Peptone Bacteriological (Cultimed, Panreac, Barcelona, Spain) 20 g l⁻¹; Yeast extract (Cultimed) 10 g l⁻¹; Agar Bacteriological American Type (Cultimed) 20 g l⁻¹) at an adequate dilution for 2 days at 28°C. *S. cerevisiae* A was diluted in the presence of 5 mM EDTA

to inhibit cell aggregation. Dry yeast determination was performed as previously described by Sierkstra *et al.* (1992).

Maximal fermentation rate was the slope obtained from the representation of sugar consumption per fermentation day and was expressed as concentration of sugars consumed (g l^{-1}) per day.

Determination of cell fatty acid composition

Cells were saponified and fatty acids were extracted according to the method used by Rozès *et al.* (1992).

Analytical GC was carried out on a Hewlett-Packard 5890 connected to an HP Vectra computer with the ChemStation software (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). The extract ($2 \mu\text{l}$) was injected (splitless, 1 minute) into an FFAP-HP column of $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ and $0.25 \mu\text{m}$ phase thickness (Agilent) with an HP 7673 automatic injector (Agilent). The temperature program was $140^\circ\text{C} \times 4^\circ\text{C min}^{-1}$ to 240°C (13 min.). Injector and detector temperatures were 250 and 280°C , respectively. The carrier gas was helium at 1.2 ml min^{-1} . Heptanoic and heptadecanoic acids (1 mg ml^{-1} and 4 mg ml^{-1} , respectively) were added as internal standards. Relative amounts of given fatty acids were calculated from their respective chromatographic peak areas. These amounts were related to the dry weight and later transformed into percentages of the total fatty acids obtained. Mean fatty acid chain length (CL) was calculated as:

$\text{CL} = \sum (\text{P} \times \text{C}) / 100$, where P is the percentage of fatty acids and C is the number of carbons.

Determination of volatile compounds

To determine volatile fatty acids, the ethyl esters of fatty acids, higher alcohol acetates and other volatile compounds, we used the protocol proposed by Lema *et al.* (1996). 1-nonanol (0.92 mg l^{-1}), and heptanoic and heptadecanoic acids (3.22 mg l^{-1} and 2.90 mg l^{-1} , respectively) were added as internal standards.

Analytical GC was carried out on a Hewlett-Packard 4890A connected to a Hewlett-Packard Integrator 3393A equipped with a flame ionisation detector (Agilent). The extract ($2 \mu\text{l}$) was injected (splitless, 1 minute) into an FFAP-HP column of $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ and $0.25 \mu\text{m}$ phase thickness (Agilent). The temperature program was $50^\circ\text{C} \times 4^\circ\text{C min}^{-1}$ to 240°C (15 min.). Injector

and detector temperatures were 240°C. The carrier gas was helium at 1 ml min⁻¹. Volatile compounds were identified and quantified by comparison with standards.

Statistical data processing

The statistical data were processed with the Statview 4.02 program (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA). Analysis of variance (ANOVA) was used to determine strain and temperature differences in the fatty acid composition (statistical level of significance set at $P \leq 0.05$).

RESULTS

All the fermentations finished (final sugar concentration < 2 g l⁻¹) except those inoculated with *S. bayanus* and carried out at 13°C (Table 1). Fermentations were longer with *S. cerevisiae* A and *S. bayanus*. Populations were maximal in high temperature fermentations in both strains of *S. cerevisiae*. For *S. bayanus*, on the other hand, maximal populations were the same in the fermentations done at both temperatures, but one order of magnitude lower than those in *S. cerevisiae*. The growth of yeast at low temperatures was clearly delayed and it took longer for the population to reach its maximal size. Accordingly, sugar consumption was faster at 25°C than at 13°C in the three strains and fermentation rates were maximal for *S. cerevisiae* B. *S. cerevisiae* A, however, had the lowest fermentation rates, although the fermentation always finished. The decline phase at 25°C started earlier, with considerable mortality by the end of fermentation, whereas at 13°C the population remained steady throughout the process (data not shown).

Cell fatty acid composition

The fatty acid composition of the three dry yeasts were quite similar. The strains showed levels of unsaturation between 70-80% while MCFA were not detected. In fact, there were only four fatty acids in their profile: two saturated fatty acids, palmitic (C16:0) and stearic (C18:0), and two unsaturated fatty acids, palmitoleic (C16:1) and oleic (C18:1), which were the main ones. Moreover, oleic acid was practically 50% of the total cell fatty acids. Of the saturated fatty acids, palmitic acid was the most abundant (data not shown). The UFA/SFA ratio was higher than 2 in all dry yeasts, and the highest ratio was for *S. cerevisiae* B (Table 2).

Table 1. Effect of strain and temperature on fermentation kinetics. Values are the mean of three independent experiments

		Day of density	Day of final 1050 fermentatio n	Maximal population (cfu ml ⁻¹)	Day of maximal population	Maximal fermentation rate (g l ⁻¹ day ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i> A	25°C	4	17	3×10 ⁸	3	40.2
	13°C	10	30	4×10 ⁷	13	13.8
<i>S. cerevisiae</i> B	25°C	2	8	3×10 ⁸	3	65.3
	13°C	7	22	1×10 ⁸	6	26.0
<i>S. bayanus</i>	25°C	3	24	9×10 ⁶	2	49.0
	13°C	7	29 ^a	9×10 ⁶	13	23.9

^a Stuck fermentation

In general, the relative content of UFA decreased throughout the fermentation and SFA and MCFA increased, regardless of the fermentation temperature. These changes were mainly observed during the exponential phase, and afterwards practically did not vary.

a) Fermentations at 25°C

The MCFA concentration of the three strains was clearly different. In fact, it was only at the end of the process that *S. cerevisiae* B and *S. bayanus* showed similar values. *S. cerevisiae* A had the lowest content (Table 2). In both strains of *S. cerevisiae*, C10 was the main MCFA, whereas in *S. bayanus* C12 was the main one (Table 3).

Long-chain saturated fatty acids were the majority in the cell membrane. The SFA concentration increased steadily until a density of 1000, but at the very end of the fermentation, this tendency changed and the concentration decreased. Differences in SFA composition were greater between the two *S. cerevisiae* strains than between the two species. *S. cerevisiae* A and B produced the least and the most SFA, respectively (Table 2). Palmitic acid was the main SFA. In fact, similar amounts of this fatty acid (43%) were in the final cell composition of *S. cerevisiae* B and *S. bayanus*. The ratio between palmitic and stearic acid was higher than 2, except in *S. cerevisiae* A (Table 3).

There were no significant differences between the membrane unsaturated fatty acid concentrations of *S. cerevisiae* B and *S. bayanus*. All the individual percentages, the C16:1/C18:1 ratio, and the total UFA content were quite similar. On the other hand, *S. cerevisiae* A was the

Table 2. Changes in cell membrane fatty acid profiles during fermentation. Values are expressed as percentages of the total fatty acids. They are the mean \pm standard deviations of three independent experiments.

		Dry yeast	Must Density		Wine	
			1050	1000		
<i>S. cerevisiae</i> A	25°C	MCFA	0	19.18 \pm 1.72 ^{bc}	13.06 \pm 1.24 ^{bc}	15.61 \pm 4.70 ^{bc}
		SFA	29.92	49.42 \pm 2.24 ^b	59.82 \pm 2.75 ^b	55.93 \pm 1.22 ^{bc}
		UFA	70.08	31.40 \pm 1.20 ^{bc}	27.12 \pm 3.32 ^{bc}	28.46 \pm 4.22 ^{bc}
		CL	17.11	15.50 \pm 0.12 ^c	15.95 \pm 0.16 ^c	15.78 \pm 0.30 ^{bc}
		UFA/SFA	2.34	0.63	0.45	0.51
	13°C	MCFA	0	14.40 \pm 4.07 ^{bc}	10.41 \pm 1.75 ^{bc}	11.97 \pm 2.69 ^{bc}
		SFA	29.92	43.61 \pm 1.06 ^{*b}	43.01 \pm 3.61 ^{*b}	41.67 \pm 2.34 ^{*b}
		UFA	70.08	41.98 \pm 3.86 ^{*bc}	46.58 \pm 5.22 ^{*bc}	46.37 \pm 4.93 ^{*bc}
		CL	17.11	15.74 \pm 0.33 ^{bc}	16.02 \pm 0.19 ^{bc}	15.92 \pm 0.06 ^{bc}
		UFA/SFA	2.34	0.96	1.08	1.11
<i>S. cerevisiae</i> B	25°C	MCFA	0	13.65 \pm 1.56 ^{ac}	17.29 \pm 1.49 ^{ac}	23.18 \pm 1.14 ^a
		SFA	20.48	60.42 \pm 3.43 ^{ac}	64.95 \pm 0.80 ^a	61.73 \pm 2.48 ^a
		UFA	79.52	25.93 \pm 3.44 ^a	17.76 \pm 2.29 ^a	15.09 \pm 1.64 ^a
		CL	17.05	15.76 \pm 0.09 ^c	15.64 \pm 0.21	15.23 \pm 0.07 ^a
		UFA/SFA	3.88	0.43	0.27	0.24
	13°C	MCFA	0	25.18 \pm 1.94 ^{*ac}	26.04 \pm 2.83 ^{*ac}	21.99 \pm 1.32 ^{ac}
		SFA	20.48	50.73 \pm 2.38 ^{*ac}	50.98 \pm 3.52 ^{*a}	50.25 \pm 2.41 ^{*ac}
		UFA	79.52	24.09 \pm 1.46 ^a	22.98 \pm 0.99 ^{*a}	27.76 \pm 2.01 ^{*ac}
		CL	17.05	14.97 \pm 0.12 ^{*ac}	14.96 \pm 0.13 ^{*ac}	15.12 \pm 0.02 ^{ac}
		UFA/SFA	3.88	0.47	0.45	0.55
<i>S. bayanus</i> C	25°C	MCFA	0	24.30 \pm 3.58 ^{ab}	21.61 \pm 2.03 ^{ab}	22.13 \pm 2.56 ^a
		SFA	26.16	52.93 \pm 2.93 ^b	63.25 \pm 0.77	59.78 \pm 0.59 ^a
		UFA	73.85	22.78 \pm 2.44 ^a	15.14 \pm 1.29 ^a	18.09 \pm 2.04 ^a
		CL	17.00	15.05 \pm 0.27 ^{ab}	15.23 \pm 0.19 ^a	15.29 \pm 0.19 ^a
		UFA/SFA	2.82	0.43	0.24	0.30
	13°C	MCFA	0	34.45 \pm 2.01 ^{*ab}	33.20 \pm 2.36 ^{*ab}	36.09 \pm 2.21 ^{*ab}
		SFA	26.16	43.62 \pm 1.05 ^{*b}	45.36 \pm 2.07 [*]	44.34 \pm 1.81 ^{*b}
		UFA	73.85	21.93 \pm 0.97 ^a	21.44 \pm 0.90 ^{*a}	19.57 \pm 1.14 ^{ab}
		CL	17.00	14.20 \pm 0.15 ^{*ab}	14.39 \pm 0.21 ^{*ab}	14.30 \pm 0.14 ^{*ab}
		UFA/SFA	2.82	0.50	0.47	0.44

* significantly different to 25°C (P \leq 0.05)a, b, c significantly different respect to the indicated strain at the same temperature (P \leq 0.05)

most unsaturated and had higher percentages of both acids, particularly palmitoleic acid (Tables 2 and 3).

The mean chain length (CL) decreased during the process, mostly in the early stages. Although there were significant differences between the *S. cerevisiae* strains and *S. bayanus* during fermentation, the most significant differences at the end were between *S. cerevisiae* A and the other two strains.

Table 3. Percentages of cell membrane individual fatty acids at the end of fermentation. Values are expressed as percentages of total fatty acids. They are the mean \pm standard deviations of three independent experiments.

	<i>S. cerevisiae</i> A		<i>S. cerevisiae</i> B		<i>S. bayanus</i> C	
	25°C	13°C	25°C	13°C	25°C	13°C
C8:0	0.94 \pm 0.18	1.18 \pm 0.35 ^{bc}	1.51 \pm 0.35	2.12 \pm 0.40 ^{ac}	1.36 \pm 0.33	3.12 \pm 0.45 ^{*ab}
C10:0	9.54 \pm 2.47 ^b	8.64 \pm 1.81 ^{bc}	13.59 \pm 0.80 ^{ac}	14.67 \pm 1.16 ^{ac}	9.70 \pm 0.92 ^b	19.21 \pm 1.37 ^{*ab}
C12:0	5.14 \pm 2.05 ^{bc}	2.15 \pm 0.56 ^{bc}	8.08 \pm 0.42 ^{ac}	5.20 \pm 0.58 ^{*ac}	11.08 \pm 1.32 ^{ab}	13.76 \pm 0.70 ^{*ab}
Σ MCFA	15.61\pm4.70^{bc}	11.97\pm2.69^{bc}	23.18\pm1.14^a	21.99\pm1.32^{ac}	22.13\pm2.56^a	36.09\pm2.21^{*ab}
C14:0	0.32 \pm 0.18 ^c	0.39 \pm 0.02 ^c	0.67 \pm 0.15 ^c	0.28 \pm 0.13 ^c	1.94 \pm 0.19 ^{ab}	2.16 \pm 0.44 ^{ab}
C16:0	35.31 \pm 2.51 ^{bc}	29.73 \pm 2.60 ^b	43.61 \pm 3.55 ^a	39.80 \pm 3.31 ^{ac}	43.13 \pm 1.16 ^a	33.82 \pm 2.61 ^{*b}
C18:0	20.29 \pm 1.71 ^c	11.55 \pm 0.29 ^{*c}	17.46 \pm 0.99	10.17 \pm 1.15 ^{*c}	14.72 \pm 1.54 ^a	8.37 \pm 0.89 ^{*ab}
Σ SFA	55.93\pm1.22^{bc}	41.67\pm2.34^{*b}	61.73\pm2.48^a	50.25\pm2.41^{*ac}	59.78\pm0.59^a	44.34\pm1.81^{*b}
C14:1	0	0.29 \pm 0.07 ^{*bc}	0	0.18 \pm 0.04 ^{*ac}	0	0.46 \pm 0.02 ^{*ab}
C16:1	16.64 \pm 2.60 ^{bc}	26.10 \pm 1.09 ^{*bc}	7.25 \pm 0.57 ^a	18.28 \pm 1.80 ^{*ac}	9.54 \pm 0.55 ^a	12.22 \pm 0.52 ^{*ab}
C18:1	11.82 \pm 2.03 ^{bc}	19.98 \pm 3.91 ^{*bc}	7.83 \pm 1.33 ^a	9.30 \pm 1.46 ^a	8.47 \pm 1.56 ^a	6.88 \pm 0.95 ^a
Σ UFA	28.46\pm4.22^{bc}	46.37\pm4.93^{*bc}	15.09\pm1.64^a	27.76\pm2.01^{*ac}	18.09\pm2.04^a	19.57\pm1.14^{ab}

* significantly different to 25°C ($P \leq 0.05$)

a, b, c significantly different respect to the indicated strain at the same temperature ($P \leq 0.05$)

b) Fermentations at 13°C

S. bayanus had the highest concentration of MCFA at 13°C and it was the only strain that showed significant differences between both temperatures throughout the fermentation. The percentages of MCFA were significantly lower in *S. cerevisiae* (Table 2). C10 was the main MCFA for all the strains, and was about 20% of the total fatty acids in *S. bayanus* (Table 3).

SFA concentrations were significantly lower at 13°C and *S. cerevisiae* B had the highest percentage (Table 2). Considered SFA individually, stearic acid was the only one that always

decreased significantly. Palmitic acid also decreased in all the cases although only was statistically significant in *S. bayanus* (Table 3).

The differences in UFA concentration were significant for both strains of *S. cerevisiae* between 13 and 25°C. The degree of unsaturation increased significantly at 13°C and was practically twice that of 25°C. *S. cerevisiae* A showed the highest level of unsaturation as at 25°C, and about 50% of the total fatty acids were unsaturated. *S. bayanus* had the lowest concentration of UFA and temperature caused no change (Table 2). At 13°C, myristoleic acid was detected although only in small amounts. Palmitoleic acid increased in all the strains at low temperatures, the lowest percentage being in *S. bayanus*. *S. cerevisiae* A was the only strain in which the percentage of oleic acid increased significantly during lower temperature fermentation (Table 3).

The C16/C18 ratio in *S. cerevisiae* A was similar at both temperatures, whereas in the other strains it was clearly higher at 13°C. Thus, the amount of C18 fatty acid present in the cell membrane of this strain was higher.

The UFA/SFA ratio was higher than 1 for *S. cerevisiae* A at 13°C, and about 0.5 for the other yeasts. However, in all the cases, this ratio was higher after 13°C fermentations.

Temperature only had a significant effect on the mean chain length in *S. bayanus*. At the end of the fermentation at 13°C, values were lower than 14.5 (Table 2). Indeed, this was expected because of the good correlation between MCFA and CL at both temperatures (data not shown).

Volatile compounds

Volatile compounds were detected in higher concentrations at the low temperature (Table 4). This tendency was not observed in *S. cerevisiae* A, when the amounts of volatile compounds in the final wine were similar at both temperatures.

The main difference in the volatile compounds between the species was the production of 2-phenylethanol. *S. bayanus* produced three times as much as *S. cerevisiae*. It was generally produced in the early stages of the fermentation (data not shown).

The production of acetates, fatty acid ethyl esters and MCFA, on the other hand, was maximal in *S. cerevisiae* B at 13°C. The concentration of wine MCFA increased sharply as soon as the fermentation started. Concentrations were highest at low temperatures and close to the end of

fermentation. Butyric, hexanoic and octanoic acids were found in the highest concentrations whereas decanoic and dodecanoic acids were practically always found at very low concentrations.

Table 4. Contents of volatile compounds in wines (mg l⁻¹).

	<i>S. cerevisiae</i> A		<i>S. cerevisiae</i> B		<i>S. bayanus</i>	
	25°C	13°C	25°C	13°C	25°C	13°C
2-phenyl ethanol	12.99	11.45	13.91	15.48	49.22	61.55
Isoamyl acetate	0.78	-	-	3.14	-	-
Hexyl acetate	-	-	-	-	-	0.03
2-phenylethyl acetate	0.14	0.17	0.23	0.29	0.51	1.12
Σacetates	0.92	0.17	0.23	3.43	0.51	1.15
Ethyl butyrate	0.18	-	-	0.51	-	-
Ethyl caproate	0.13	-	-	0.40	0.06	-
Ethyl caprylate	0.06	0.07	0.17	0.20	0.04	0.23
Ethyl caprate	0.03	-	0.04	0.07	0.04	0.09
Σethyls	0.40	0.07	0.21	1.17	0.14	0.32
Butyric acid	0.85	1.17	0.74	3.02	0.62	4.21
Hexanoic acid	2.01	2.70	3.37	5.50	2.03	4.36
Octanoic acid	1.60	2.15	2.63	6.01	2.59	3.31
Decanoic acid	0.10	0.10	0.03	0.36	0.32	0.16
Dodecanoic acid	-	-	-	0.04	-	-
ΣMCFA	4.56	6.12	6.77	14.92	5.57	12.04

- not detected

DISCUSSION

Experimental fermentations have several limitations that can jeopardise normal progress. First of all, limited aeration and, thus, limitation of oxygen can be a strong challenge for yeast due to its necessity for some metabolic pathways, especially those for unsaturated fatty acid and sterol synthesis (O'Connor-Cox and Ingledew, 1990). Secondly, in our experimental set up, the sugar concentration was very high, similar to those of our producing areas. This fact could challenge normal development due to both high osmotic conditions and also the ethanol production. Furthermore, we are mainly interested in carrying out fermentations at low temperatures to enhance wine aroma (Lafon-Lafourcade, 1983; Fleet and Heard, 1993), and this is an additional challenge to yeast development. In our study, we carried out fermentations at a low temperature of 13°C and a control temperature of 25°C. We used three strains with different properties: two *S. cerevisiae* strains and a *S. bayanus* strain. *S. cerevisiae* strain A was a flocculating yeast, whereas

strain B was a multi-purpose wine yeast that is recommended for use at medium temperatures (20-25°C). The *S. bayanus* strain, which is commercially sold as a cryotolerant yeast, is, therefore, recommended for low temperature fermentations.

As expected, all the fermentations were better (in terms of sugar consumed and time involved) at 25°C than at low temperatures. *S. cerevisiae* B also led to faster and shorter fermentations at both temperatures. *S. cerevisiae* A led to sluggish fermentations, probably due to flocculation which can impair the ability to consume the final residual sugars. Fermentations with *S. bayanus*, on the other hand, were stuck at low temperatures. Although this might be considered a surprising result because of its cryotolerance, it should be taken into account that the sugar concentration was high, which means that, in turn, the ethanol content would also be high. While ethanol tolerance could be associated with a high content of long-chain fatty acids (Baleiras Couto and Huis in't Veld, 1995), a high concentration of MCFA was detected in the plasma membrane of this strain. The shorter chain length may make *S. bayanus* particularly sensitive to ethanol at low temperatures. As a result, fermentation did not finish and the maximal population was lower.

So, these three strains may be appropriate for analysing the effect that fermentation has on the cell fatty acid composition and the release of volatile compounds. In the dry yeast, the UFA concentrations were very high, which could be an appropriate condition for fermentation. Since wine yeasts are grown under fed-batch condition in the presence of air, they will contain a reservoir of unsaturated fatty acids and sterols as needed for limited number of generations that occur during the fermentation of grape must (Degré, 1993). Thus, the high content of UFA in dry yeasts may be related to a good fermentation (Rozès *et al.*, 1988). In the semi-anaerobiosis conditions of the fermentation, cell UFA decreased and SFA increased as expected because of the lack of oxygen. However, this decrease was dependent on environmental temperature and the degree of unsaturation was higher in fermentations at low temperatures (Nordström and Laakso, 1992). In fact, it is well established that many organisms regulate their membrane lipid composition in response to environmental temperature so that membrane fluidity can remain optimal (Swan and Watson, 1997). Environmental temperature, therefore, affected the unsaturation degree (Suutari and Laskso, 1994). However, this might not be a universal response in yeast (Suutari *et al.*, 1990). In our case, the optimal membrane fluidity was modulated by changes in the unsaturation degree in *S. cerevisiae* strains. The percentage of UFA, however, did not change in *S.*

bayanus at different growth temperatures. On the other hand, *S. bayanus* did produce a high proportion of MCFA at the low fermentation temperature. In physical terms, the effect of a short chain is similar to that of the double bond of a long chain (Quinn and Chapman, 1980) and, therefore, the increased synthesis of MCFA could also modulate membrane fluidity. However, Bardi *et al.* (1999) observed that the increase in cell MCFA was very small, and proposed that the replacement of UFA by MCFA in the membrane would not maintain its fluidity. It is likely that the mechanisms for adapting the membrane composition at different growth temperatures is strain or species-specific and more strains should be tested in the future.

However, the fatty acid composition of strains within the same species can differ considerably (Baleiras Couto *et al.*, 1994). Although both *S. cerevisiae* strains showed a higher percentage of UFA at low temperatures (about twice as much), the degree of unsaturation at both temperatures was higher in strain A than strain B. This high proportion of UFA during anaerobiosis has been reported to decrease stress tolerance (Steels *et al.*, 1994) and it may be one of the reasons why fermentations were sluggish when *S. cerevisiae* A was used. A relation has also been described between membrane composition and flocculation capacity (Straver *et al.*, 1993), which could explain the unusual unsaturation percentage in this strain.

Anyway, the fermentation problems could not be only attributed to membrane fatty acid composition, since *S. cerevisiae* B and *S. bayanus* had similar profiles at 25°C and fermentation performance was very different.

Fermentations at low temperatures enhanced the aromatic characteristics of the wines, probably because of greater synthesis (Santamaría *et al.*, 1995) and a greater retention of the volatile flavours (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). This was the case in our experiments, except for *S. cerevisiae* A. *S. bayanus* was characterised by producing more 2-phenylethanol than *S. cerevisiae* strains. A high concentration of 2-phenylethanol in wines fermented with a cryotolerant yeast of *S. bayanus* has previously been reported by Feuillat *et al.* (1997).

A higher concentration of MCFA and a lower concentration of oleic acid in the membrane, as in *S. bayanus*, has been considered a positive influence on the excretion of volatile compounds (Taylor *et al.*, 1979; Rosi and Bertuccioli, 1992). Moreover, it has also been postulated that a higher saturation degree in the membrane speeds up the removal of ethanol (Rotmann and Rehm, 1991) and volatile compounds (Rosi and Bertuccioli, 1992) from yeast. The highest saturation

degree was in *S. cerevisiae* B, which had the highest concentration of volatile compounds at low temperatures, if the 2-phenylethanol was not taken into account. Furthermore, the lowest aromatic profile was produced by *S. cerevisiae* A, perhaps because of its high unsaturation degree.

MCFA and their ethyl esters were considered to be a significant part of the aroma in alcoholic beverages (Suomalainen and Lehtonen, 1979; Kodama, 1993). The content of MCFA and their esters was dependent on the strain used in the fermentation, so this could be an important criterion when selecting yeast for oenological purposes (Ravaglia and Delfini, 1994). One of the negative effects of a high concentration of these compounds in the fermentation media is that they are toxic for yeast metabolism and may hinder yeast growth. However, the levels found in our fermentations were not high enough to cause problems (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1984).

In conclusion, the lipid unsaturation degree was affected by growth temperature in *S. cerevisiae* strains although it was strain-specific. A higher unsaturation degree did not ensure a good performance in our fermentation conditions. On the other hand, the main change observed in *S. bayanus* at lower growth temperatures was an increase in MCFA. Another characteristic of this strain was that it produced larger amounts of 2-phenylethanol than *S. cerevisiae* strains. From a practical point of view, a mixed inoculum of this strain and *S. cerevisiae* B may help to increase the aromatic profile and ensure fermentation at high sugar contents and low temperatures.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by grants from Spanish Government FEDER 2FD97-1854 and AGL2000-0205-P4-03. We thank careful revision of Mr John Bates from the languages services of University Rovira i Virgili.

REFERENCES

- Ayestaran, B.M., Ancin, M.C., García, A.M., González, A. and Garrido, J.J.** (1995) Influence of prefermentation clarification on nitrogenous contents of musts and wines. *J. Agric. Food Chem.* 43, 476-482.
- Baleiras Couto, M.M., van der Vossen, J.M.B.M., Hofstra, H. and Huis in't Veld, J.H.J.** (1994) RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 249-260.
- Baleiras Couto, M.M. and Huis in't Veld, J.H.J.** (1995) Influence of ethanol and temperature on the cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailii* spoilage yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 327-334.
- Bardi, L., Cocito, Ch. and Marzona, M.** (1999) *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 133-140.
- Benckekroun, K. and Bonaly, R.** (1992) Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in presence of surfactant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 673-678.
- Bertrand, A. and Miele, A.** (1984) Influence de la clarification du mouts de raisin sur sa teneur en acides gras. *Conn. Vigne Vin* 18, 293-297.
- Bertuccioli, M. and Rosi, I.** (1984) Progress in Flavour Research. In: *Developments in Food Science*, Vol. 10. (Ed. J. Adda) 387 pp. Elsevier Sci. Publ.: Amsterdam.
- Bisson, L.F.** (1999) Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 107-119.
- Casey, G.P. and Ingledew, W.M.** (1986) Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13, 219-280.
- Castela, P.M., Mesías, J.L. and Maynar, J.I.** (1985) Changes in contents of total, polar and neutral lipids in Macabeo grapes during development. *Sciences des Aliments* 5, 587-597.
- Degré, R.** (1993) Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet), pp. 421-447. Harwood Academic Publishers, Chur: Switzerland.
- Feuillat, M., Charpentier, C. and Massoutier, C.** (1997) Winemaking interest of cryotolerant strains of *Saccharomyces* sp. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques* 85, 18-21.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M.** (1993) Yeasts: growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Chur: Switzerland.
- Geneix, C., Lafon-Lafourcade, S. and Ribéreau-Gayon, P.** (1984) Relation entre les difficultés de fermentations et certaines activités enzymatiques de la levure. *Conn. Vigne Vin* 18, 205-217.
- Guillamón J.M., Sabaté J., Barrio E., Cano J. and Querol A.** (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.

- Hammond, J.R.M.** (1993) Brewer's yeasts. In: The yeast, vol. 5: Yeast Technology. (Eds. A.H. Rose and J.S. Harrison) 620 pp. Academic Press Limited: London.
- Hazel, J.R. and Williams, E.E.** (1990) The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29, 167-227.
- Hunter, K. and Rose, A.H.** (1972) Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 260, 639-653.
- Ingledeew, M. and Kunkee, R.E.** (1985) Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 65-76.
- Ingram, L.O. and Buttke, T.M.** (1984) Effects of alcohols on microorganisms. In: *Advances in Microbial Physiology*, vol. 25. (Eds. A.H. Rose and D.W. Tempest) pp. 253-300. Academic Press Ltd: London.
- Keenan, M.H.J., Rose, A.H. and Silverman, B.W.** (1982) Effect of plasma-membrane phospholipid unsaturation on solute transport into *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 366. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2547-2556.
- Killian, R.E. and Ough, C.S.** (1979) Fermentation esters-formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 301-305.
- Kodama, K.** (1993) Sake-brewing yeast. In: The yeasts, Vol. 5: Yeast technology. (Eds. A.H. Rose and J.S. Harrison) 620 pp. Academic Press Limited: London.
- Kunkee, R.E.** (1984) Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiol.* 1, 315-322.
- Lafon-Lafourcade, S.** (1983) Wine and brandy. In: *Biotechnology, Vol. 5: Food and Feed Production with microorganisms.* (Eds. H.J. Rehm and G. Reed) pp. 81-163. Verlag Chemie: Weinheim.
- Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C. and Ribéreau-Gayon, P.** (1984) Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeast. Their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1246-1249.
- Larue, F., Geneix, C., Lafon-Lafourcade, S., Bertrand, A. and Ribéreau-Gayon, P.** (1984) Premières observations sur le mode d'action des écores de levure. *Conn. Vigne Vin* 19, 229-240.
- Lema, C., García-Jares, C., Orriols, I. and Angulo, L.** (1996) Contribution of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 206-216.
- Nordström, K.M. and Laakso, S.V.** (1992) Effect of growth temperature on fatty acid composition of ten *Thermus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1656-1660.
- O'Connor-Cox, E.S.C. and Ingledeew, W.M.** (1990) Effect of the timing of oxygenation on very high gravity brewing fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 48, 26-32.
- Quinn, A.J. and Chapman, D.** (1980) The dynamics of membrane structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8, 1-117.

Ratledge, C. and Evans, C.T. (1989) Lipids and their metabolism. In: *The Yeasts*, Vol. 3, 2 Edn. (Eds. A.H. Rose and J.S. Harrison) pp. 367-455. Academic Press: London.

Ravaglia, S. and Delfini, C. (1993) Production of MCFA and their ethyl esters by yeast strains isolated from musts and wines. *Ital. J. Food. Sci.* 1, 21-36.

Ravaglia, S. and Delfini, C. (1994) Inhibitory effects of medium fatty acids on yeast cells growing in synthetic medium and in sparkling Moscato wine “Asti Spumante”. *Vitic. Enol. Sci.* 49, 40-45.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. (2000) *Handbook of Enology, Volume I: The Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England.

Rosi, I. and Bertuccioli, M. (1992) Influences of lipid addition on fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma characteristics of experimental wines. *J. Inst. Brew.* 98, 305-314.

Rotmann, B.H. and Rehm, H.J. (1991) Relationship between fermentation capability and fatty acid composition of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Microbiol. Biotechnol.* 34, 502-508.

Rozès, N., Larue, F. and Ribéreau-Gayon, P. (1988) Effect of a variation of grape must temperature on the fermentation ability and the neutral lipid content of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 10, 821-824.

Rozès, N., García-Jares, C., Larue, F. and Lonvaud-Funel, A. (1992) Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J. Sci. Food Agric.* 59, 351-357.

Santamaría, M.P., López, R., Gutiérrez, A.R., Díez de Bethencourt, C.A. and García-Escudero, E. (1995) Incidence de la température de fermentation sur l'évolution des acides gras totaux. *J. Int. Sciences Vigne Vin* 29, 101-104.

Sierkstra, L.N., Verbakel, J.M.A. and Verrips C.T. (1992) Analysis of transcription and translation of glycolytic enzymes in glucose-limited continuous cultures of *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2559-2566.

Soufleros, E. and Bertrand, A. (1988) Les acides gras libres du vin: observations sur leur origine. *Conn. Vigne Vin* 22, 251-260.

Steels, E.L., Learmonth, R.P. and Watson, K. (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol.* 140, 569-576.

Straver, M.H., Aar, P.C.V.D., Smit, G. and Kijne, J.W. (1993) Determinants of flocculence of brewer's yeast during fermentation in wort. *Yeast* 9, 527-532.

Suomalainen, H. and Lehtonen, M. (1979) The production of aroma compounds by yeast. *J. Inst. Brew.* 85, 149-156.

Sutari, M., Liukkonen, K. and Laakso, S. (1990) Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1469-1474.

Sutari, M. and Laakso, S. (1994) Microbial fatty acids and thermal adaptation. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 20, 285-328.

Swan, T.M. and Watson, K. (1997) Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Can. J. Microbiol.* 43, 70-77.

Taylor, G.T., Thurston, P.A. and Kirsop, B.H. (1979) The influence of lipids derived from malt spent grains on yeast metabolism and fermentation. *J. Inst. Brew.* 85, 219-227.

Thompson, I.P., Bailey, M.J., Ellis, R.J. and Purdy, K.J. (1993) Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* 102, 75-84.

Valero, E., Millan, M.C., Mauricio, J.C. and Ortega, J.M. (1998) Effect of grape skin maceration on sterol, phospholipid, and fatty acid contents of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 119-124.

Watson, K. (1987) Temperature relations. In: *The yeast, Vol. 2: Yeast and Environment.* (Eds. A.H. Rose and J.S. Harrison) pp. 41-71. Academic Press Limited: London.

CAPÍTULO 8:

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA
EN LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE LOS
AZÚCARES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS**

INTRODUCCIÓN

La temperatura a la que se lleva a cabo la fermentación alcohólica afecta: (i) al crecimiento de las levaduras y por tanto, a la duración de la fermentación, (ii) a la importancia de unas determinadas especies respecto a otras, y (iii) a las reacciones bioquímicas del metabolismo de las levaduras y por tanto, a la composición química del producto obtenido (Fleet y Heard, 1993).

Aunque los productos más importantes de la transformación de la glucosa durante la fermentación alcohólica son el etanol y el dióxido de carbono, la producción de los denominados metabolitos secundarios son los que terminan dando unas características propias a cada uno de los vinos. Estos productos minoritarios, que varían dependiendo de la cepa y de las condiciones de fermentación, son muy importantes en el desarrollo del aroma del vino (alcoholes superiores, ésteres, ácidos orgánicos, aldehídos), (Walker, 1998). Por tanto, el estudio de la evolución intracelular de estos metabolitos secundarios puede proporcionar información sobre la actividad de las vías metabólicas implicadas en su producción en unas condiciones determinadas. La diferente actividad de dichas vías puede ser característica de una cepa o especie o un mecanismo de adaptación a variaciones en las condiciones ambientales.

Así, nuestro objetivo era estudiar la posible acumulación de algunos de los metabolitos derivados del catabolismo del carbono como consecuencia de las diferencias existentes en el metabolismo de las levaduras cuando realizan fermentaciones a distinta temperatura. Los productos secundarios analizados en este trabajo se centran en el glicerol (probablemente el producto secundario más importante en la fermentación alcohólica llevada a cabo *por S. cerevisiae*) y los ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos son los principales responsables de la acidez total del vino, siendo ésta uno de sus parámetros organolépticos más importantes (Boulton, 1980; Jackson, 1994; Ramon-Portugal *et al.*, 1999), ya que participa en la estabilidad, color, sabor y aroma del vino (Dartiguenave *et al.*, 2000). Aunque los principales ácidos orgánicos presentes en los vinos proceden del mosto, durante la fermentación alcohólica, la concentración de éstos puede modificarse por procesos metabólicos, además de producirse algunos nuevos, como los ácidos succínico o acético (Nagel y Herrick, 1989; Fowles, 1992) (ver Tabla 1).

Tabla 1. Origen de los principales ácidos orgánicos presentes en los vinos (Barre *et al.*, 1998)

Ácidos presentes en el mosto	Ácidos producidos durante la fermentación alcohólica
Ácido L(+) tartárico	Ácido L(+) láctico
Ácido L(+) málico	Ácido L(-) láctico
Ácido D(-) málico	Ácido succínico
Ácido cítrico	Ácido pirúvico
Ácido L(+) ascórbico	Ácido acético
Ácido oxálico	Ácido cetoglutárico
Ácido glicólico	Ácido citramálico
Ácido fumárico	Ácido glicérico
	Ácido dimetil glicérico
	Ácido fórmico
Ácidos grasos saturados e insaturados	

MATERIALES Y METÓDOS

Para realizar este estudio se han utilizado 3 cepas vónicas comerciales. Dos de las cepas eran *Saccharomyces cerevisiae* (RV1 y QA23 (Lallemand, S.A.) identificadas como A y B, respectivamente, para mantener la misma nomenclatura utilizada en el capítulo anterior), siendo A una cepa floculante. La otra cepa era de la especie *Saccharomyces bayanus* (Uvaferm UVA (Lallemand, S.A.) denominada C), que se comercializa como *S. uvarum*. Las tres cepas han sido identificadas mediante técnicas de Biología Molecular (Guillamón *et al.*, 1998).

Fermentaciones

Estos estudios se han realizado de forma paralela a los de ácidos grasos de membrana y compuestos volátiles explicados en el capítulo anterior, es decir, se han utilizado para los análisis, muestras de las mismas fermentaciones.

A modo de recordatorio: como medio se utilizó un mosto de uva blanca concentrado y se diluyó hasta una concentración inicial de azúcar de 240 g/l. El experimento se llevó a cabo en condiciones de semianaerobiosis. La población inoculada en cada fermentador fue de 2×10^6 cel/ml y el pH 3,70.

Las fermentaciones se incubaron por triplicado a 2 temperaturas (13 y 25°C) sin agitación.

Determinación de la concentración intra y extracelular de ácidos orgánicos, azúcares y alcoholes

Las membranas de las células fueron permeabilizadas y los metabolitos intracelulares extraídos mediante una solución tamponada de etanol hirviendo (Gonzalez *et al.*, 1997, ver Anexo 1). Los análisis se llevaron a cabo mediante HPLC, Hewlett-Packard HP 1050 conectado a un Hewlett Packard Integrator 3395A equipado con un detector HP 1047 RI (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). El extracto (25µl) fue inyectado en una columna 300 × 7,8 mm AMINEX HPX-87H (BioRad, Hercules, CA, USA). El solvente utilizado era H₂SO₄ 2,5 mM, previamente desgasificado, a un flujo constante de 0,5 ml/min. La temperatura de la columna era 60°C. La concentración de cada metabolito se calculó mediante una recta patrón y se expresó en mg/g de peso seco. El peso seco se determinó tal y como describió Sierkstra *et al.* (1992). Los metabolitos intracelulares se analizaron tanto en las levaduras secas (LSA) como durante la fermentación alcohólica (MF: densidad 1050; FF: densidad 990). En las fermentaciones a 13°C, debido al arranque más lento de la fermentación, se analizó también un punto inicial (IF: densidad 1090).

Para la determinación de los metabolitos extracelulares se utilizó el método anterior obviando el paso de la extracción. Se analizaron los vinos finales de cada una de las fermentaciones. Los extractos fueron inyectados de forma directa (sin dilución), y con diversas diluciones, para poder determinar aquéllos metabolitos que se encontraban a mayor concentración y por tanto estaban fuera de la linealidad del método. La concentración de cada metabolito se calculó mediante una recta patrón y se expresó en g/l.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las fermentaciones finalizaron excepto la que se inculó con la cepa de *S. bayanus* a 13°C (ver Capítulo 7, págs. 147-148).

La evolución de los metabolitos intracelulares estudiados a lo largo de la fermentación alcohólica se muestra en la Tabla 2.

Las levaduras secas presentaban composiciones diferentes de la mayoría de estos metabolitos, éste puede ser uno de los motivos por lo que unas LSA funcionan mejor que otras. Uno de los casos más claros era el relativo a la concentración de trehalosa en la LSA, ya que los contenidos en las tres levaduras secas eran significativamente diferentes, siendo la *S. cerevisiae* B

Tabla 2. Cambios en la composición intracelular de algunos metabolitos a lo largo de la fermentación alcohólica. Los valores están expresados en mg por g de peso seco y son las medias \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

T(°C)		Trehalosa	Cítrico	Tartárico	Piruvato	Málico	Succínico	Láctico	Glicerol	Acético	
<i>S. cerevisiae</i> A	25	LSA	37,6 \pm 0,6 ^{bc}	--	--	0,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,0 ^{bc}	0,3 \pm 0,0 ^{bc}	0,8 \pm 0,0 ^{bc}	2,0 \pm 0,1 ^{bc}	0,1 \pm 0,0 ^{bc}
		MF	--	4,6 \pm 0,2 ^b	1,3 \pm 0,2 ^{bc}	--	1,2 \pm 0,1 ^{bc}	0,5 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0 ^{bc}	3,1 \pm 0,2 ^{bc}	0,5 \pm 0,0 ^{bc}
		FF	0,7 \pm 0,1 ^{bc}	0,1 \pm 0,0 ^b	7,0 \pm 0,4 ^c	0,4 \pm 0,0 ^{bc}	0,4 \pm 0,0 ^{bc}	--	0,1 \pm 0,0 ^c	0,5 \pm 0,0 ^{bc}	0,1 \pm 0,0 ^c
	13	LSA	37,6 \pm 0,6 ^{bc}	--	--	0,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,0 ^{bc}	0,3 \pm 0,0 ^{bc}	0,8 \pm 0,0 ^{bc}	2,0 \pm 0,1 ^{bc}	0,1 \pm 0,0 ^{bc}
		IF	2,2 \pm 0,3 ^{bc}	7,3 \pm 0,3 ^{bc}	--	5,2 \pm 0,4 ^{bc}	1,9 \pm 0,1 ^{bc}	--	--	3,2 \pm 0,0 ^{bc}	4,8 \pm 0,4 ^{bc}
		MF	3,1 \pm 0,3 ^c	3,6 \pm 1,0 ^b	0,9 \pm 0,2 ^{bc}	2,0 \pm 0,1 ^{bc}	1,4 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2 ^c	--	5,3 \pm 0,0 ^{bc}	1,3 \pm 0,0 ^{bc}
<i>S. cerevisiae</i> B	25	LSA	105,7 \pm 0,5 ^{ac}	--	--	0,4 \pm 0,0	2,6 \pm 0,1 ^{ac}	2,7 \pm 0,1 ^a	1,8 \pm 0,1 ^{ac}	4,8 \pm 0,0 ^a	1,0 \pm 0,1 ^a
		MF	6,7 \pm 0,1 ^{ac}	7,2 \pm 0,3 ^{ac}	0,2 \pm 0,1 ^a	0,2 \pm 0,1 ^c	2,5 \pm 0,1 ^a	0,4 \pm 0,0	--	4,2 \pm 0,3 ^{ac}	1,8 \pm 0,0 ^{ac}
		FF	1,7 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^{ac}	6,4 \pm 0,6 ^c	1,1 \pm 0,0 ^{ac}	0,5 \pm 0,0 ^a	--	0,2 \pm 0,0 ^c	1,0 \pm 0,0 ^{ac}	0,2 \pm 0,0
	13	LSA	105,7 \pm 0,5 ^{ac}	--	--	0,4 \pm 0,0	2,6 \pm 0,1 ^{ac}	2,7 \pm 0,1 ^a	1,8 \pm 0,1 ^{ac}	4,8 \pm 0,0 ^a	1,0 \pm 0,1 ^a
		IF	--	13,8 \pm 0,5 ^{ac}	--	0,2 \pm 0,0 ^{ac}	0,7 \pm 0,1 ^{ac}	--	--	4,2 \pm 0,2 ^{ac}	2,4 \pm 0,1 ^a
		MF	3,5 \pm 0,3 ^c	6,0 \pm 0,4 ^{ac}	0,4 \pm 0,1 ^a	0,2 \pm 0,0 ^{ac}	1,7 \pm 0,3	0,4 \pm 0,1 ^c	--	2,9 \pm 0,1 ^{ac}	0,8 \pm 0,1 ^a
<i>S. bayanus</i> C	25	LSA	74,8 \pm 7,8 ^{ab}	--	--	0,3 \pm 0,0	3,7 \pm 0,6 ^{ab}	3,0 \pm 0,4 ^a	2,8 \pm 0,4 ^{ab}	5,8 \pm 0,8 ^a	0,8 \pm 0,1 ^a
		MF	--	4,15 \pm 0,9 ^b	0,5 \pm 0,1 ^a	1,1 \pm 0,3 ^{ab}	3,2 \pm 1,1 ^a	0,5 \pm 0,2	--	5,5 \pm 0,5 ^{ab}	1,3 \pm 0,2 ^{ab}
		FF	1,6 \pm 0,2 ^a	0,1 \pm 0,0 ^b	5,2 \pm 0,7 ^{ab}	0,3 \pm 0,0 ^{ab}	0,5 \pm 0,0 ^a	--	0,3 \pm 0,0 ^{ab}	0,9 \pm 0,0 ^{ab}	0,2 \pm 0,0 ^a
	13	LSA	74,8 \pm 7,8 ^{ab}	--	--	0,3 \pm 0,0	3,7 \pm 0,6 ^{ab}	3,0 \pm 0,4 ^a	2,8 \pm 0,4 ^{ab}	5,8 \pm 0,8 ^a	0,8 \pm 0,1 ^a
		IF	8,4 \pm 0,6 ^{ab}	--	--	2,8 \pm 0,2 ^{ab}	3,4 \pm 0,3 ^{ab}	--	2,0 \pm 0,2 ^{ab}	4,9 \pm 0,1 ^{ab}	2,4 \pm 0,3 ^a
		MF	--	3,6 \pm 0,1 ^b	0,2 \pm 0,0 ^a	4,8 \pm 0,2 ^{ab}	1,9 \pm 0,0 [*]	0,1 \pm 0,0 ^{ab}	--	4,2 \pm 0,2 ^{ab}	0,8 \pm 0,0 ^a
13	FF	0,5 \pm 0,1 ^{ab}	0,1 \pm 0,0 ^{ab}	6,5 \pm 0,4 ^{ab}	0,2 \pm 0,0 ^b	0,5 \pm 0,1 ^{ab}	--	0,2 \pm 0,0 ^a	0,6 \pm 0,1 ^{ab}	0,2 \pm 0,1 ^a	

-- no detectado
* significativamente diferentes respecto a 25°C (P \leq 0,05)
a,b,c significativamente diferentes respecto a la cepa indicada a la misma temperatura y momento de fermentación (P \leq 0,05)

la que presentaba una concentración mayor. Ésta podría ser una de las causas por la que esta cepa era la que mejor fermentaba (como se explicó en el capítulo anterior), ya que se cree que la trehalosa es importante para estabilizar las membranas y para la supervivencia de las células durante la rehidratación de las levaduras secas (Leslie *et al.*, 1994). Además, resulta interesante que la composición en estos metabolitos de la LSA depende de las condiciones del proceso de secado al que haya sido sometida (resultados no mostrados). Así, la misma cepa (*S. cerevisiae* A) analizada tras dos procedimientos de secado diferentes (a pequeña escala y a escala industrial) presentaba concentraciones diferentes prácticamente en todos los metabolitos estudiados, siendo la trehalosa, el caso más extremo, ya que esta cepa tras el proceso de secado a escala industrial presentaba niveles de trehalosa de $65,8 \pm 9,3$ mg/g de peso seco es decir, prácticamente el doble de lo determinado en este experimento ($37,6 \pm 0,6$ mg/g de peso seco).

La evolución de la trehalosa era claramente descendente, siendo prácticamente nula en los primeros días de fermentación, aunque en la mayoría de los casos aumentaba al final del proceso. Esto concuerda con lo descrito, niveles de trehalosa muy bajos en las células de levaduras que están en su fase exponencial, y un aumento cuando las células entran en fase estacionaria o están sometidas a situaciones de estrés (Thevelein, 1984). De todas formas, en algunas de nuestras fermentaciones se observaba una disminución de la concentración de trehalosa a final de fermentación, cosa que también se ha detectado en otros estudios (Gimeno-Alcañiz *et al.*, 1999).

Por lo que respecta a la evolución de los ácidos orgánicos durante la fermentación, la del ácido cítrico y tartárico eran opuestas. Ninguno de los dos ácidos formaba parte de la composición inicial en ninguna de las levaduras secas estudiadas. Pero así como el ácido cítrico se detectó en los primeros días de fermentación en concentraciones relativamente elevadas y luego fue disminuyendo hasta no ser detectado al final del proceso, el ácido tartárico sólo se detectó en las últimas etapas de la fermentación.

Esta acumulación inicial de ácido cítrico podía deberse a su entrada a través de la membrana, ya que este ácido se encuentra en el mosto, o por su síntesis "de novo". La entrada de este ácido a la célula debe ser por difusión simple en su forma no disociada, tal y como ocurre con los demás ácidos orgánicos, al desconocerse la presencia en *Saccharomyces* de alguna permeasa para ácidos dicarboxílicos o tricarboxílicos (Salmon, 1987). De todas maneras, al pH del medio (3,70) una de sus funciones ácido está desprotonada (ver pK_a s de este ácido en la Tabla 1 de la

Justificación y objetivos, pág. 16), por lo que se trata de una molécula cargada, lo que puede dificultar su entrada a través de la membrana.

La producción de ácido cítrico en la célula esta ligada al ciclo de Krebs. Durante las condiciones de la fermentación alcohólica (anaerobiosis y altas concentraciones de azúcar) la célula no necesita el ciclo del Krebs para la producción de energía, pero sí para la formación de ácidos orgánicos, ya que éstos son intermediarios en la síntesis de otros compuestos esenciales, como los aminoácidos.

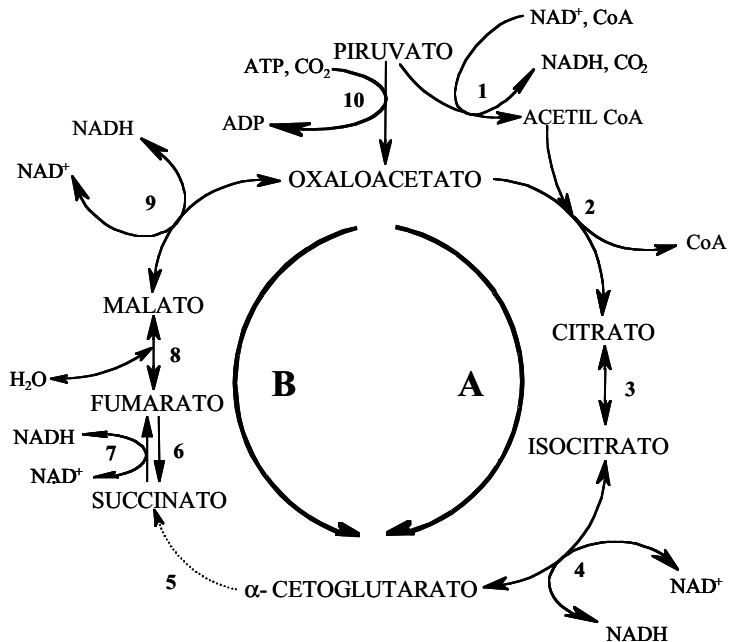


Figura 1. Esquema del funcionamiento teórico del ciclo de Krebs en condiciones enológicas (en el citosol). A) funcionamiento oxidativo; B) funcionamiento reductor.

(1): piruvato deshidrogenasa; (2): citrato sintasa; (3): aconitasa; (4): isocitrato deshidrogenasa; (5): α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa (reprimidas en condiciones enológicas); (6): succinato deshidrogenasa; (7): fumarato reductasa; (8): fumarasa; (9): malato deshidrogenasa; (10): piruvato descarboxilasa.

Aunque en condiciones enológicas (altas concentraciones de azúcar), la mitocondria no está funcional, los enzimas de esta vía (ciclo de Krebs) son sintetizados en el citosol con las

excepciones de la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la succinil-CoA sintetasa (Duntze *et al.*, 1969). Por tanto, en estas condiciones se cree que hay dos vías para metabolizar el piruvato (Figura 1): Una vía reductora en la que se forma ácido málico, fumárico y succínico y otra vía oxidativa en la que se forma ácido cítrico que es metabolizado para formar α -cetoglutarato, un intermediario muy importante en la síntesis de aminoácidos (Salmon *et al.*, 1987; Camarasa *et al.*, 1995; Boulton *et al.*, 1996; Barre *et al.*, 1998).

Este metabolismo del piruvato por estas dos vías se produce principalmente en las primeras horas de la fermentación alcohólica, ya que al inicio del proceso, la actividad de los enzimas que producen acetaldehído y el posterior etanol, es decir, la piruvato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa es baja, aunque inducible por glucosa. Esto significa que durante estas primeras horas, la reoxidación del NADH producido en la glucólisis se tiene que realizar por otra vía metabólica y la célula utiliza la denominada fermentación gliceropirúvica. Cuando una molécula de glicerol se forma quiere decir que una molécula de piruvato no va a ser transformada en etanol, con lo que el piruvato podría ser metabolizado por el ciclo del ácido cítrico, como se explica en la Figura 1. Es decir, que se produciría ácido succínico y α -cetoglutarato. Esto es lógico porque al inicio de fermentación, las células tienen necesidad de esqueletos de carbono para la síntesis de aminoácidos, especialmente si la principal fuente de nitrógeno es el amonio (Boulton *et al.*, 1996; Barre *et al.*, 1998).

De todas maneras, hay autores que explican la formación del ácido succínico mediante el funcionamiento normal (oxidativo) aunque más ralentizado del ciclo de Krebs. La producción de succínico en este caso se debería a que no se completa el ciclo de Krebs porque el enzima succinato deshidrogenasa, encargado de formar el ácido fumárico a partir de ácido succínico, requiere de la presencia de FAD, una coenzima estrictamente respiratoria, por lo que se acumularía ácido succínico (Oura, 1977; Heerde y Radler, 1978). Sea como fuere, la célula en las primeras horas de la fermentación, como no puede producir etanol, utiliza vías alternativas para mantener su estado redox, por lo que se produce glicerol y ácido succínico, que son los principales productos secundarios de la fermentación alcohólica.

El hecho, por tanto, de que en las fermentaciones estudiadas se apreciara una acumulación de ácido cítrico hasta la mitad del proceso, podía deberse a una menor actividad o eficiencia de los enzimas aconitasa y isocitrato deshidrogenasa en estas condiciones respecto a otros enzimas como la piruvato deshidrogenasa y citrato sintasa. Esta acumulación de ácido cítrico se producía en todas

las levaduras y a ambas temperaturas. Entre cepas, la B, fue la que más ácido cítrico acumulaba, lo cual podía ser una señal de que su metabolismo era el más activo y por eso, sus fermentaciones eran más rápidas. Entre temperaturas, prácticamente no había diferencias.

Esta acumulación de ácido cítrico podía relacionarse con la acumulación de piruvato que se producía sobre todo en las fermentaciones a 13°C, donde hasta mitad de fermentación se detectaron niveles elevados de piruvato. Esta acumulación puede explicarse de forma similar a la del ácido cítrico. Durante las primeras etapas de la fermentación cuando el piruvato es transformado en etanol todavía en pequeña proporción, la mayor velocidad de la glucólisis frente a las vías de metabolización del piruvato, hace que éste se acumule. En cambio, esto no ocurría en la fermentación a 13°C con la *S. cerevisiae* B, lo que podía deberse a que su metabolismo estuviese funcionando más correctamente, proporcionando una fermentación más rápida. Sin embargo, a 25°C, la concentración de piruvato en las cepas de *S. cerevisiae* era mayor a final de fermentación, lo cual podía indicar que las células ya estaban muy deterioradas y no eran capaces de metabolizar el piruvato.

Como la producción de ácido málico, succínico y láctico también es dependiente de la metabolización del piruvato, ésta es importante cuando el piruvato no es transformado en etanol, es decir, al inicio de la fermentación. De todas maneras, lo que resultaba sorprendente era que las levaduras secas presentasen niveles elevados de estos ácidos y de glicerol, ya que las levaduras secas se producen en condiciones de aerobiosis para formar gran cantidad de biomasa.

La evolución de estos ácidos durante la fermentación mostraba un descenso de su concentración con respecto del contenido que tenían en sus respectivas levaduras secas. *S. bayanus* y *S. cerevisiae* A, respectivamente, presentaban el mayor y menor contenido de estos ácidos en las levaduras secas, siendo las diferencias muy significativas. La presencia de estos ácidos en el vino final (Tabla 3) confirma que son excretados de la célula, ya que los ácidos succínico y láctico no están presentes en el mosto inicial (ver Tabla 1). De todas maneras, la forma en que los ácidos dicarboxílicos atraviesan la membrana es todavía una incógnita, aunque se cree que la salida del ácido succínico es función del potencial plasmático (Duro y Serrano, 1981).

El ácido acético, que también deriva del piruvato, aumentaba en la primera parte de la fermentación para disminuir al final del proceso, debido a su excreción al medio. Los niveles entre la cepa de *S. bayanus* y la *S. cerevisiae* B eran muy parecidos, siendo significativamente diferentes de la cepa de *S. cerevisiae* A, que presentaba niveles inferiores a 25°C y superiores a 13°C.

El glicerol, como era de esperar, aumentaba su concentración hasta mitad de fermentación, para luego ir disminuyendo. Se cree que éste atraviesa la membrana por difusión pasiva (Gancedo *et al.*, 1968), aunque también se ha descrito la posibilidad de la existencia de una proteína específica que realice esta función (Luyten *et al.*, 1994, 1995). Entre temperaturas había diferencias significativas en la concentración de glicerol en todas las levaduras tanto a mitad como a final de fermentación, aunque no existía una tendencia clara (2 cepas presentaban más concentración a 25°C y una (*S. cerevisiae* A) a 13°C). Entre cepas también habían diferencias, aunque éstas ya venían marcadas por la concentración inicial detectada en la levadura seca.

El ácido tartárico merece un tratamiento aparte del resto de los ácidos. Como hemos dicho anteriormente, este ácido se acumulaba a final de fermentación. Esta acumulación que se producía en todas las levaduras y a ambas temperaturas, era el resultado más sorprendente del estudio, ya que se trata de un ácido que no es metabolizado ni sintetizado por las levaduras. Además, no se conoce ninguna permeasa para el ácido tartárico en *S. cerevisiae*. De hecho, en este microorganismo, no hay descrita ninguna permeasa para ácidos dicarboxílicos (Salmon, 1987), por lo que la entrada del ácido tartárico debe ser por difusión simple de su forma no disociada. Esta entrada puede deberse a una simple difusión que la célula no puede evitar o formar parte de un mecanismo desconocido de transporte o de mantenimiento del pH intracelular. La explicación del porqué se acumula una vez ha entrado, parece clara con lo que se conoce sobre el transporte de ácidos dicarboxílicos. El ácido tartárico, en el interior celular, se desprotona debido al pH intracelular y por tanto, si realmente no existe ninguna permeasa para su salida, una molécula cargada no puede salir por difusión simple.

La acumulación de ácido tartárico a final de fermentación mostraba diferencias significativas tanto entre cepas como entre temperaturas, a excepción de las cepas de *S. cerevisiae* a 25°C, que acumulaban más ácido tartárico que *S. bayanus*. Entre temperaturas, en cambio, no había una tendencia clara, porque había dos cepas que presentaban una mayor concentración a 13°C y una que se comportaba de forma contraria (*S. cerevisiae* A). De todas maneras, no puede relacionarse una mayor concentración intracelular de ácido tartárico con problemas fermentativos, porque la cepa B presentaba los niveles superiores de ácido tartárico intracelular y en cambio fue la cepa que mejor fermentaba.

También se analizaron las concentraciones de estos compuestos en el vino obtenido (Tabla 3). Al observar las concentraciones de glucosa y fructosa se confirma que todas las fermentaciones acabaron excepto la que se realizó con la cepa de *S. bayanus* a 13°C. En general, se podía decir que los vinos finales obtenidos estaban influenciados tanto por la cepa como por la temperatura utilizada en la fermentación, ya que los vinos presentaban diferencias significativas en diferentes compuestos. La principal diferencia detectada en los vinos fermentados con diferentes especies de *Saccharomyces* se encuentra en la concentración de glicerol, ya que los vinos fermentados con la cepa de *S. bayanus* presentaban concentraciones superiores a las obtenidas con las cepas de *S. cerevisiae*, siendo además significativamente superiores a 25°C (excepto para la cepa A). Por lo que respecta al etanol, las diferencias no eran significativas ni entre cepas ni entre temperaturas.

Tabla 3. Análisis de los vinos finales obtenidos con las 3 cepas de levadura y a 2 temperaturas diferentes. Los resultados están expresados en g/l y son las medias ± desviación estándar de tres experimentos independientes

	<i>S. cerevisiae</i> A		<i>S. cerevisiae</i> B		<i>S. bayanus</i> C	
	25°C	13°C	25°C	13°C	25°C	13°C
Ac. cítrico	0,1±0,0 ^b	0,1±0,0 ^c	0,2±0,0 ^{ac}	0,1±0,0 ^{*c}	0,1±0,0 ^b	0,1±0,0 ^{ab}
Ac. tartárico	1,0±0,0 ^b	1,0±0,1	1,2±0,0 ^{ac}	1,0±0,0 [*]	0,9±0,1 ^b	1,0±0,1
Glucosa	0,5±0,0	0,6±0,0 ^c	0,6±0,0	0,6±0,0 ^c	0,5±0,0	1,7±0,3 ^{*ab}
Ac. málico	2,4±0,1 ^{bc}	1,7±0,1 ^{*c}	1,9±0,1 ^a	1,7±0,1 ^{*c}	1,9±0,2 ^a	1,0±0,1 ^{*ab}
Fructosa	0,7±0,1	1,7±0,2 ^c	1,8±0,4	1,7±0,6 ^c	1,0±0,5	21,8±2,6 ^{*ab}
Ac. succínico	0,6±0,0	0,6±0,1 ^b	0,6±0,0	0,4±0,0 ^{*ac}	0,7±0,0	0,5±0,0 ^{*b}
Ac. láctico	0,1±0,0 ^{bc}	0,1±0,0 [*]	0,2±0,0 ^{ac}	0,1±0,0 ^{*c}	0,1±0,0 ^{ab}	0,1±0,0 ^b
Glicerol	7,2±0,3 ^{bc}	7,5±0,4 ^{bc}	8,6±0,1 ^{ac}	6,7±0,4 ^{*ac}	11,1±0,1 ^{ab}	10,3±0,2 ^{*ab}
Ac. acético	0,7±0,0 ^{bc}	0,7±0,0 ^b	0,5±0,0 ^{ac}	0,4±0,0 ^{*ac}	0,9±0,0 ^{ab}	0,7±0,0 ^{*b}
Etanol	111,4±5,8	110,4±5,2	110,8±0,7	107,4±3,9	113,6±0,4	109,7±3,4

* significativamente diferentes respecto a 25°C (P≤0,05)

^{a,b,c} significativamente diferentes respecto a la cepa indicada a la misma temperatura (P≤0,05)

Como conclusión, distintas cepas de levaduras presentan tras el proceso de secado porcentajes diferentes de prácticamente todos los metabolitos estudiados, lo que puede influir en que unas levaduras fermenten mejor que otras, sobre todo en lo que se refiere a la trehalosa. Además, la forma de realizar dicho secado también puede tener gran influencia. De todas maneras, el resultado más curioso es la acumulación de ácido tartárico por parte de las levaduras a final de

fermentación, y en general, la importancia de los ácidos orgánicos en las fermentaciones, lo que requiere de un estudio más exhaustivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Barre, P., Blondin, B., Dequin, S., Feuillat, M., Sablayrolles, J.M. y Salmon, J.M.** (1998) La levure de fermentation alcoolique. In: *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques*. (Ed. C. Flanzy) pp. 414-495. Technique & Documentation Lavoisier: Paris.
- Boulton, A.** (1980) The relationships between total acidity, titratable acidity and pH in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 31, 76-80.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. y Kunkee, R.E.** (1996) *Principles and practices of winemaking*. Chapman and Hall, New York.
- Camarasa, C., Salmon, J.M., Grivet, J.P., Ansanay, V., Dequin, S. y Barre, P.** (1995) Non functionality of TCA cycle under glucose catabolite repression in a *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain expressing the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactobacillus lactis* (mleS). *European Research Conferences: «Control of metabolic fluxes: metabolic pathway engineering in yeasts»*, Grenade, 7-12.
- Dartiguenave, C., Jeandet, P. y Maujean, A.** (2000) Study of the contribution of major organic acids of wine to the buffering capacity of wine in model solutions. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 352-356.
- Duntze, W., Neumann, J.M., Gancedo, W., Atzpodien, W. y Holzer, H.** (1969) Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 10, 83-89.
- Duro, A.F. y Serrano, R.** (1981) Inhibition of succinate production during yeast fermentation by deenergization of plasma membrane. *Curr. Microbiol.* 6, 111-113.
- Fleet, G.H. y Heard, G.M.** (1993) Yeast growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers: Switzerland.
- Fowles, G.W.A.** (1992) Acids in grapes and wines: A review. *J. Wine Res.* 3, 25-41.
- Gancedo, C., Gancedo, J.M. y Sols, A.** (1968) Glycerol metabolism in yeast: pathways of utilization and production. *Eur. J. Biochem.* 5, 165-172.
- Gimeno-Alcañiz, J.V., Pérez-Ortín, J.E. y Matallana, E.** (1999) Differential pattern of trehalose accumulation in wine yeast strains during the microvinification process. *Biotechnol. Lett.* 21, 271-274.
- Gonzalez, B., François, J. y Renaud, M.** (1997) A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13, 1347-1356.
- Guillamón J.M., Sabaté J., Barrio E., Cano J. y Querol A.** (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
- Heerde, E. y Radler, F.** (1978) Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 117, 269-276.
- Jackson, R.S.** (1994) *Wine Sciences: Principles and applications*. (Ed. S.L. Taylor). Academic Press, University of Nebraska.

Leslie, S.B., Teter, S.A., Crowe, L.M. y Crowe, J.H. (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 7-13.

Luyten, K., Albertyn, J., Skible, F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M. y Hohmann, S. (1994) The FPS1 gene product function as a glycerol facilitator in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* 39, 534-536.

Luyten, K., Albertyn, J., Skible, F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M. y Hohmann, S. (1995) FPS1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* 14, 1360-1371.

Nagel, C.W., y Herrick, I.W. (1989) The effect of malate or lactate content on the pH-TA relationship of potassium bitartrate saturated alcohol-water solutions. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 81-84.

Oura, E. (1977) Reaction products of yeast fermentations. *Prosess. Biochem.* 12, 19-21.

Ramon-Portugal, F., Seiller, I., Taillandier, P., Favarel, J.L., Nepveu, F. y Strehaiano, P. (1999) Kinetics of production and consumption of organic acids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 37, 235-240.

Salmon, J.M. (1987) L-Malic acid permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 901, 30-34.

Salmon, J.M., Vezinhet, F. y Barre, P. (1987) Anabolic role of L-malic acid in *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobiosis during alcoholic fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* 42, 213-220.

Sierkstra, L.N., Verbakel, J.M.A. y Verrips C.T. (1992) Analysis of transcription and translation of glycolytic enzymes in glucose-limited continuous cultures of *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2559-2566.

Thevelein, J.M. (1984) Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.* 48, 42-59.

Walker, G.M. (1998) *Yeast physiology and biotechnology.* Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England.

CAPÍTULO 9:

**EFFECT OF ORGANIC ACIDS AND THE NITROGEN
SOURCE ON ALCOHOLIC FERMENTATION: STUDY OF
THEIR BUFFERING CAPACITY**

M.J. Torija, G. Beltran, M. Novo, M. Poblet, N. Rozès, A. Mas y J.M. Guillamón

Journal of Agricultural and Food Chemistry
(enviado para su publicación)

ABSTRACT

The effect of tartaric acid and other organic acids on the alcoholic fermentation was studied. Organic acids in media with high sugar concentrations and ammonium as the sole nitrogen source had an enormous impact on *S. cerevisiae* metabolism during alcoholic fermentation. The main effect on yeast metabolism was the quick acidification of the media in the absence of organic acids. All the organic acids used in this study (tartaric, malic, citric and succinic acids) showed buffering capacity but not all the acids had the same one. However, our results suggested that buffering should not to be considered the only effect of organic acids on yeast metabolism. Nitrogen source also had a great influence on the media pH. Ammonium consumption by yeasts produced a greater acidification of the media than when amino acids were used.

INTRODUCTION

Acidity is one of the most important organoleptic parameters in wine and is mainly due to the presence of weak organic acids. Practically all of these acids in wine are already present in the grapes. However, very small quantities of such organic acids as succinic and acetic acids are produced during alcoholic fermentation (Ramon-Portugal *et al.*, 1999). The composition and concentration of each acid is essential for the quality of the final wine (Herrero *et al.*, 1999). The concentration of the acids depends on factors such as the nature of the grape must, the microbial activity of the yeast strain, and the oenological practices involved in winemaking (Ramon-Portugal *et al.*, 1999).

Tartaric and malic acids are the main acids in grapes (up to 90%) and, therefore, the main cause of wine acidity. Other organic acids (succinic, citric, pyruvic, lactic, gluconic acids, etc.) are in low molar concentrations and contribute little to the titratable acidity and pH of wine. The tartaric/malic acid ratio varies considerably from one variety to another. While tartaric acid concentration remains practically constant during grape ripening, malic acid decreases (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). As a result, the grape must of most varieties contains more tartaric than malic acid. Moreover, some *Saccharomyces* strains can consume a small proportion of the malic acid initially present in the grape must (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Tartaric acid, on the other hand, and not another less stable acid such as malic or citric acid is added to must grapes that are deficient in acidity because it is resistant to degradation and metabolism by wine

microorganisms. In spite of this microbial stability, tartaric acid concentration decreases slowly in wine because it is precipitated as potassium and calcium salts during fermentation.

However, organic acids are not important just because of their organoleptic contribution. They also play an important biotechnological role in industrial fermentations. These acids are in equilibrium with their salts; they act as a buffer, and thus maintain the pH of wines in the range from 2.9 to 4 (Dartiguenave *et al.* 2000a). Actively growing yeasts acidify their medium through a combination of differential ion uptake, proton secretion during nutrient transport, direct secretion of organic acids and CO₂ evolution (Walker, 1998). Therefore, the buffering capacity of grape must is important to prevent alterations in the pH of the medium, which can affect the cytosolic pH of yeast and its metabolism during wine fermentation, i.e. ethanol production appears to be particularly sensitive to alterations in the pH of the medium.

Lastly, it should be taken into account that many yeasts are able to use certain carboxylic acids for growth. For this reason, an understanding of organic acid transport in yeasts is important not only because yeasts use organic acids as sources of carbon for growth but also because they could control the intracellular pH and contribute to the intracellular charge balance by enhancing K⁺ ion uptake (Jennings, 1995; Walker, 1998). In *Saccharomyces cerevisiae*, two different uptake systems for monocarboxylic acids are known: one is shared by acetic, propionic and formic acids and the other transports lactic, pyruvic, acetic and propionic acids (Cassio *et al.*, 1987; Casal *et al.*, 1995, 1996). On the other hand, no permeases for dicarboxylic acids have been described in *S. cerevisiae* and these acids are assumed to enter the cell in the undissociated form. So the undissociated acid traverses the cell membrane and then dissociates in the higher pH environment of the cytosol, causing both a cytoplasmic acidification and intracellular accumulation of the membrane-impermeant acid anion (Cheng *et al.*, 1999). In other yeast species, however, some dicarboxylic acid permeases have been identified, and they are usually related to malic acid transport. The uptake system is usually a malate-proton symport that normally accepts other dicarboxylic acids such as D-malic, succinic and fumaric acids but has never been described as accepting tartaric acid. This kind of permease occurred in *Kluyveromyces marxianus* (Queiros *et al.*, 1998), *Schizosaccharomyces pombe* (Sousa *et al.*, 1992), *Candida utilis* (Cassio and Leão, 1993) and *Hansenula anomala* (Côrte-Real and Leão, 1990). In *Hansenula anomala* (Corte-Real and Leão, 1990) and *Candida utilis* (Cassio and Leão, 1991), a similar permease for citric has also been described but it is not permeable to tartaric acid.

The aim of the present work was to study how the concentration of tartaric acid and other organic acids in wine affect the evolution of the pH of the growth medium and the *Saccharomyces* metabolism during alcoholic fermentation. Because grape musts can vary, we mainly used a defined medium, the sugar concentration of which was similar to that of grape must. As well as ammonia, the compound that accounts for 40% of all available nitrogen in must, we used amino acids as the source of nitrogen. Amino acids contain both a weak acid and a weak base functional group, so they may act as buffers in the same way as organic acids did.

MATERIALS AND METHODS

Fermentation experiments

Effect of organic acids

The fermentations were carried out in a defined medium which consisted of: 100 g l⁻¹ glucose, 100 g l⁻¹ fructose and 1.7 g l⁻¹ yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulphate (Difco, Detroit, USA). The nitrogen source used was 5 g l⁻¹ of ammonium sulphate.

Several organic acids were added to the defined medium to determine the effect they had on fermentation:

- Tartaric acid: increasing concentrations of 1, 2.5, 5, 10, 20 g l⁻¹ were tested.
- Malic, citric and succinic acid: concentrations of 1 and 5 g l⁻¹ were tested.

All the fermentations were carried out with an initial pH of 3.5 adjusted with NaOH 0.1N.

Effect of media pH

The effect of the pH on fermentation was studied with and without tartaric acid (5 g l⁻¹). Initial pHs were: 2.5, 3.5, 4.5 and 5.5, adjusted with NaOH 0.1 N or HCl 0.1 N.

Effect of nitrogen source

The effect of the nitrogen source, with and without tartaric acid (5 g l⁻¹), was analysed under the following conditions:

- a) 5 g l⁻¹ of ammonium sulphate. The total assimilable nitrogen (TAN: it includes α -amino acids (except proline) and ammonia) analysed by the formol index method (Aerny, 1996) was 1 g l⁻¹.
- b) 0.5 g l⁻¹ of ammonium sulphate, TAN was 0.1 g l⁻¹.

- c) A solution (1.53 g l^{-1}) containing the following amino acids: 0.4 g l^{-1} of arginine and proline; 0.15 g l^{-1} of glutamic acid; 0.1 g l^{-1} of glutamine, threonine and serine; 0.05 g l^{-1} of alanine; 0.04 g l^{-1} of aspartic acid and leucine; 0.02 g l^{-1} of lysine, phenylalanine, histidine, isoleucine, valine, glycine and tyrosine; 0.005 g l^{-1} of tryptophane and methionine. The TAN in the fermentor was 0.1 g l^{-1} .
- d) 1.53 g l^{-1} of amino acids and 4.5 g l^{-1} of ammonium sulphate, TAN was 1 g l^{-1} .

All these experiments were carried out with an initial pH of 3.5 adjusted with NaOH 0.1 N.

The fermentations were performed in 500-ml bottles filled with 450 ml of the defined medium and covered with a cotton cap. A commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine strain QA23 (Lallemand S.A., Toulouse, France) was inoculated at the initial population of $2 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$. All fermentations were carried out at $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Every day the CO_2 released was assessed by measuring the weight loss. In the latter stages of the fermentation, the sugar consumption was assayed by enzymatic kits (Boehringer Mannheim, Germany). Fermentation was considered to be over when the residual sugars were below 2 g l^{-1} . The pH was monitored throughout the fermentation with a Crison micro pH-meter (Crison Instruments, S.A., Barcelona, Spain). Consumption of ammonium was also assayed by enzymatic kits (Boehringer).

Maximal fermentation rate was the maximal slope obtained from the plot of sugar consumption versus fermentation day and was expressed as the concentration of sugar consumed (in g l^{-1}) per day.

Fermentations with grape must

The medium was prepared from concentrated white must (Concentrados Palleja, Riudoms, Spain) which was diluted with water to obtain a final sugar concentration of 220 g l^{-1} (1:4). Fermentations were performed in 2-litre bottles filled with 1.8 l of medium and fitted with closures that enabled the carbon dioxide to escape and the samples to be removed, but excluded atmospheric oxygen. The inoculated population of yeast was $2 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$.

The fermentations were incubated at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ without shaking.

Intracellular metabolites

Membrane cells were permeabilised and the intracellular metabolites extracted using boiling buffered ethanol, as described by Gonzalez *et al.* (1997). Analytical HPLC was carried out

on a Hewlett-Packard HP 1050 connected to a Hewlett-Packard Integrator 3395A equipped with an HP 1047 RI detector (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). The extract (25 μ l) was injected into a 300 \times 7.8 mm AMINEX HPX-87H column (BioRad, Hercules, CA, USA). The solvent used was H₂SO₄ 2.5 mM at 0.5 ml min⁻¹. The analysis temperature was 60°C. The concentration of each metabolite was calculated using external standards and expressed as mg g⁻¹ dry cell weight. Dry cell weight determination was performed as previously described by Sierkstra *et al.* (1992).

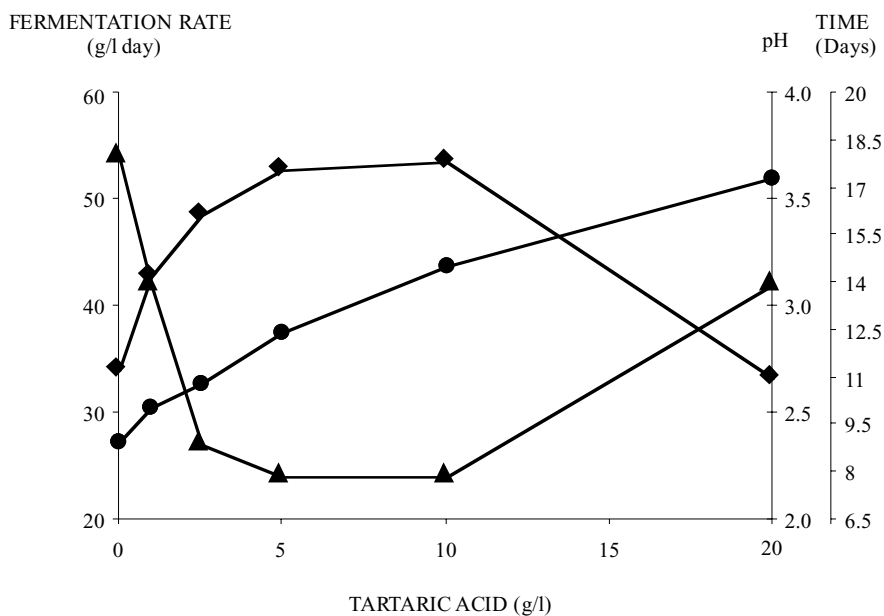


Figure 1. Changes in maximal fermentation rate (ν), final fermentation day (\blacktriangle) and final fermentation pH (λ) as a function of tartaric acid concentration.

RESULTS

Effect of tartaric acid concentration on the alcoholic fermentation and the changes in pH

The yeast fermentation rate depends on various physical, chemical and biological factors in the environment such as temperature, pH, nutritional compounds, etc. A defined medium with different concentrations of tartaric acid (0, 1, 2.5, 5, 10 and 20 g l⁻¹) was inoculated with a

commercial *S. cerevisiae* wine strain. Fermentations were carried out at 25°C and the initial pH was adjusted to 3.5. Sugar consumption was monitored daily. Tartaric acid concentrations of 5 and 10 g l⁻¹ gave the highest fermentation rate and the shortest fermentation time (Figure 1). Below and above these optimal concentrations, the maximal rate decreased. Fermentation stuck after 18 days when no tartaric acid was present in the medium, leaving 32 g l⁻¹ of unfermented sugars. On the other hand, the start of sugar consumption was delayed in the medium that had the highest tartaric acid concentration (20 g l⁻¹), but fermentation was completed (data not shown). The buffering capacity of the tartaric acid was tested by measuring the final fermentation pH. The initial pH decrease was inversely proportional to the concentration of tartaric acid in the medium. When there was no acid in the medium, the final pH was minimum (*ca.* 2.4) while the final pH of the medium with the highest concentration of acid (20 g l⁻¹) had the same initial value (3.5) (Figure 1).

Table 1. Kinetic parameters and final pH of fermentations with different initial pHs in absence or presence of tartaric acid.

pH		Day of FF ^a	MFR ^b	[Sugar] _f	pH final
2.5	Control	21 ^c	25.91	50.61	2.287
	5 g l ⁻¹ TA ^d	28	31.16	1.95	2.539
3.5	Control	21 ^c	30.20	19.86	2.390
	5 g l ⁻¹ TA	9	45.19	0.95	3.044
4.5	Control	21 ^c	31.90	20.17	2.448
	5 g l ⁻¹ TA	7	54.21	1.9	3.623
5.5	Control	21 ^c	33.61	12.52	2.484
	5 g l ⁻¹ TA	9	51.97	1.03	3.772

^a Final fermentation.

^b Maximal fermentation rate.

^c Stuck fermentation.

^d Tartaric acid.

The effect of different initial pHs was analysed in fermentations with (5 g l⁻¹) or without tartaric acid. The most striking result was that none of the controls (fermentations without tartaric acid) were able to ferment all sugars (Table 1). However, the addition of tartaric acid was enough for the yeast to complete all the fermentations whatever the initial pH. Fermentations with tartaric acid at

pHs of 3.5, 4.5 and 5.5 lasted about the same time, while the fermentation at pH 2.5 took longer and had a lower rate. All the control fermentations (without acid) had similar final pHs (ranging from 2.2 to 2.5) regardless of the initial pH. Fermentation with acid at pH 2.5 also had a similar final value (2.5) but, as mentioned above, sugars were consumed.

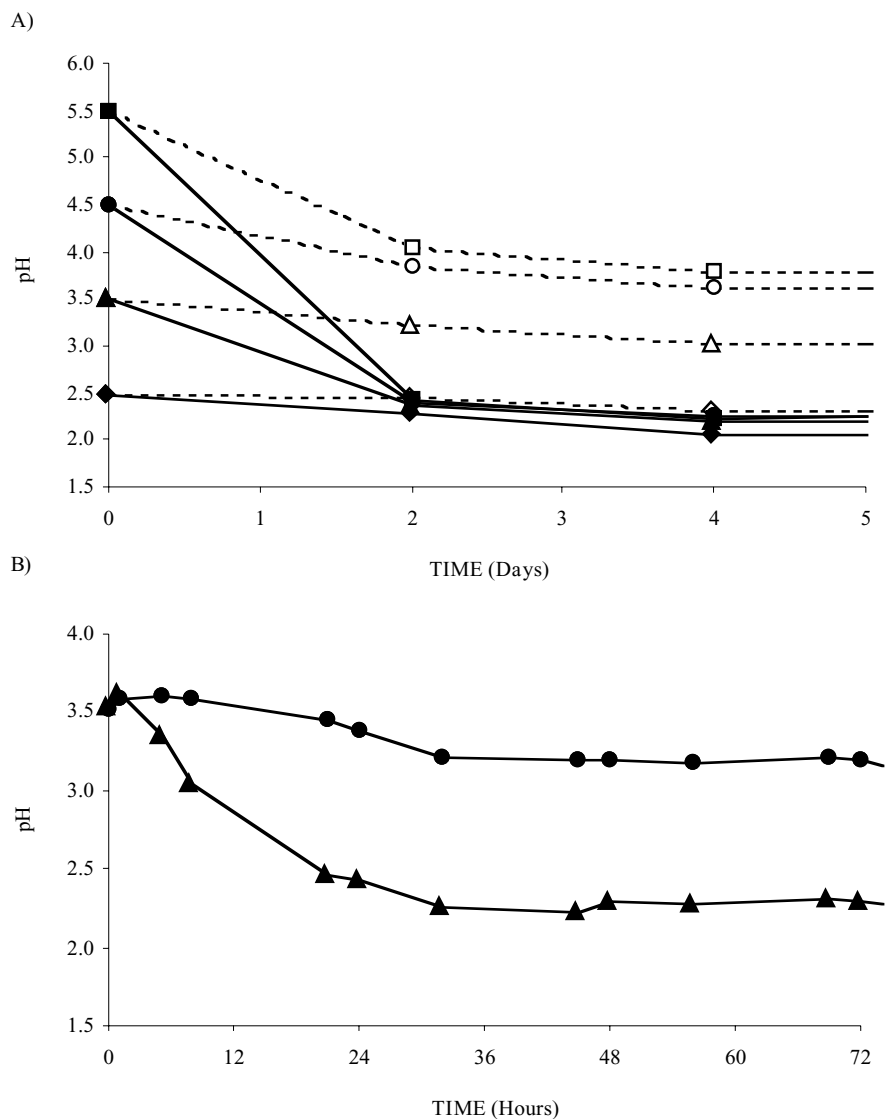


Figure 2. Evolution of pH throughout the fermentation.

A) Evolution of pH starting from different initial pHs in fermentations with (dotted line and open symbol) and without tartaric acid (straight line and full symbol). Initial pHs: 2.5 (\diamond); 3.5 (Δ); 4.5 (γ); 5.5 (\blacklozenge).

B) Evolution of pH in a fermentation with (λ) and without (\blacktriangle) tartaric acid in the first hours of the process.

The evolution of the pHs during the above fermentations was also monitored during the process (Figure 2A). The minimum was reached after two days of fermentation and remained unchanged. Moreover, to check the initial pH changes, it was also monitored during the first hours of fermentations with and without tartaric acid in the media (Figure 2B). The acidification of the medium without acid started in the first hours of fermentation and the minimal pH was practically reached after 24 hours.

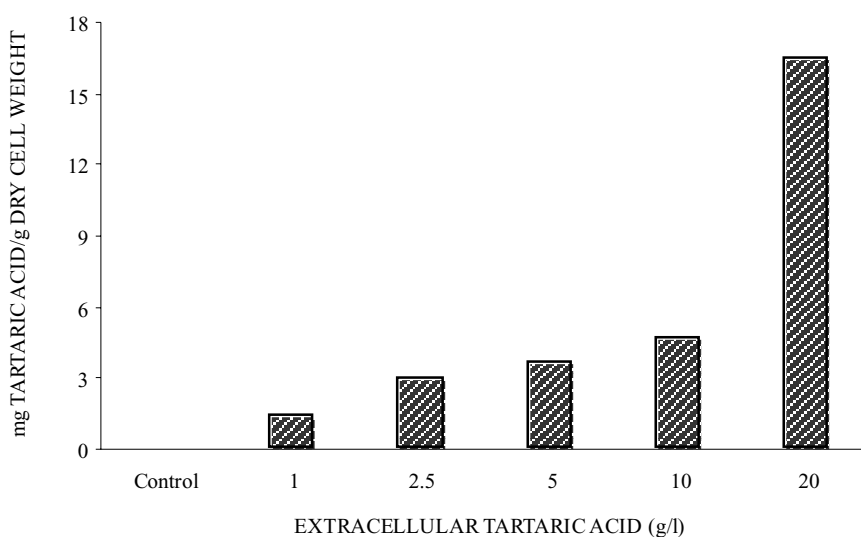


Figure 3. Final intracellular concentration of tartaric acid after fermentations with different concentrations of tartaric acid in the media.

Analysis of the intracellular concentration of organic acids

The intracellular concentration of tartaric acid was studied in the fermentations with different concentrations of tartaric acid in the media. Tartaric acid accumulated inside the cells throughout the fermentations (data not shown), and reached maximal concentration at the end of the process (Figure 3). There was a good relation between the extracellular and intracellular concentrations of the acid, with the exception of the medium with 20 g l^{-1} whose cells accumulated

a large amount of tartaric acid at the end of the process. The intracellular tartaric acid concentration was also determined in fermentations at different pHs and was found to be similar regardless of the initial pH (data not shown).

A fermentation with grape must was carried out and the intracellular organic acids were quantified to analyse this accumulation in vinification conditions (Figure 4). A similar intracellular concentration of the total organic acids was detected in all the samples analysed (*ca.* 8-13 mg g⁻¹ dry cell weight). Malic, succinic and lactic acids were the main organic acids in dry yeast. Citric acid was the main intracellular acid in the middle stage of fermentation. However, tartaric acid, which was practically undetectable until mid fermentation, was clearly accumulated in the latter phases of the process.

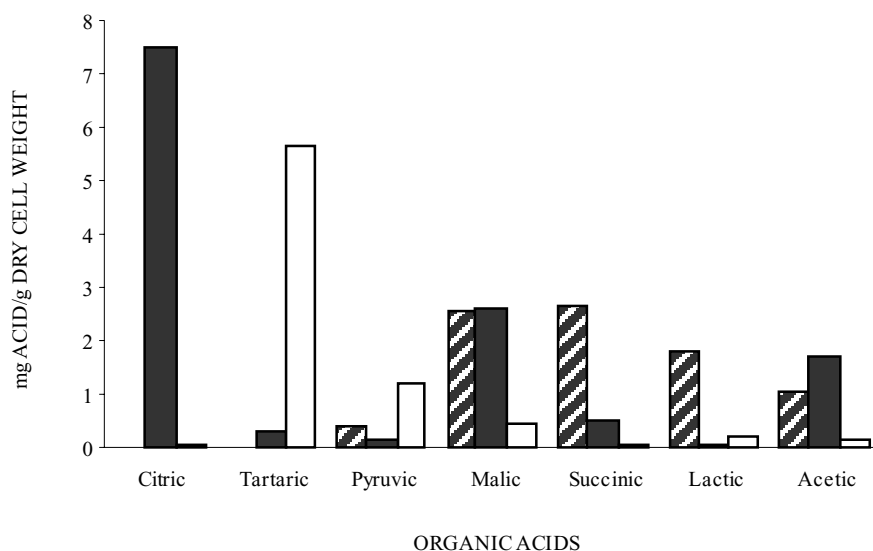


Figure 4. Intracellular concentration of the main organic acids throughout an alcoholic fermentation of grape must at 25 °C.

▨ Dry yeast; ■ Mid fermentation (MF); □ Final fermentation (FF).

Effect of other wine organic acids on alcoholic fermentation and pH evolution

Other wine organic acids were also tested in these fermentations since they appeared to be important in fermentations performed with grape must. Malic and succinic acids were used as dicarboxylic acids and citric acid as the tricarboxylic acid at different concentrations (Table 2).

Table 2. Kinetic parameters and final pH of fermentations with the addition of organic acids at different concentrations.

Acid	[Acid]	Day of FF ^a	MFR ^b	pH final
Control	-	18 ^c	33.93	2.550
Tartaric	1 g l ⁻¹	14	42.77	2.605
Malic		14	40.79	2.543
Citric		22	35.29	2.583
Succinic		22 ^c	35.41	2.481
Tartaric	5 g l ⁻¹	8	52.63	3.154
Malic		10	52.17	3.008
Citric		10	43.90	2.984
Succinic		10	44.06	2.847
Tartaric+Malic	1g l ⁻¹ + 1g l ⁻¹	12	45.33	2.666
	5g l ⁻¹ + 5g l ⁻¹	10	49.16	3.316
Tartaric+Citric	5g l ⁻¹ + 0.5g l ⁻¹	9	51.37	3.202

^a Final fermentation

^b Maximal fermentation rate

^c Stuck fermentation

At low concentrations (1 g l⁻¹), media with tartaric or malic acid had the highest fermentation rate and the shortest fermentation. With citric acid, the end of fermentation was delayed but all sugars were exhausted while fermentation stuck when succinic acid was used. It should be taken into account that although the concentration (in g l⁻¹) was equal for all the acids studied, the molarity was obviously different. Problems in fermentation with succinic acid, however, cannot be explained in this way because the fermentation with succinic acid was the one with the highest molarity. The pH of these fermentations (Figure 5A) evolved in a similar way to the control fermentation with differences lower than 0.2 units. Anyway, the pH of control and succinic acid fermentations decreased the most.

All the fermentations finished in similar times when 5 g l⁻¹ of acid was used in the media (Table 2). Fermentations with tartaric or malic acids again gave the highest maximal fermentation rate. In these conditions, there were clear differences in the pH changes (Fig. 5B). The pH of all fermentations with an organic acid in the medium was clearly higher than that of the control. But

there were also considerable differences between the various acids tested. The minimal and maximal decreases in pH were for tartaric and succinic acid, respectively.

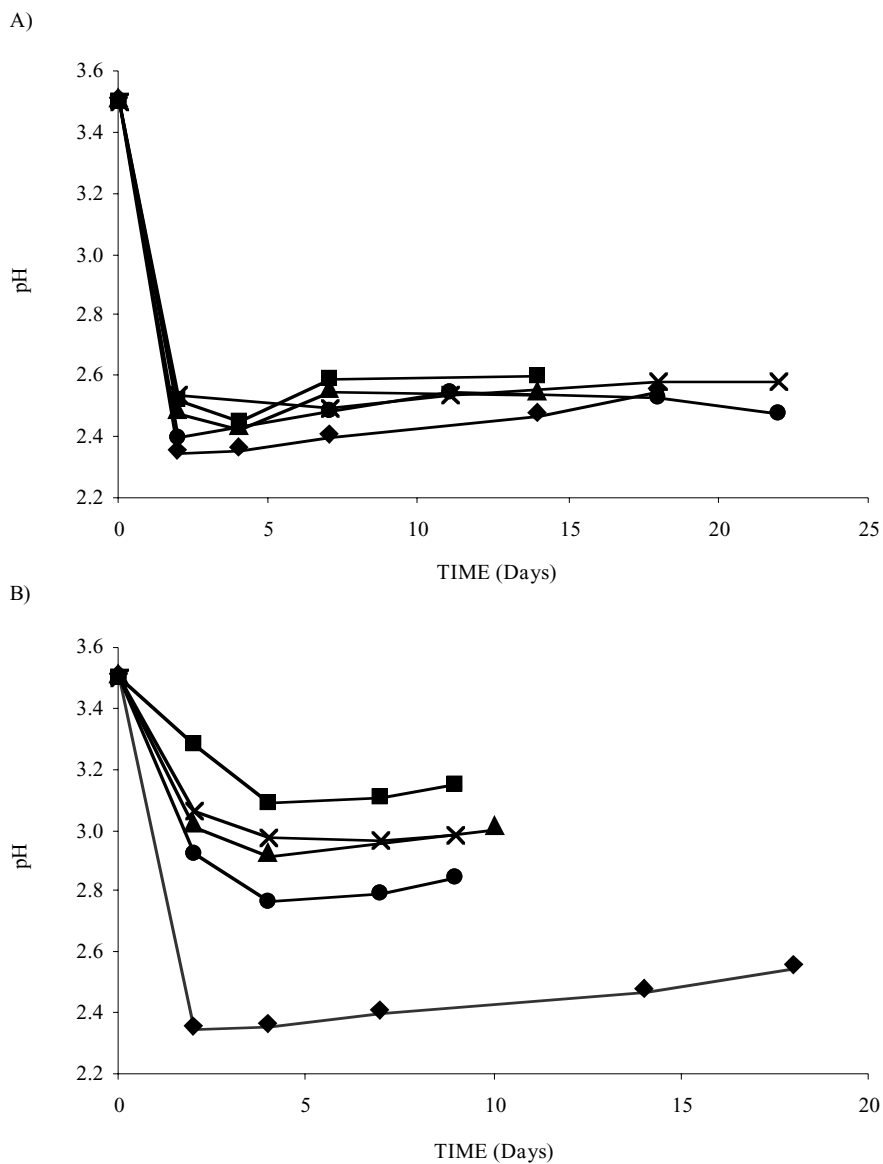


Figure 5. Evolution of pH in fermentations with different organic acids **A)** 1 g l⁻¹ of acid; **B)** 5 g l⁻¹ of acid.

∪ Control; ∨ Tartaric acid; ▲ Malic acid; × Citric acid; λ Succinic acid

Combinations of acids affected neither the development of the fermentation nor the buffering capacity (in comparison with the same concentration of tartaric acid only), (Table 2).

Effect of the nitrogen source on alcoholic fermentation and pH evolution

Up to now all fermentations have been carried out with ammonia as the sole nitrogen source but amino acids are also important sources of nitrogen for yeast during wine fermentations. Table 3 shows how alcoholic fermentation and pH are affected when amino acids are the only nitrogen source or when they are mixed with ammonia. Ammonia and amino acid concentrations are expressed as total assimilable nitrogen.

Table 3. Kinetic parameters and final pH of fermentations with different nitrogen sources in absence or presence of tartaric acid.

N Source	TAN^a		Day of FF^b	MFR^c	pH final
NH ₄ ⁺	1 g l ⁻¹	Control	18 ^d	33.93	2.379
		5 g l ⁻¹ TA ^e	8	52.63	3.154
	0.1 g l ⁻¹	Control	22 ^d	25.81	2.313
		5 g l ⁻¹ TA	15	33.51	3.278
aas	0.1 g l ⁻¹	Control	10	38.87	2.727
		5 g l ⁻¹ TA	11	45.15	3.525
aas + NH ₄ ⁺	1 g l ⁻¹	Control	14	36.69	2.461
		5 g l ⁻¹ TA	11	38.61	3.228

^a Total assimilable nitrogen

^b Final Fermentation

^c Maximal fermentation rate

^d Stuck fermentation

^e Tartaric acid

When tartaric acid was not present in the media, changes in the ammonia concentration were not enough to prevent stuck fermentations. All the ammonia was consumed in the first two

days of fermentation when 0.1 g l^{-1} of assimilable nitrogen was present. However, a large amount of ammonia remained in the medium when 1 g l^{-1} was used (data not shown). But the fermentation ended when this minimal concentration of assimilable nitrogen (0.1 g l^{-1}) consisted of amino acids. Oddly enough, fermentation with a mixture of ammonium and amino acids was slower than when only amino acids were used (Table 3).

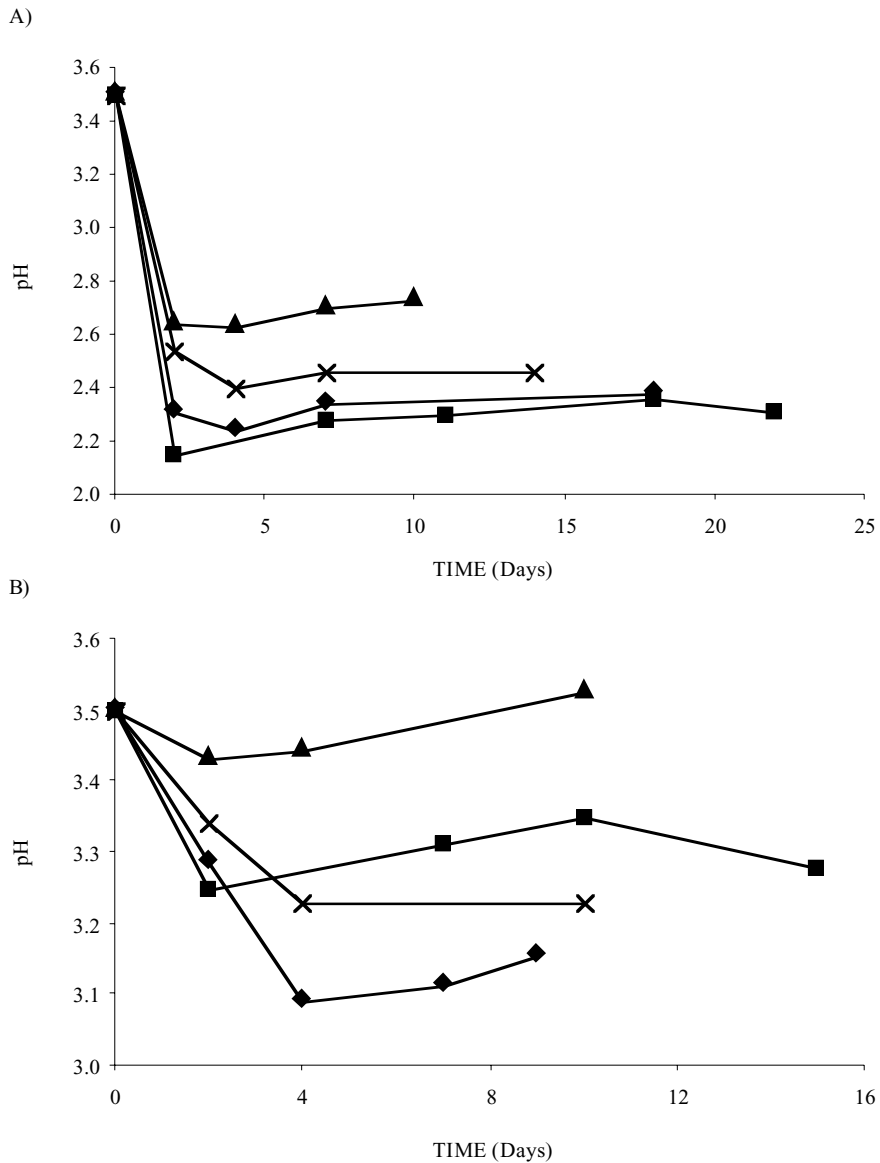


Figure 6. Evolution of pH in fermentations with different nitrogen sources **A)** without tartaric acid; **B)** with tartaric acid.

◻ 5 g l⁻¹ of ammonium sulphate (1 g l⁻¹ TAN); ◻ 0.5 g l⁻¹ of ammonium sulphate (0.1 g l⁻¹ TAN); ▲ 1.53 g l⁻¹ of aas (0.1 g l⁻¹ TAN); × 1.53 g l⁻¹ of aas + 4.5 g l⁻¹ of ammonium sulphate (1 g l⁻¹ TAN)

The pH decreased the least when amino acids were the sole nitrogen source and decreased the most when fermentations had only ammonium (Figure 6A). Surprisingly, the medium with ammonium and amino acids reached a pH value lower than that of the medium with only amino acids. As expected, pHs did not change as much when these fermentations were carried out with tartaric acid (Figure 6B). The pH values hardly changed in the fermentation with amino acids and tartaric acid but the same medium plus ammonium registered a considerable pH decrease. Acidification was maximal in the medium with 1 g l^{-1} of assimilable nitrogen as ammonium.

DISCUSSION

Tartaric and malic acids represent an average of 90% of the total acids present in grapes. The grape is the only cultivated fruit of European origin that accumulates significant quantities of tartaric acid (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), and it is absent in other fermented foods. Titratable acidity plays an important role in the stability, colour, taste and aroma of wine but, at the same time, is involved in the buffering capacity of wine. Our goal was to study the effect of tartaric acid and other wine organic acids on alcoholic fermentation, that is to say, on yeast metabolism. The plot of the maximal fermentation rate versus tartaric acid concentration showed a bell-shaped curve that is similar to the influence of other physicochemical factors on microbial growth. The optimal tartaric acid concentration was between 5 and 10 g l^{-1} . Concentrations below or above this optimal range caused slower fermentations and fermentation stuck when no tartaric acid was present in the initial medium. Organic acids should not be a problem in wine industrial fermentations because their concentration in grape musts is usually in the optimal range. However, sluggish and stuck fermentations have been associated with vintages of high ripeness. It has been claimed that the high sugar and the low nitrogen content of these musts are responsible for these fermentations. However, low acidity is another feature of the musts from overripe grapes. The titratable acidity of these musts is usually lower than the optimal values presented in this study and, thus, they can contribute to the appearance of problematic fermentations.

In our hands, tartaric acid helped to prevent sluggish or stuck fermentations because of its buffering capacity and because it kept the pH within the optimal values for yeast development. When this acid was not present, fermentations had the lowest final pH values. However, this does not appear to be quite so clear when we analyse the fermentations with different initial pHs. Regardless of the initial pH, the pH of all the control fermentations decreased to values around 2.2

to 2.5 and sugar was not completely consumed. However, when the initial medium was adjusted to this low pH (2.5), the presence of tartaric acid was enough to complete the fermentation successfully, and the differences in final pH between this fermentation and control ones were not very important. Therefore, the differences between fermentation with and without tartaric acid could not be due only to the effect of the pH and, somehow, the acid enables yeasts to complete fermentations. Carmelo *et al.* (1997) reported that the ability of the cells to grow or maintain viability at high external hydrogen ion concentration reflected their capacity to maintain control over their intracellular pH by excluding protons. However, the same authors proved that the rapid activation of *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrana H⁺-ATPase, which is associated with internal pH acidification, was not in fact caused by the low external pH itself but was induced by the weak organic acid used as the acidulant.

Tartaric acid is mostly present as undissociated acid (*ca.* 75% of the total concentration) at a pH of 2.5 (pK_a's= 3.01 and 4.37). This protonated form of the acid is freely permeable to the cell membrane and then dissociates in the higher pH environment of the cytosol, causing both a cytoplasmic acidification and intracellular accumulation of the membrane-impermeant acid anion (Cheng *et al.*, 1999). The analysis of intracellular metabolites showed that tartaric acid entered and accumulated during the fermentation. As far as we know, tartaric acid is not metabolised by *S. cerevisiae* and the advantage for this yeast remains elusive. As mentioned above, passive diffusion might account for the uptake of undissociated organic acids because no permeases are known for dicarboxylic acids in *S. cerevisiae*. In fact, no permease has been identified that accepts tartaric acid in any yeast. Nevertheless, it is striking that the intracellular concentration of tartaric acid was the same despite the differences in the extracellular pH that were higher than to 1.5 unit. These pH changes also involved important differences in the percentage of the undissociated form (only 10% at pH 4). A higher proportion of the undissociated acid could mean that the intracellular concentration of tartaric acid should be higher unless tartaric acid transport is regulated. Thus, our results suggest that there is a regulated system for tartaric acid transport.

Other wine organic acids were tested in conditions that were similar to those of tartaric acid and the same conclusions could be raised. All the organic acids showed buffering capacity but not all the acids had the same capacity. Tartaric and succinic acids had the highest and lowest buffering capacity, which confirmed the results of Dartiguenave *et al.* (2000a). In fact, the only fermentation to get stuck was in the medium with 1 g l⁻¹ of succinic acid (control fermentation not

included). This may be because succinic acid was mainly in the undissociated form (ca. 83 %) at a wine pH of 3.5. Thus, its buffering capacity was lower than that of other acids such as tartaric, which was mainly in dissociated form. However, tartaric acid is a good buffer only at some pHs. So, because of its pK_a 's, tartaric acid cannot maintain pHs as high as 5.5 or 4.5. In fact, tartaric acid could not prevent a decrease of almost 2 units in fermentations at initial pH of 5.5, although the fermentation finished without problems. This might suggest that pH must decrease to a range of pH more critical for the yeast to endanger the process (below pH 3).

The media acidified rapidly in the first hours of fermentation when ammonium was used as the sole nitrogen source (and no organic acid was present). Ammonium can be concentrated approximately 200-fold by cells and its transport produced an increased rate of H^+ extrusion, and, consequently, an acidification of the external media (Pena *et al.*, 1987). On the other hand, the decrease in pH was not so sharp when a mixture of amino acids was used. Amino acids can also buffer the media. However, the decrease in the pH of the medium that contained both nitrogen sources (amino acids and ammonium) was similar to when ammonium was the only nitrogen source. Therefore, amino acids did not buffer at the pH of wine, as Dartiguenave *et al.* previously reported (2000b) but their consumption produced a lower acidification of the media than when ammonium was used. The differences between the two nitrogen sources are mainly due to how they are transported across the cell membrane. Ammonium crosses this barrier by a uniport system coupled to the extrusion of a proton by the ATPase pump (Barre *et al.*, 1998). The entry of the ammonium to the cell causes its dissociation in the higher pH environment of the cytosol. To prevent this, the proton produced is excreted to the medium, which acidifies the extracellular medium. Amino acids, on the other hand, cross the membrane using a symport with one or more protons. This system is also usually coupled with an ATPase pump (Barre *et al.*, 1998), but in this case, the protons are extruded to compensate for their entry from the extracellular medium; so acidification outside the membrane is reduced. Ammonium salts are often added in industrial wine fermentation in order to increase the nitrogen content of the must. In the light of our results, the effect of this practice on the final pH of the wine and fermentation rate should be tested.

In conclusion, organic acids in media with high sugar concentrations and ammonium as the sole nitrogen source had an enormous impact on *S. cerevisiae* metabolism during alcoholic fermentation. When there were no organic acids present, the main effect on yeast metabolism was that the media acidified quickly. However, the role of these organic acids inside the cell remains

unclear. Jennings (1995) reported that the transport of organic acids is important to regulate the intracellular pH and balance the intracellular charge. The constant intracellular concentration of organic acids throughout a grape must fermentation supported this hypothesis. Ammonium transport increased the rate of H⁺ extrusion and therefore produced an intracellular alkalisation (Pena *et al.*, 1987). The entry of organic acid may supply the cell with H⁺ to prevent alkalization and enable the transport of ammonium coupled with protons. However, it is still not known how organic acids are transported. As mentioned above, our results suggested a regulated transport, which implies that there are specific permeases for these acids. These transporters may regulate the entry of the acid to the cell or the anion extrusion from the cytoplasm so that dicarboxylic acids do not accumulate, as suggested previously for monocarboxylic acids (Piper *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae*, the Dal family of proteins, whose function is still unknown, are thought to be related to dicarboxylic acid permeases, since they presented similarities with tartrate permeases of bacteria (André, 1995). Anyway, the intracellular effect of organic acids on the growth and performance of yeast during fermentation is still far from being fully understood.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by grants from Spanish Government FEDER 2FD97-1854 and AGL2000-0205-P4-03. We thank careful revision of Mr John Bates from the languages services of University Rovira i Virgili.

REFERENCES

- Aerny, J.** (1996) Composés azotes des moûts et des vins. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 28, 161-165.
- André, B.** (1995) An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1575-1611.
- Barre, P., Blondin, B., Dequin, S., Feuillat, M., Sablayrolles, J.M. and Salmon, J.M.** (1998) La levure de fermentation alcoolique. In: *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques.* (Ed. C. Flanzy) pp. 414-495. Technique & Documentation Lavoisier: Paris.
- Carmelo, V., Santos, H. and Sá-Correia, I.** (1997) Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1325, 63-70.
- Casal, M., Blázquez, M., Gamo, F.J., Gancedo, C. and Leão, C.** (1995) Lack of lactate proton symport activity in *pck1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microb. Lett.* 128, 2620-2623.
- Casal, M., Cardoso, H. and Leão, C.** (1996) Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 142, 1385-1390.
- Cassio, F. and Leão, C.** (1991) Low- and high-affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3623-3628.
- Cassio, F. and Leão, C.** (1993) A comparative study on the transport of L(-)malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: evidence for a general organic acid permease. *Yeast*, 9, 743-752.
- Cassio, F., Leão, C. and van Uden, N.** (1987) Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 509-513.
- Côrte-Real, M. and Leão, C.** (1990) Transport of malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Hansenula Anomala*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1109-1113.
- Cheng, L., Moghraby, J. and Piper, P.W.** (1999) Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 89-95.
- Dartiguenave, C., Jeandet, P. and Maujean, A.** (2000a) Study of the contribution of major organic acids of wine to the buffering capacity of wine in model solutions. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 352-356.
- Dartiguenave, C., Jeandet, P. and Maujean, A.** (2000b) Changes in the buffering capacity of model solutions of 40 mM tartaric or malic acids in relation to amino acids. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 347-351.
- Gonzalez, B., François, J. and Renaud, M.** (1997) A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13, 1347-1356.
- Herrero, M., Cuesta, I., García, L.A. and Díaz, M.** (1999) Changes in organic acids during malolactic fermentation at different temperatures in yeast-fermented apple juice. *J. Inst. Brew.* 105, 191-195.
- Jennings, D.H.** (1995) *The physiology of fungal nutrition.* Cambridge University Press, Cambridge.

Pena, A., Pardo, J.P. and Ramirez, J. (1987) Early metabolic effects and mechanism of ammonium transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 431-438.

Piper, P., Ortiz Calderon, C., Hatzixanthis, K. and Mollapour, M. (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiol.* 147, 2635-2642.

Queiros, O., Casal, M., Athoff, S., MoradasFerreira, P. and Leão, C. (1998) Isolation and characterization of *Kluyveromyces marxianus* mutants deficient in malate transport. *Yeast* 14, 401-407.

Ramon-Portugal, F., Seiller, I., Taillandier, P., Favarel, J.L., Nepveu, F. and Strehaiano, P. (1999) Kinetics of production and consumption of organic acids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 37, 235-240.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. (2000) *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications.* Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England.

Sierkstra, L.N., Verbakel, J.M.A. and Verrips, C.T. (1992) Analysis of transcription and translation of glycolytic enzymes in glucose-limited continuous cultures of *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2559-2566.

Sousa, M.J., Mota, M. and Leão, C. (1992) Transport of malic acid in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for a proton-dicarboxylate symport. *Yeast*, 8, 1025-1031.

Walker, G.M. (1998) *Yeast physiology and biotechnology.* Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England.

CAPÍTULO 10:

**EFFECT OF THE NITROGEN SOURCE ON THE FATTY
ACID COMPOSITION OF *Saccharomyces cerevisiae* AND
PRODUCTION OF VOLATILE COMPOUNDS**

M.J. Torija, G. Beltran, M. Novo, M. Poblet, N. Rozès, J.M. Guillamón y A. Mas

Food Microbiology
(enviado para su publicación)

ABSTRACT

The source and content of nitrogen in the medium are very important in the development of alcoholic fermentations since they both affect the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, the composition of the growth medium and the environmental conditions are known to affect the cell membrane fatty acid composition. The aim of this work was to study how the nitrogen source affects the fermentation kinetics, the membrane fatty acid composition and the production of volatile compounds. A mixture of amino acids and ammonia delayed the yeast growth when a high content of yeast assimilable nitrogen was in the media. Cells grown in the mixed nitrogen source had a lower content of total fatty acids and a higher unsaturation degree than cells grown in ammonia. Moreover, wines produced by fermentations with ammonia and amino acids had a higher 2-phenylethanol and a lower ethyl lactate content than those fermented with only ammonia.

INTRODUCTION

Nitrogenous compounds are important components of grape juice for wine production. Low levels of yeast assimilable nitrogenous compounds (YAN: it includes α -amino acids and ammonia) have been related to lower fermentation rates and longer fermentations (Bely *et al.* 1990). In fact, they are considered to be the main cause of stuck fermentations (Ingledeew and Kunkee, 1985; Salmon, 1989; Kunkee, 1991). Limiting YAN is thought to affect yeast by reducing yeast cell multiplication and by indirectly decreasing the rate of glycolysis (Bely *et al.*, 1990).

These effects also depend on the nitrogen source, since growth on good nitrogen sources such as ammonia, glutamine and asparagine seems to yield relatively higher growth rates than on poor ones such as proline and urea (ter Schure *et al.*, 2000). Under the typical anaerobic conditions of wine fermentations, proline is not metabolised by yeast (Spayd and Andersen-Bagge, 1996).

Yeast utilizes nitrogen sources by rapidly uptaking and storing the nitrogen available in the cytoplasmatic vacuoles in order to use it when needed. It is supposed to be an adaptive response to its natural habitat (Bisson, 1991) because the ethanol accumulated in the medium throughout the fermentation is a strong inhibitor of amino acid transport.

Thus, the quantity and composition of yeast assimilable nitrogenous compounds in grape juice have been associated to both fermentation kinetics (Bely *et al.*, 1990, 1991; Monteiro and

Bisson, 1991) and the production of such secondary metabolic by-products as sulfides and ethyl carbamate. Higher concentrations of ethyl carbamate (Ough, 1991) and H₂S (Henschke and Jiranek, 1991; Jiranek *et al.*, 1995) are reported to be due to an excessive addition of assimilable nitrogen which has a negative effect on the quality and the aroma of the wine. Furthermore, some aroma and flavour compounds present in the must and in the final wine are the result of nitrogenous compounds (Rapp and Versini, 1991). In fact, the amino acids are among the most important factors that influence higher alcohol formation, which are produced during the alcoholic fermentation when yeast converts the branched chain amino acids present in the medium: valine, leucine, isoleucine, threonine and phenylalanine. Amino acids can also influence the anabolic formation (from carbohydrates) of their corresponding higher alcohols by inhibiting the biosynthetic enzymes (Lambrechts and Pretorius, 2000).

The chemical composition of yeast cells depends mainly on the cultivation conditions and the composition of the growth medium. In fact, the synthesis of yeast biomass is clearly dependent on the content of nitrogen in the growth medium, since the proportion of nitrogenous compounds in yeast cells is about 50%. Anyway, it has been reported (Abramov *et al.*, 1994) that yeast cells can synthesize all the required proteins from inorganic nitrogen provided by ammonium salts and organic carbon.

In yeast cell composition, the membrane fatty acid composition is one of the most variable parameters and is clearly influenced by environmental factors such as temperature, nutrient limitation and growth rate (Hunter and Rose, 1972; Ratledge and Evans, 1989). This is logical because the plasma membrane is the site of the primary contact of the cell with its environment and therefore, its flexibility and adaptation capacity determines the survival ability of the cell (Sajbidor, 1997).

Ammonia, which accounts for 40% of all the nitrogen available in must, is the main nitrogen source in laboratory-scale fermentations. But a wide variety of nitrogen-containing compounds are present in grape must. Thus, the aim of our work was to study the differences in the kinetics, the fatty acid composition and the volatile compounds between fermentations with one nitrogen source (ammonia) and fermentations with a combined nitrogen source (ammonia and amino acids, as is the case in grape must).

MATERIALS AND METHODS

Fermentation experiments

The defined medium consisted of: 100 g l⁻¹ glucose, 100 g l⁻¹ fructose, 1.7 g l⁻¹ yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulphate (Difco, Detroit, USA) and 5 g l⁻¹ tartaric acid.

The nitrogen sources used were ammonia and amino acids in the following concentrations:

- 5 g l⁻¹ of ammonium sulphate. YAN was 1 g l⁻¹.
- A mixture of amino acids (1.53 g l⁻¹) and 4.5 g l⁻¹ of ammonium sulphate. YAN was 1 g l⁻¹.
- A mixture of amino acids (1.53 g l⁻¹). YAN was 0.1 g l⁻¹.

The mixture of amino acids consisted of: 0.4 g l⁻¹ of arginine and proline; 0.15 g l⁻¹ of glutamic acid; 0.1 g l⁻¹ of glutamine, threonine and serine; 0.05 g l⁻¹ of alanine; 0.04 g l⁻¹ of aspartic acid and leucine; 0.02 g l⁻¹ of lysine, phenylalanine, histidine, isoleucine, valine, glycine and tyrosine; 0.005 g l⁻¹ of tryptophane and methionine.

YAN was analysed by the formol index method (Aerny, 1996).

The fermentations were performed in 500-ml bottles filled with 450 ml of the defined medium and covered with a cotton cap.

All fermentations were carried out at 25°C and the pH was adjusted to 3.5 with NaOH 0.1 N. A commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine strain QA23 (Lallemand S.A., Toulouse, France) was inoculated at the initial population of 2×10⁶ cell ml⁻¹.

Every day the CO₂ released was assessed by measuring the weight loss. In the latter stages of the fermentation, the sugar consumption was assayed by enzymatic kits (Boehringer Mannheim, Germany). Fermentation was considered to be over when the residual sugars were below 2 g l⁻¹.

The maximal fermentation rate was the maximal slope obtained from the plot of sugar consumption versus fermentation day and was expressed as the concentration of sugar consumed (in g l⁻¹) per day.

Determination of cell fatty acid composition

Cells were saponified and fatty acids were extracted according to the method used by Rozès *et al.* (1992).

Analytical GC was carried out on a Hewlett-Packard 5890 connected to an HP Vectra computer with the ChemStation software (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). The extract (2 μl) was injected (splitless, 1 minute) into an FFAP-HP column of 30 m \times 0.25 mm and 0.25 μm phase thickness (Agilent) with an HP 7673 automatic injector (Agilent). The temperature program was 140°C \times 4°C min^{-1} to 240°C (13 min.). Injector and detector temperatures were 250 and 280°C, respectively. The carrier gas was helium at 1.2 ml min^{-1} . Heptanoic and heptadecanoic acids (1 mg ml^{-1} and 4 mg ml^{-1} , respectively) were added as internal standards. Relative amounts of given fatty acids were calculated from their respective chromatographic peak areas. These amounts were related to the dry cell weight and later transformed into percentages of the total fatty acids obtained. Dry cell weight was determined as described by Sierkstra *et al.* (1992). Mean fatty acid chain length (CL) was calculated as:

$\text{CL} = \sum(\text{P} \times \text{C}) / 100$, where P is the percentage of fatty acids and C is the number of carbons.

Determination of volatile compounds

To determine volatile fatty acids, the ethyl esters of fatty acids, higher alcohol acetates and other volatile compounds, we used the protocol proposed by Lema *et al.* (1996). 1-nonanol (0.92 mg l^{-1}), and heptanoic and heptadecanoic acids (3.22 mg l^{-1} and 2.90 mg l^{-1} , respectively) were added as internal standards.

Analytical GC was carried out on a Hewlett-Packard 4890A connected to a Hewlett-Packard Integrator 3393A equipped with a flame ionisation detector (Agilent). The extract (2 μl) was injected (splitless, 1 minute) into an FFAP-HP column of 30 m \times 0.25 mm and 0.25 μm phase thickness (Agilent). The temperature program was 50°C \times 4°C min^{-1} to 240°C (15 min.). Injector and detector temperatures were 240°C. The carrier gas was helium at 1 ml min^{-1} . Volatile compounds were identified and quantified by comparison with standards.

RESULTS

Fermentations were carried out in a defined medium with 1 g l^{-1} of YAN as ammonia or 1 g l^{-1} of YAN as ammonia and aminoacids (9:1). An additional fermentation was performed in order to determine what happened when only amino acids were in the media. The concentration of amino acids was the same as in the mixed nitrogen source fermentation (0.1 g l^{-1} of YAN).

The kinetic parameters of these fermentations were studied. The fermentation time with ammonia as the sole nitrogen source was shorter (8 days to consume all fermentable sugars) and the fermentation rate higher ($52.63 \text{ g l}^{-1}\text{day}^{-1}$) than when a combined source was used (11 days and $38.61 \text{ g l}^{-1}\text{day}^{-1}$). However, when only amino acids were present in the medium, the fermentation rate was higher than that of the combined source although the YAN was the lowest ($45.15 \text{ g l}^{-1}\text{day}^{-1}$ and 11 days).

The content of fatty acids at the end of the fermentation with ammonia (17.90 mg g^{-1} dry cell weight) was higher than that of the fermentation with ammonia and amino acids (10.87 mg g^{-1} dry cell weight). Fermentation with only amino acids presented a value similar to that of only ammonia (15.42 mg g^{-1} dry cell weight).

Table 1. Changes in the membrane fatty acid composition as a function of the nitrogen source. Values are expressed as percentages of the total fatty acids.

Nitrogen source		Dry yeast	2
NH_4^+	MCFA ^b	0	7.57
	SFA ^c	20.48	32.57
	UFA ^d	79.52	59.86
	CL	17.05	16.20
	UFA/SFA	3.88	1.84
	C16/C18	0.91	1.78
aas ^a + NH_4^+	MCFA	0	
	SFA	20.48	
	UFA	79.52	
	CL	17.05	
	UFA/SFA	3.88	
	C16/C18	0.91	
aas	MCFA	0	3.29
	SFA	20.48	21.07
	UFA	79.52	75.64
	CL	17.05	16.70
	UFA/SFA	3.88	3.59
	C16/C18	0.91	1.17

^a Amino acids

^b MCFA: Medium-chain fatty acids. These include C8:0, C10:0 and C12:0.

^c SFA: Long-chain saturated fatty acids. These include C14:0, C16:0 and C18:0.

^d UFA: Unsaturated fatty acids. These include C14:1, C16:1 and C18:1.

As far as the cell fatty acid composition (Table 1) is concerned, the degree of unsaturation at the end of fermentations with ammonia was lower (65%) than that of the combined source. In fact, the process with a mixed nitrogen source maintained the initial unsaturation levels (80%) characteristic of dry yeast. The unsaturation degree of fermentations performed with amino acids as the sole nitrogen source were similar to those performed with only ammonia, although differences in the percentages of individual fatty acids were detected (data not shown). In ammonia fermentation, the percentage of UFA (unsaturated fatty acids) decreased in the first stages of the process but subsequently increased (this also occurred in fermentation with amino acids only). This decrease was mainly counteracted by an increase in SFA (long-chain saturated fatty acids). In fact, the production of MCFA (medium-chain fatty acids) was quite low in all cases and minimal in fermentations with a mixed nitrogen source.

The C16/C18 ratio was lowest throughout the alcoholic fermentation when a combined source was used and, as a consequence, the mean chain fatty acid was higher. Furthermore, the UFA/SFA ratio was highest when the source was a combined one (Table 1). Basically, this was due to a higher proportion of oleic acid (data not shown).

Table 2. Concentration of volatile compounds (mg l⁻¹) in the final wine.

	Nitrogen source		
	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺ + aas ^a	aas
2 phenyl ethanol	20.46	28.95	41.59
Ethyl lactate	24.59	17.33	3.38
2-phenyl ethyl acetate	0.07	0.05	0.20
Hexyl acetate	0.04	-	-
∑acetates	24.7	17.38	3.58
Butyric acid	-	-	0.91
Hexanoic acid	1.45	0.25	0.69
Octanoic acid	1.95	0.31	0.72
Decanoic acid	0.80	0.13	0.37
Dodecanoic acid	0.08	-	-
∑MCFA	4.28	0.69	2.69

- not detected

^a Amino acids

The fact that the nitrogen source caused these differences in the fatty acid composition detected also led us to expect a different aromatic profile in the final product (Table 2). Although the concentrations of total volatile compounds were similar in all the fermentations studied (47-49

mg l⁻¹), the amounts of each compound depended on the nitrogen source used. There were two main compounds responsible for the aromatic profile of the fermentation with only ammonia as the nitrogen source: 2-phenylethanol and ethyl lactate, the latter of which had the highest concentration. Although the same majority compounds were detected, in fermentations with both nitrogen sources the amount of 2-phenylethanol was higher. This can be explained by looking at the aromatic profile of the fermentation with only amino acids, since amino acids seemed to increase the 2-phenylethanol concentration at the expense of ethyl lactate. As occurred in the cell fatty acid composition, percentages of medium-chain fatty acids in the medium were low, and minimal for the combined nitrogen source.

DISCUSSION

Saccharomyces cerevisiae encounters a great variety of nitrogen sources in its natural habitat (Cooper, 1982). However, not all nitrogen sources support growth equally well (ter Schure *et al.*, 2000). In grape juice, ammonia is the preferred yeast nitrogen source and, besides, alternative nitrogen-assimilatory pathways are not expressed when ammonium is present (Salmon and Barre, 1998). Amino acids, however, were also of great importance in the alcoholic fermentation, since the main function of the nitrogenous compounds is to fill the biosynthetic pool of amino acids (Cooper, 1982).

Some studies (Thomas and Ingledew, 1990; Albers *et al.*, 1996) have shown that amino acids increase the fermentation rate and decrease the fermentation time. Others have shown that a mixed source (ammonia and amino acids) is more effective for promoting yeast growth and fermentation rate (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). In our results, however, the mixed source did not lead to a better growth than the ammonia source. The delay in the alcoholic fermentation may be due to the high nitrogen content in the medium. In fact, in our conditions (a medium with a high sugar concentration, unlike some of the former studies), it has been reported that a higher yeast assimilable nitrogen content (both in ammonia and amino acids) is not always related to a higher fermentation rate (Llauradó *et al.*, 2002). Moreover, the improvement in yeast growth because of the assimilation of amino acids depended on the composition of the must used (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Cells grown in a medium with ammonia as the sole nitrogen source presented higher amounts of total fatty acids. Evans and Ratledge (1984, 1985) worked on the effect of nitrogen

sources on lipogenesis and unveiled that some intermediary metabolites can markedly affect fatty acid synthesis. One of these key regulatory metabolites were ammonium ions, which alleviated some inhibitions caused in the fatty acid biosynthesis pathways by other metabolites. The content of fatty acids, on the other hand, was lowest when a combined nitrogen source was used. Similar results have been reported in filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria where the presence of a combined nitrogen source increased the protein content of the cells but decreased the levels of lipids and carbohydrates (Vargas *et al.*, 1998).

Unsaturation degrees were high in all fermentations. Since limited aeration was unavoidable in order to harvest samples for subsequent analysis, our conditions cannot be considered as anaerobiosis. This is an important point since the composition of fatty acids is highly dependent on the vinification conditions. In our laboratory, other studies on the fatty acid composition have been performed using another experimental model (concentrated grape must and semianaerobiosis conditions) and the resulting percentages of UFA, SFA and MCFA were very different (Torija, 2002). So, the high unsaturation degrees obtained in this case were mainly due to the presence of oxygen, since it has been reported that the synthesis of unsaturated fatty acids and sterols is inhibited in cells grown in anaerobic cultures (O'Connor-Cox and Ingledew, 1990). In fermentations carried out in a medium with a sole nitrogen source (ammonia or amino acids), cells seemed to have less fluidity than cells grown in a mixed nitrogen source, since the decrease in the UFA content was counteracted by SFA and not by MCFA. In physical terms, the effect of a short chain is similar to that of the double bond of a long chain (Quinn and Chapman, 1980). The most striking result, however, was that fermentation with a combination of both nitrogen sources hardly changed its unsaturation degree throughout the process. Perhaps this high unsaturation degree in the fermentation with a mixed nitrogen source contributed to the lower fermentation rate. A high proportion of UFA during anaerobiosis has been reported to decrease stress tolerance (Steels *et al.*, 1994).

These results confirm that variability of the fatty acid composition largely depends on the nitrogen sources, as Farag *et al.* (1983) previously reported for some fungi. Moreover, the growth rate of the organism also affected the relative proportions of the individual components and, therefore, the overall composition (Paltauf *et al.*, 1992).

As expected, the nitrogen source in the medium also determined the aromatic profile of the wine. In fact, the degradation of amino acids is one of the pathways for forming higher alcohols in

wine (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Giudici *et al.* (1993) observed that differences in the amount of higher alcohols in various wines could be due to differences in the amino acid content of the juices. Our results showed a higher content of 2-phenylethanol in wines fermented in a medium with amino acids. 2-Phenylethanol, the only higher alcohol with a pleasant smell -a rose-like fragrance- is synthesized from phenylalanine, and it seemed logical that the concentration of this volatile compound would be higher when the precursor was in the medium. Nevertheless, phenylalanine combined with the high ammonia content yielded less 2-phenylethanol than when only amino acids were in the medium. The presence and also the concentration of α -amino acids influenced the formation of the corresponding higher alcohols. In this respect, an inverse relation between grape must nitrogen content and higher alcohols production was observed by Large (1986). Fermentations with ammonia as the nitrogen source (by itself or in combination with amino acids), on the other hand, favoured the production of ethyl lactate.

Finally, the usual practice of supplying ammonium additives to industrial fermentations to prevent them from becoming sluggish or stuck may not always be advantageous, since a mixture of amino acids and ammonium reduces the yeast growth when there is an excess of nitrogen source. Thus, the composition of amino acids and ammonium present in the must has to be taken into account before more ammonium is added.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by grants from Spanish Government FEDER 2FD97-1854 and AGL2000-0205-P4-03. We thank careful revision of Mr John Bates from the languages services of University Rovira i Virgili.

REFERENCES

- Abramov, Sh.A., Éfendieva, D.A. and Kotecko, S.Ts.** (1994) Effect of growth medium on protein content of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Bioch. Microbiol.* 30, 225-227.
- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C. and Gustafsson, L.** (1996) Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3187-3195.
- Aerny, J.** (1996) Composés azotés des moûts et des vins. *Revue suisse Vitic Arboric. Hortic.* 28, 161-165.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M. and Barre, P.** (1990) Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferm. Bioeng.* 70, 246-252.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M. and Barre, P.** (1991) Automatic detection and correction of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation under enological conditions. In: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines.* (Ed. J.M. Rantz) pp. 211-214. Am. Soc. Enol. Vitic., Davis, CA.
- Bisson, L.F.** (1991) Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. In: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines.* (Ed. J.M. Rantz) pp. 78-89. Am. Soc. Enol. Vitic., Davis, CA.
- Cooper, T.G.** (1982) Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces.* (Eds J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach) pp. 39-99. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Evans, C.T. and Ratledge, C.** (1984) Phosphofructokinase and the regulation of the flux of carbon from glucose to lipid in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 3251-3264.
- Evans, C.T. and Ratledge, C.** (1985) The role of the mitochondrial NAD⁺:isocitrate dehydrogenase in lipid accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* CBS14. *Can. J. Microbiol.* 31, 845-850.
- Farag, R.S., Khalil, F.A., Salem, H. and Ali, L.H.M.** (1983) Effects of various carbon and nitrogen sources on fungal lipid production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 795-800.
- Giudici, P., Zambonelli, C. and Kunkee, R.E.** (1993) Increased production of *n*-propanol in wine yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 123-127.
- Henschke, P.A. and Jiranek, V.** (1991) Hydrogen sulfide formation during fermentation: Effect of nitrogen composition in model grape must. In: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines.* (Ed. J.M. Rantz) pp. 172-184. Am. Soc. Enol. Vitic., Davis, CA.
- Hunter, K. and Rose, A.H.** (1972) Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 260, 639-653.
- Ingledeu, W.M. and Kunkee, R.E.** (1985) Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 65-75.

- Jiraneck, V., Langridge, P. and Henschke, P.A.** (1995) Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 61, 461-467.
- Kunkee, R.E.** (1991) Relationship between nitrogen content of the must and sluggish fermentation. In: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines.* (Ed. J.M. Rantz) pp. 48-155. Am. Soc. Enol. Vitic., Davis, CA.
- Lambrechts, M.G. and Pretorius, I.S.** (2000) Yeast and its importance to wine aroma - A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97-129.
- Large, P.J.** (1986) Degradation of organic nitrogen by yeasts. *Yeast* 2, 1-34.
- Lema, C., García-Jares, C., Orriols, I. and Angulo, L.** (1996) Contribution of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 206-216.
- Llauradó, J. Rozès, N., Bobet, R., Mas, A. and Constantí, M.** (2002) Low temperature alcoholic fermentation in high sugar concentration grape musts. *J. Food Sci.* 67, 268-273.
- Monteiro, F.F. and Bisson, L.F.** (1991) Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 47-57.
- O'Connor-Cox, E.S.C. and Ingledew, W.M.** (1990) Effect of the timing of oxygenation on very high gravity brewing fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 48, 26-32.
- Ough, C.S.** (1991) Influence of nitrogen compounds in grapes on ethyl carbamate formation in wines. In: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines.* (Ed. J.M. Rantz) pp. 165-171. Am. Soc. Enol. Vitic., Davis, CA.
- Paltauf, F. Kohlwein, S.D. and Henry, S.A.** (1992) Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces.* Vol II: Gene expression. (Eds E.W. Jones, J.R. Pringle and J.R. Broach) pp. 415-500. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Quinn, A.J. and Chapman, D.** (1980) The dynamics of membrane structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8, 1-117.
- Rapp, A. and Versini, G.** (1991) Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds in wines. In: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines.* (Ed. J.M. Rantz) pp. 156-164. Am. Soc. Enol. Vitic., Davis, CA.
- Ratledge, C. and Evans, C.T.** (1989) Lipids and their metabolism. In: *The yeast*, Vol. 3, 2nd Edn. (Eds A.H. Rose and J.S. Harrison) pp. 367-455. Academic Press, London.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Donèche, B. and Lonvaud, A.** (2000) *Handbook of Enology, Volume I: The Microbiology of Wine and Vinifications.* Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England.
- Rozès, N., García-Jares, C., Larue, F. and Lonvaud-Funel, A.** (1992) Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J. Sci. Food Agric.* 59, 351-357.

Sajbidor, J. (1997) Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 87-103.

Salmon, J.M. (1989) Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 9535-9538.

Salmon, J.M. and Barre, P. (1998) Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3831-3837.

Spayd, S.E. and Andersen-Bagge, J. (1996) Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 389-402.

Steels, E.L., Learmonth, R.P. and Watson, K. (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol.* 140, 569-576.

Sierkstra, L.N., Verbakel, J.M.A. and Verrips, C.T. (1992) Analysis of transcription and traslation of glycolytic enzymes in glucose-limited continuous cultures of *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2559-2566.

ter Schure, E.G., van Riel, N.A.W. and Verrips, C.T. (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 67-83.

Thomas, K.C. and Ingledew, W.M. (1990) Fuel alcohol production: effects of free amino acid nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2046-2050.

Torija, M.J. (2002) Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vnicas. PhD Thesis. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona (Spain).

Vargas, M.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Olivares, H., DelCampo, J.A., Rivas, J. and Guerrero, M.G. (1998) Biochemical composition and fatty acid content of filamentos nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Phycology* 34, 812-817.

CAPÍTULO 11:

DISCUSIÓN GENERAL

La temperatura es una variable muy importante en las fermentaciones alcohólicas, ya que tiene influencia tanto en el desarrollo de la misma como en el producto final obtenido. En enología, la temperatura se regula dependiendo del tipo de vinificación que se esté realizando. Así, los vinos tintos se producen a temperaturas entre 25-30°C para que durante la maceración, la extracción de color sea mayor, mientras que los vinos blancos se fermentan a bajas temperaturas para favorecer la mayor producción y retención de aromas. Aunque las fermentaciones a bajas temperaturas es una práctica muy utilizada en los últimos años, suelen ser procesos problemáticos, siendo habituales las ralentizaciones e incluso paradas de fermentación.

En este trabajo, por tanto, se pretendía conocer mejor cuáles pueden ser algunos de los cambios experimentados por las levaduras debidos a la disminución de la temperatura de fermentación (13°C frente a 25°C (temperatura considerada óptima)).

Las levaduras regulan su composición de membrana como respuesta a cambios en la temperatura ambiental para poder mantener una fluidez de membrana óptima, así como una función celular normal (Swan y Watson, 1997). Por ello, se estudiaron las variaciones en la composición de ácidos grasos de membrana, así como la evolución de algunos metabolitos intracelulares (principalmente ácidos orgánicos) y la producción de compuestos volátiles, ya que la temperatura de fermentación no sólo afecta a la membrana plasmática sino también al metabolismo de las levaduras. Se utilizaron 3 cepas del género *Saccharomyces*. Dos eran cepas de *S. cerevisiae* (A y B) y una de *S. bayanus*. Las dos cepas de *S. cerevisiae* presentaban características totalmente diferentes, siendo A una cepa floculante.

Como era de esperar, la velocidad de fermentación fue menor en las fermentaciones a 13°C. A esta temperatura, sólo se produjo una parada en la fermentación llevada a cabo por la cepa de *S. bayanus*, lo que inicialmente era bastante sorprendente porque se trata de una especie que se cree que está especialmente bien adaptada para fermentar a bajas temperaturas (Castellari *et al.*, 1992). Entre las cepas de *Saccharomyces*, la cepa B fue claramente la que mejor fermentaba.

La composición de ácidos grasos de membrana de las cepas variaba al disminuir la temperatura. A pesar de partir de una composición en ácidos grasos de membrana muy similares en las tres levaduras secas, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa de *S. bayanus* no empleaban el mismo mecanismo para ajustar sus membranas al cambio de temperatura. Mientras las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* prácticamente doblaban su composición de ácidos grasos insaturados para poder compensar la disminución de la fluidez de membrana debido a la bajada en

la temperatura de fermentación, lo que concordaba con lo descrito (Nordström y Laakso, 1992), la cepa de *S. bayanus* aumentaba su concentración de ácidos grasos de cadena corta. Aunque en los términos físicos que repercuten en la fluidez de membrana, el efecto que tiene el añadir un doble enlace en una larga cadena es similar al de acortar dicha cadena (Quinn y Chapman, 1980), parece que una mayor tolerancia al etanol ha sido asociada a una mayor proporción de ácidos grasos de cadena larga en la membrana (Baleiras Couto y Huis in't Veld, 1995), lo que podría explicar los problemas de fermentación de esta cepa de *S. bayanus* a bajas temperaturas. Esto concordaría con lo descrito por Martini y Vaughan Martini (1990) que negaba que las cepas de la especie *S. bayanus* fuesen resistentes a altas concentraciones de etanol. De todas maneras, el bajo número de cepas estudiadas impone prudencia a la hora de afirmar que exista un mecanismo diferente en la adaptación de las especies de *Saccharomyces* frente al efecto de temperatura y por tanto, más cepas de ambas especies deberían ser estudiadas bajo estas mismas condiciones. Además, al comparar la composición en ácidos grasos de las dos cepas de *S. cerevisiae* se observó que presentaban diferencias muy significativas, ya que aunque ambas cepas seguían una misma tendencia en el cambio frente a la temperatura, el grado de insaturación que exhibía la cepa A era prácticamente el doble del de la cepa B. Un elevado grado de insaturación en condiciones de anaerobiosis se ha descrito que puede disminuir la tolerancia al estrés de las cepas (Steels *et al.*, 1994), lo cual ligado al hecho de que se trata de una cepa floculante, característica también relacionada con la composición de membrana (Straver *et al.*, 1993) podían ser las causas de que esta cepa presentara una capacidad fermentativa inferior a la cepa B.

De todas maneras, no se pueden explicar los problemas de fermentación de una cepa únicamente por su composición de ácidos grasos de membrana, ya que por ejemplo, las cepas de *S. cerevisiae* B y *S. bayanus* a 25°C presentaban composiciones muy similares pero, en cambio, su comportamiento fermentativo era muy diferente. Esto no es sorprendente, ya que hay otras variables que afectan tanto a la fluidez de membrana (cantidad y estructura de los esteroides o naturaleza de los grupos polares de los fosfolípidos), (Hosono, 1992) como a la capacidad fermentativa (transporte de los nutrientes al interior de la célula, actividad y eficiencia de las diferentes vías metabólicas implicadas en la fermentación, etc.).

Por tanto, este diseño experimental, en el que se utilizaron tres cepas con características muy diferentes, proporciona una visión interesante acerca de que la heterogeneidad existente entre estas cepas concuerda con un desarrollo fermentativo y composición de membrana diferente, pero

no sirve para dilucidar si esta variabilidad sería tal si se hubieran utilizado más cepas con las mismas características. Por lo que, un estudio similar en el que se analizaran cepas similares entre sí sería de gran utilidad para confirmar si cada cepa tiene un comportamiento individual o por el contrario siguen algún patrón, y por tanto reafirmar algunas de estas suposiciones.

En estas fermentaciones también se estudiaron las sustancias volátiles, ya que el principal motivo de realizar fermentaciones a bajas temperaturas es que favorecen la síntesis de estos compuestos (Santamaría *et al.*, 1995), y disminuyen su posible evaporación (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), dando como resultado vinos más aromáticos. Los vinos más aromáticos fueron, como era de esperar, los realizados a la temperatura más baja excepto para la cepa A de *S. cerevisiae*, donde la producción a ambas temperaturas era muy similar.

La producción total de sustancias volátiles en *S. bayanus* fue superior a la de *S. cerevisiae*, pero ésta se debía principalmente a la producción de 2-feniletanol, ya que esta especie producía 4 veces más que las cepas de *S. cerevisiae*. Esta mayor producción de 2-feniletanol por parte de *S. bayanus* ya fue descrita por Feuillat *et al.* (1997). Pero, sin considerar la concentración de este compuesto, los vinos producidos con la cepa B de *S. cerevisiae* eran los más aromáticos, lo cual podía relacionarse con su mayor grado de saturación en la membrana, ya que se ha descrito que éste favorece una excreción más rápida de los compuestos volátiles (Rosi y Bertuccioli, 1992). En cambio, la cepa A de *S. cerevisiae* era la que presentaba una menor producción de sustancias volátiles, por lo que ésta no será una cepa adecuada para la producción de vinos blancos aromáticos, confirmado por el hecho de que se trata de una cepa seleccionada para la fermentación de vinos tintos.

La evolución de la concentración intracelular de una serie de metabolitos, entre los que destacaban los ácidos orgánicos, también se analizó en estas fermentaciones. El primer punto estudiado fue la composición de las tres levaduras secas. Esta composición era muy diferente en la mayoría de los compuestos estudiados. Las diferencias más claras se detectaron en la concentración de trehalosa, ya que la cepa B de *S. cerevisiae* presentaba niveles muy superiores a las otras dos cepas. La trehalosa se ha asociado con la estabilización de las membranas y la supervivencia de las células durante la rehidratación (Leslie *et al.*, 1994), con lo que los elevados niveles de trehalosa hallados en esta cepa, un 10% de su peso seco, podrían proporcionarle cierta ventaja respecto a las otras cepas para iniciar la fermentación alcohólica. En las LSA no se detectaron niveles de ácido tartárico o cítrico pero sí de otros ácidos como málico, succínico,

láctico e incluso de glicerol. Aunque existen algunas diferencias en la evolución de estos metabolitos a lo largo de la fermentación alcohólica tanto entre cepas como entre temperaturas, el resultado más sorprendente era la presencia de concentraciones elevadas de ácido tartárico en el interior de la célula a final de fermentación. Este resultado era inesperado porque este ácido no es sintetizado ni metabolizado por *Saccharomyces*. Esta acumulación ocurría tanto en las tres cepas como en las 2 temperaturas estudiadas.

Con el objetivo de intentar discernir el motivo de tal acumulación, se estudió el efecto del ácido tartárico y en general de los ácidos orgánicos en la fermentación alcohólica en un medio sencillo definido. Para ello se diseñaron unas experiencias en las que se realizaron fermentaciones con diferentes concentraciones de ácido tartárico. El principal resultado de estas fermentaciones fue que aquéllas en las que no había ácido tartárico en el medio se paraban. Este efecto no era dependiente de cepa, porque se hicieron pruebas con otra cepa y se obtuvieron los mismos resultados (resultados no mostrados). La velocidad de estas fermentaciones dependía de la concentración de ácido tartárico extracelular. En general, ésta aumentaba al incrementarse la concentración de ácido tartárico en el medio, excepto cuando la concentración era muy elevada (20 g/l). Esta menor velocidad a concentración elevada se debía probablemente a un efecto tóxico inicial del ácido tartárico para las levaduras que se reflejaba en una fase de latencia más larga en esta fermentación. La concentración óptima de ácido tartárico en el medio, por tanto, está entre 5-10 g/l. Normalmente la acidez total de los mostos se encuentra dentro de este rango por lo que la concentración de ácidos no debería suponer un problema en fermentaciones industriales. La concentración de ácido tartárico intracelular también dependía de la concentración de ácido tartárico extracelular, manteniendo una relación lineal entre ambas concentraciones, si exceptuamos la fermentación con 20g/l de ácido tartárico donde la concentración intracelular era muy superior.

El motivo de las paradas de fermentación cuando no había ácido tartárico en el medio podría relacionarse con un efecto tamponante por parte del ácido, ya que las fermentaciones en ausencia de ácido presentaban pHs muy bajos, alrededor de 2,2. Pero una experiencia realizada a pH 2,5 con y sin ácido tartárico, en la que la fermentación en presencia de ácido finalizaba y en ausencia se paraba, a pesar de que las diferencias de pH eran mínimas, hacía pensar que las diferencias en el desarrollo de la fermentación no debían ser causa únicamente de las variaciones

en el pH del medio, sino que el ácido debía estar involucrado en algún otro mecanismo necesario para la célula.

La concentración intracelular de ácido tartárico a diferente pH con la misma concentración de ácido extracelular era constante. Esto hace pensar en un posible transporte regulado del ácido tartárico. En *Saccharomyces cerevisiae* no se conoce ninguna permeasa para ácidos dicarboxílicos (Salmon, 1987), con lo que se supone que la entrada de este ácido, al igual que el resto de ácidos dicarboxílicos, ha de ser por difusión simple de su forma no disociada. La suposición de que se trate de un transporte regulado podría relacionarse con un estudio realizado por Piper *et al.* (2001). En este trabajo se ha estudiado la adaptación de las células de *Saccharomyces* al estrés producido por los principales ácidos orgánicos utilizados como preservativos alimenticios (ácidos sórbico, benzoico y acético) y han observado la presencia, en las células adaptadas, de un transportador denominado Pdr12, que permite la salida de la célula de la forma disociada del ácido. De todas maneras, el alto gasto energético que le supone a la célula la salida del protón y del anión (2 moléculas de ATP), no tendría sentido sin un control de la entrada, ya que sino el ácido podría volver a entrar en la célula tan rápido como es expulsado y por tanto, se trataría de un ciclo fútil y muy caro energéticamente. Por tanto, estos autores hipotetizan que el mayor control de la célula en la acción de estos ácidos debe estar en un control de su entrada. Algo similar podría ser lo que ocurriese con los ácidos dicarboxílicos.

El mismo tipo de experiencia diseñado para el ácido tartárico se realizó con otros ácidos, y lo que se observó es que las fermentaciones se paraban cuando no había un ácido en el medio, independientemente del ácido que se tratara. De todas maneras, la efectividad de la adición de un ácido variaba dependiendo de cual se añadía, siendo el ácido tartárico, el que presentaba una mayor activación de la fermentación y un mayor poder tamponante en el medio. El ácido succínico, en cambio, era el que peor funcionaba, produciéndose una parada de fermentación cuando en el medio había 1 g/l de este ácido, confirmando los resultados de Dartiguenave *et al.* (2000a) que afirmaban que los ácidos tartárico y succínico eran los que presentaban una mayor y menor capacidad tamponante, respectivamente, al pH del vino.

Otro factor que también podía tener efecto en el desarrollo de la fermentación, era la fuente de nitrógeno. Hasta este momento únicamente se había utilizado como fuente de nitrógeno, en las experiencias con ácidos orgánicos, el sulfato de amonio. Cuando éste fue substituido por aminoácidos, dos importantes efectos se observaron: (i) la fermentación finalizó aún en ausencia

de un ácido orgánico y (ii) el descenso en el pH fue menor. Esto parecía apuntar a que la causa de que la fermentación finalizara en este caso, se debía a que éstos eran capaces de substituir al ácido tartárico tamponando el medio. Pero, en cambio, una fermentación con una fuente combinada de amonio y aminoácidos presentaba el mismo pH final que cuando únicamente había amonio en el medio, lo que confirmaba que los aminoácidos no presentan capacidad tamponante al pH del vino (Dartiguenave et al, 2000b). La menor acidificación del medio cuando había aminoácidos puede explicarse observando el transporte de ambos compuestos (ver Figura 2 de la Justificación y objetivos, pág. 19). Mientras el transporte de una molécula de amonio al interior de la célula supone la excreción de un protón por medio de una ATPasa, la entrada de los aminoácidos se realiza mediante un transporte de simporte acoplado a la entrada de uno o varios protones. La posterior salida de los protones mediante una ATPasa, compensa en parte su entrada a la célula, con lo que el descenso del pH, en este caso, es menor (Barre *et al.*, 1998).

Por tanto, el hecho de que la presencia de aminoácidos o de un ácido orgánico en el medio favorezca la fermentación alcohólica, cosa que no sucede cuando hay únicamente amonio, abre una nueva incógnita sobre cuál es el efecto beneficioso que estos compuestos causan a la célula. Aunque Jennings (1995) apuntó que el transporte de los ácidos orgánicos al interior de la célula tiene una gran importancia en el control del pH y en el mantenimiento del balance intracelular de cargas, la función de estos ácidos todavía permanece sin determinar.

Cómo es evidente que la fuente de nitrógeno tiene una gran importancia en el desarrollo de la fermentación alcohólica y por tanto, en las levaduras, se estudió la composición de membrana de las células de las fermentaciones llevadas a cabo con diferentes fuentes de nitrógeno. Se quería comparar si existía alguna diferencia entre fermentar con una fuente simple formada únicamente por amonio y una fuente compuesta por amonio y aminoácidos. Los resultados obtenidos fueron bastante sorprendentes tanto en el desarrollo de la fermentación alcohólica como en la composición de ácidos grasos de membrana. La fermentación con sólo amonio (todas las fermentaciones se realizaron siempre en presencia de un ácido orgánico) presentaba una velocidad de fermentación superior a la de la mezcla. Esto contradecía otros estudios realizados en los que se afirmaba que la presencia de aminoácidos en el medio favorecía la fermentación alcohólica (Thomas y Ingledew, 1990; Albers *et al.*, 1996), y que de hecho, la mezcla de ambas fuentes era la mejor opción para mejorar el crecimiento celular y aumentar la velocidad de fermentación (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Las diferencias con respecto a nuestra experiencia estaban

motivadas principalmente por la composición del medio (niveles muy elevados de azúcares y nitrógeno asimilable), ya que se ha descrito que en estas condiciones, los niveles elevados de nitrógeno asimilable (en forma de amonio y aminoácidos) no siempre se corresponden con un aumento de la velocidad de fermentación (Llauradó *et al.*, 2001).

Este retraso de la fermentación cuando en el medio había niveles elevados de nitrógeno asimilable junto al hecho descrito anteriormente, de que la adición de amonio provoca una mayor acidificación del medio, pone en tela de juicio las adiciones de sulfato o fosfato de amonio que se realizan en las fermentaciones alcohólicas en bodega, porque es posible que si la concentración de nitrógeno es ya suficiente, dicha adición resulte incluso perjudicial para el proceso.

Por lo que respecta a la composición de ácidos grasos de membrana, el resultado más destacable fue que las células crecidas en un medio con una fuente mixta de nitrógeno presentaban unos niveles muy elevados de ácidos grasos insaturados, que no variaban a lo largo de la fermentación. Altas concentraciones de ácidos grasos insaturados en condiciones de anaerobiosis han sido relacionadas con una disminución de la tolerancia al estrés (Steels *et al.*, 1994). Aunque estas condiciones estaban más próximas a la aerobiosis que a la anaerobiosis, es posible que grados de insaturación tan elevados no favorezcan la fermentación. Así, lo que parece claro es que la composición de ácidos grasos y la producción de compuestos volátiles están influenciadas por la fuente de nitrógeno utilizada.

De todas maneras, cabe destacar que los resultados obtenidos de estudios de composición de ácidos grasos de membrana se han de tomar con suma cautela, ya que la elección del diseño experimental (sobre todo en lo que respecta al oxígeno) puede causar diferencias más importantes que la propia variable a estudiar. Así, las comparaciones entre estudios con diferentes diseños experimentales deberían evitarse o en su defecto entender que los resultados no tienen porqué ser comparables, para no sacar conclusiones que puedan ser erróneas.

Como conclusión, ratificar que la temperatura de fermentación, la presencia de ácidos orgánicos y la elección y concentración de la fuente de nitrógeno tienen un papel crucial en el desarrollo de las levaduras que llevan a cabo la fermentación alcohólica. Esto puede dar una idea de la cantidad de variables que todavía quedan por estudiar y entender para tener un mayor control y conocimiento de lo que sucede en un proceso que es tan complejo a pesar de parecer tan sencillo, la transformación del mosto en vino.

BIBLIOGRAFÍA

Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C. y Gustafsson, L. (1996) Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3187-3195.

Baleiras Couto, M.M. y Huis in't Veld, J.H.J. (1995) Influence of ethanol and temperature on the cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailii* spoilage yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 327-334.

Barre, P., Blondin, B., Dequin, S., Feuillat, M., Sablayrolles, J.M. y Salmon, J.M. (1998) La levure de fermentation alcoolique. In: *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques*. (Ed. C. Flanzy) pp. 414-495. Technique & Documentation Lavoisier: Paris.

Castellari, L., Pacchioli, G., Zambonelli, C., Tini, V. y Grazia, L. (1992). Isolation and initial characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Ital. J. Food Sci.* 3, 179-186.

Dartiguenave, C., Jeandet, P. y Maujean, A. (2000a) Study of the contribution of major organic acids of wine to the buffering capacity of wine in model solutions. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 352-356.

Dartiguenave, C., Jeandet, P. y Maujean, A. (2000b) Changes in the buffering capacity of model solutions of 40 mM tartaric or malic acids in relation to amino acids. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 347-351.

Feuillat, M., Charpentier, C. y Massoutier, C. (1997) Winemaking interest of cryotolerant strains of *Saccharomyces* sp. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques* 85, 18-21.

Jennings, D.H. (1995) *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge University Press, Cambridge.

Hosono, K. (1992) Effect of salt on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 91-96.

Leslie, S.B., Teter, S.A., Crowe, L.M. y Crowe, J.H. (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 7-13.

Llauradó, J., Rozès, N., Bobet, R., Mas, A. y Constantí, M. (2002) Low temperature alcoholic fermentation in high sugar concentration grape musts. *J. Food Sci.* 67, 268-273.

Martini, A. y Vaughan-Martini, A. (1990) Grape must fermentation: past and present. In: *Yeasts Technology*. (Eds. J.F.T. Spencer y M. Spencer) pp. 105-123, Springer-Verlag: Berlin.

Nordström, K.M. y Laakso, S.V. (1992) Effect of growth temperature on fatty acid composition of ten *Thermus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1656-1660.

Piper, P., Ortiz Calderon, C., Hatzixanthis, K. y Mollapour, M. (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiol.* 147, 2635-2642.

Quinn, A.J. y Chapman, D. (1980) The dynamics of membrane structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8, 1-117.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A. (2000) *Handbook of Enology, Volume I: The Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England.

Rosi, I. y Bertuccioli, M. (1992) Influences of lipid addition on fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma characteristics of experimental wines. *J. Inst. Brew.* 98, 305-314.

Salmon, J.M. (1987) L-Malic acid permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 901, 30-34.

Santamaría, M.P., López, R., Gutiérrez, A.R., Díez de Bethencourt, C.A. y García-Escudero, E. (1995) Incidence de la température de fermentation sur l'évolution des acides gras totaux. *J. Int. Sciences Vigne Vin* 29, 101-104.

Steels, E.L., Learmonth, R.P. y Watson, K. (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol.* 140, 569-576.

Straver, M.H., Aar, P.C.V.D., Smit, G. y Kijne, J.W. (1993) Determinants of flocculence of brewer's yeast during fermentation in wort. *Yeast* 9, 527-532.

Swan, T.M. y Watson, K. (1997) Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Can. J. Microbiol.* 43, 70-77.

Thomas, K.C. y Ingledeu, W.M. (1990) Fuel alcohol production: effects of free amino acid nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2046-2050.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Las bodegas estudiadas de las D.O.s Terra Alta y Priorat presentaban una gran diversidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, debida principalmente a que nunca se habían inoculado cepas comerciales y que prácticamente todas las cepas aisladas eran de fenotipo killer sensible.
2. La principal especie de no-*Saccharomyces* aislada en estas bodegas fue *Candida stellata*, probablemente debido a los altos contenidos de azúcares en los mostos.
3. La temperatura de fermentación tiene una gran influencia en la población de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, con cepas que fermentan mejor a bajas temperaturas y otras que predominan a temperaturas más elevadas.
4. La selección de la cepa de *S. cerevisiae* RV1 se llevó a cabo siguiendo el criterio de competencia masiva y utilizando como variable adicional la temperatura de fermentación. Aún así el criterio definitivo para su selección fue su buena capacidad fermentativa así como la calidad de los vinos obtenidos. Las pruebas realizadas en bodega confirmaron que se trataba de una cepa apta para realizar fermentaciones entre 20-30°C.
5. La temperatura tiene un importante efecto en la composición de ácidos grasos de la membrana de las especies de *Saccharomyces*. Mientras que las cepas de *S. cerevisiae* aumentaban su grado de insaturación al disminuir la temperatura, la cepa de *S. bayanus* incrementó su porcentaje de MCFA.
6. La producción de compuestos volátiles está muy influenciada por la temperatura pero también por la cepa. La cepa de *S. bayanus* producía cantidades superiores de 2-feniletanol que las cepas de *S. cerevisiae*.
7. En condiciones enológicas, las levaduras acumulan ácido tartárico a final de fermentación, mientras que hasta la mitad del proceso presentan una acumulación de ácido cítrico.

8. La presencia de un ácido orgánico en condiciones de fermentación es necesaria para que el proceso no sufra una parada de fermentación, probablemente debido a su efecto tamponante, aunque éstos ácidos parecen presentar algún otro beneficio a la célula.

9. La utilización de amonio como fuente de nitrógeno provoca una mayor acidificación del medio que la presencia de aminoácidos, a pesar de que éstos no presentan efecto tampón al pH del medio.

10. Una concentración excesiva de nitrógeno, especialmente si está formada por una mezcla de amonio y aminoácidos, en mostos con alto contenido de azúcares, puede no ser beneficiosa para la fermentación.

11. El efecto del modelo de fermentación utilizado (oxigenación, toma de muestra, volumen, composición del medio, etc.) puede ser mayor sobre la composición de ácidos grasos de membrana que las propias condiciones impuestas en la fermentación.

ANEXO 1:

PROTOCOLOS

1. Medios de selección y de contaje de levaduras

1.1. YEPD (Yeast Extracte Pectone Dextrose) agar

Glucosa		20 g
Peptona (Cultimed)		20 g
Extracto de levadura (Cultimed)		10 g
Agar Tipo americano (Cultimed)		20 g
Agua destilada	c.s.p.	1000 ml

Autoclave 120°C, 15 min. Distribuirlo en placas de Petri (15-20 ml).

1.2. YEPD líquido

La misma composición que el medio anterior, pero sin agar.

1.3. Medio lisina (Morris y Eddy, 1957)

Solución de lactato potásico:	18 ml ácido láctico al 85%
	14 g KOH

A 1 litro de H₂O destilada, se le añaden 4 ml de esta solución y 66 g de polvo de medio lisina (ADSA micro). Se calienta hasta disolver totalmente el medio, agitando de forma continuada para evitar un sobrecalentamiento (en un microondas: ~ 8 min., potencia 2).

Enfriar hasta 50°C en un baño y añadir 1 ml de ácido láctico al 10%.

Distribuirlo en placas de Petri (15-20 ml).

1.4. Medio Cicloheximida (Harris y Watson, 1968)

Extracto de malta (Difco)		41 g
Agar		20 g
Agua destilada	c.s.p.	1000 ml

Autoclave 120°C, 15 min.

Añadir la cicloheximida (Sigma, conc. final 0,01%): preparar una solución al 1% (p/v).

Distribuirlo en placas de Petri (15-20 ml).

2. Técnicas de Biología Molecular

2.1. Aislamiento del ADN total (Querol *et al.*, 1992)

Dejar crecer las células en 5 ml de **YEPD líquido** a 26°C.

Centrifugar 5 min. a 3000 rpm.

Lavar con 4 ml de H₂O destilada estéril.

Centrifugar 5 min. a 3000 rpm. Eliminar el sobrenadante.

Resuspender el precipitado en 500 µl de **Tampón 1**⁽¹⁾.

Añadir 40 µl de **solución de Zymoliasa 20T** (Seikagaku Corporation; 2,5 mg/ml) e incubarlo 1 hora a 37°C.

Centrifugar 5 min. a 7000 rpm. Eliminar el sobrenadante.

Resuspender el precipitado en 500 µl de **Tampón 2**⁽²⁾.

Añadir 50 µl de **SDS 10% (p/v)**, agitar e incubar 30 min. a 65°C.

Añadir 200 µl de **Acetato de potasio 5M**, agitar e incubar en hielo durante ~1-2 h.

Centrifugar a 4°C, 20 min. a 12000 rpm.

Transferir el sobrenadante, añadir 700 µl de **Isopropanol**, agitar suavemente e incubar 10-15 min. a temperatura ambiente.

Centrifugar 10 min. a 10000 rpm. Eliminar el sobrenadante.

Añadir 500 µl de **etanol al 70% (v/v)**. Centrifugar 5 min. a 10000 rpm y eliminar el sobrenadante.

Secar al vacío. Añadir 30 µl de **TE**⁽³⁾.

Cuantificación del ADN total:

Añadir 4 µl de **ARNasa** (Boehringer Mannheim; 10 mg/ml).

Preparar un gel de 0,8% (p/v) de **agarosa estándar** (Ecogen, SRL) en **TBE (1x)**⁽⁴⁾

Añadir 1 µl de **Bromuro de etidio** (Fluka Biochemika) por cada 25 ml de solución de TBE, (conc. final: 0,4 µg/ml).

⁽¹⁾ **Tampón 1**: Sorbitol 0,9 M; EDTA 0,1 M, pH=7,5

⁽²⁾ **Tampón 2**: Tris 50 mM; EDTA 20mM. Ajustar pH=7,4 con HCl

⁽³⁾ **TE**: Tris 10 mM; EDTA 1 mM. Ajustar pH=8 con HCl

⁽⁴⁾ **TBE (1x)**: Tris 89 mM; Ác. Bórico 89 mM; EDTA 2mM; pH=8

Preparación de la muestra

3 µl de H₂O destilada estéril

1 µl de **colorante azul de bromofenol** (1:2 en H₂O)

1 µl del ADN extraído

La visualización de la banda del **ADN total** se realiza mediante un transiluminador de luz Ultravioleta. Como marcador de peso molecular se utiliza: 2 µl de **DNA Molecular Weight Marker II** (0,12-23,1 kbp, ADN del fago lambda digerido con *HindIII*) de Boehringer Mannheim

2.2. Análisis de los perfiles de restricción (RFLPs) del ADN mitocondrial (mtADN) (Querol *et al.*, 1992)

Digestión del ADN total:

Preparación de la muestra:

10-12 µl de ADN

2,5 µl de **Tampón H** (Boehringer Mannheim)

1 µl de **enzima *HinfI*** (Boehringer Mannheim)

H₂O mili-Q hasta 25 µl

Incubar a 37°C durante toda la noche.

Gel de digestión del ADN total:

Preparar un gel al 0,8% (p/v) de **agarosa estándar** (Ecogen, SRL).

Añadir 1 µl de **Bromuro de etidio** (Fluka Biochemika) por cada 25 ml de solución de TBE, (conc. final: 0,4 µg/ml).

Preparación de la muestra: A la muestra digerida se le añade 2 µl de **colorante azul de bromofenol** (1:2 en H₂O).

La visualización de los fragmentos del **ADN mitocondrial**⁽⁵⁾ se realiza mediante un transiluminador de luz Ultravioleta.

⁽⁵⁾ Sólo se visualizan las bandas del ADN mitocondrial, a pesar de digerir ADN total, porque el enzima de restricción utilizado tiene una secuencia de corte poco habitual en el ADNmt, obteniéndose pocos fragmentos pero de gran tamaño, en cambio, reduce el ADN nuclear a muchos fragmentos pequeños, que se agrupan en la parte inferior del gel.

Como marcador de peso molecular se utiliza: 4 µl de una mezcla 50% (v/v) de **DNA Molecular Weight Marker II** - 50% (v/v) de **DNA Molecular Weight Marker III** (0,12-21,2 kbp, ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII*) de Boehringer Mannheim.

2.3. Análisis de los perfiles de restricción (RFLPs) del ADN ribosomal (rADN) (Guillamón *et al.*, 1998)

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Preparación de la muestra:

1 µl de cada uno de los **primers** (**ITS1** y **ITS4**⁽⁶⁾, 10 pm cada uno)

5 µl de **Tampón Taq 10x**, sin Mg (Ecotaq)

3 µl de **Cloruro de Magnesio** (100 mM, Ecotaq)

4 µl de **dNTPs** (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1 µl de cada uno (dilución 10 mM)

33 µl de H₂O Mili-Q

3 µl de **ADN** extraído

Desnaturalizar durante 5-10'.

Añadir 0,3 µl de **Taq-polimerasa** (Ecotaq).

El **programa** utilizado para amplificar consiste en **40 ciclos** de:

30 seg. a 95°C (Desnaturalización)

1 min. a 52°C (Hibridación)

1 min. a 72°C (Polimerización)

Al final 7 min. más a 72°C para terminar de polimerizar.

Gel para la visualización del amplificado

Preparar un gel al 1,2% (p/v) de **agarosa multipurpose** (Boehringer Mannheim).

⁽⁶⁾ Los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región ITS han sido descritos por White *et al.* (1990). La secuencia de estos oligonucleótidos, sintetizados por ARK Scientific GmbH Biosystems, es: **ITS1-5'TCCGTACGTGAACCTGCGG**, **ITS4-5'TCCTCCGCTTATTGATATGC**.

Añadir 1 µl de **Bromuro de etidio** (Fluka Biochemika) por cada 25 ml de solución de TBE, (conc. final: 0,4 µg/ml).

Preparación de la muestra: A 5 µl del ADN "amplificado" se le añade 1 µl de **azul de bromofenol** diluido 1/2.

Visualización de la banda del amplificado mediante un transiluminador de luz Ultravioleta y por comparación con el marcador, asignación del peso molecular del fragmento

Como marcador de peso molecular se utiliza: 4 µl del **100 bp DNA Ladder** (Gibco BRL).

Digestión del amplificado

Preparación de la muestra:

8 µl del ADN amplificado

2 µl del **Tampón correspondiente según el enzima**

1,5 µl del **enzima**⁽⁷⁾

8,5 µl de H₂O Mili-Q

Incubar a 37°C durante toda la noche.

Gel de digestión del amplificado

Preparar un gel al 2% (p/v) de **agarosa multipurpose** (Boehringer Mannheim).

Añadir 1 µl de **Bromuro de etidio** (Fluka Biochemika) por cada 25 ml de solución de TBE, (conc. final: 0,4 µg/ml).

Preparación de la muestra: A la muestra digerida se le añade 2 µl de **colorante azul de bromofenol** (1:2 en H₂O).

La visualización de los fragmentos de restricción se realiza mediante un transiluminador de luz Ultravioleta. Como marcador de peso molecular se utiliza: 5 µl del **100 bp DNA Ladder** (Gibco BRL).

⁽⁷⁾ Se utilizan 3 enzimas y sus tampones correspondientes (Boehringer Mannheim):

*Hinf*I: Tampón H

*Cfo*I: Tampón L

*Hae*III: Tampón H

3. Determinación del Factor killer (Jacobs *et al.*, 1988)

Para determinar si una cepa es de fenotipo killer o de fenotipo sensible o neutro, se preparan dos placas, una con un césped de la cepa control de fenotipo killer y la otra con un césped de la cepa control de fenotipo sensible.

Preparación de las placas

Medio a utilizar:

YEPD tamponado a un pH = 4,2

Tampón utilizado: 58,60 ml de **Solución A** (0,1 M Ác. cítrico) + 41,40 ml de **Solución B** (0,2 M Fosfato bisódico). En este tampón se disuelven los 20 g/l de glucosa, 20 g/l de peptona y 10 g/l de Extracto de levadura.

Se ajusta el pH y se le añade 20 g/l de agar.

Autoclave 120°C, 15 min.

Solución de azul de metileno 0,003%

Poner en la placa 1 o 2 ml de la solución de azul de metileno y añadir el medio tamponado (15-20 ml)

Preparación del césped

Crecimiento de las 2 cepas control en 5 ml de YEPD.

Contaje al microscopio. Se quiere un césped de 5×10^5 - 1×10^6 cel.

Inoculación del volumen necesario para obtener el césped deseado en 5 ml de agar fundido (40°C).

Se homogeneiza y se vierte sobre el medio.

Para saber si una levadura es de fenotipo killer, sensible o neutro, ésta se siembra en ambas placas control (sensible y killer)

- Si una cepa crece en la placa con césped de levadura control sensible, pero no lo hace en la killer, se trata de una cepa de fenotipo sensible (K⁻R⁻).
- Si una cepa crece en ambas placas, tanto en el césped de fenotipo sensible como killer, se trata de una cepa de fenotipo neutro (K⁻R⁺).

- Si una cepa crece en el césped control killer y en el sensible crece y además crea alrededor un halo de inhibición del crecimiento de la cepa sensible, se trata de una cepa killer (K^+R^+).

Las cepas control utilizadas han sido las siguientes:

Cepa control de fenotipo sensible: CECT 1415

Cepa control de fenotipo killer: CECT 1182

4. Determinación de los ácidos grasos de membrana (Rozès *et al.*, 1992)

Centrifugar las células (aprox. 1×10^8 cel/ml)

Añadir: 1 ml **NaOH 5% en Metanol/H₂O** (v/v)

10 µl de los **Patrones Internos (C7:0, 1 mg/ml; C17:0, 4 mg/ml)**

Agitar e incubar 30 minutos a 100°C

Dejar enfriar

Añadir 500 µl de **HCl 5N**

Agitar

Extracción con **400 µl de Hexano/MTBE** (v/v)

6 intervalos de:

30 segundos Agitación (Vortex)

30 segundos Reposo

Recuperar la fase orgánica y pasarla a un vial

Con la Fase Acuosa, repetir la extracción para recuperar el máximo de fase orgánica

Sellar el vial

Todo el material debe limpiarse con **dicromato potásico**

Análisis de los extractos

Los extractos se analizaron mediante Cromatografía de Gases.

El equipo utilizado era un Hewlett-Packard 5890 conectado a un ordenador HP Vectra con el Software ChemStation (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). La columna utilizada era una FFAP-HP 30 m × 0,25 mm y 0,25 µm de espesor (Agilent). La muestra (2 µl) era inyectada por un inyector automático HP 7673 (Agilent).

El programa de temperatura era: 140°C×4°C/min hasta 240°C (13 minutos). La temperatura del inyector y detector eran 250 y 280°C, respectivamente.

El gas vector utilizado era el Helio a un flujo constante de 1,2 ml/min.

Los patrones internos utilizados eran el ácido heptanoico (1 mg/ml) y heptadecanoico (4 mg/ml). El ácido heptanoico servía como patrón interno para los ácidos C6:0; C8:0; C10:0; C12:0; C14:0; C14:1, mientras el ácido heptadecanoico se utilizaba para los ácidos C16:0; C16:1; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3; C20:0.

Los ácidos grasos se identificaron a partir de los tiempos de retención obtenidos al inyectar una solución de referencia que contenía una concentración conocida de todos los ácidos grasos que se querían determinar. La solución de referencia fue tratada exactamente igual que si fuera una muestra.

Los cálculos realizados fueron los siguientes, siendo A.G. ácido graso, P.I. patrón interno y ref. solución de referencia:

$$K_{\text{ref}} = [\text{A.G.}]_{\text{ref}} \times \frac{\text{Área P.I.}_{\text{ref}}}{\text{Área A.G.}_{\text{ref}}}$$

$$[\text{A.G.}]_{\text{muestra}} = K_{\text{ref}} \times \frac{\text{Área A.G.}_{\text{muestra}}}{\text{Área P.I.}_{\text{muestra}}}$$

5. Determinación de los compuestos volátiles del vino (Lema *et al.*, 1996)

Colocar 50 ml de muestra a un matraz de 100 ml con un imán

Añadir: 1 ml de una **solución de patrones internos**:

Ácido heptanoico (C7:0, 3,22 mg/l)

Ácido heptadecanoico (C17:0, 2,90 mg/l)

1-nonanol (0,92 mg/l)

0,5 ml de **H₃PO₄ al 30%**

4 ml de una **mezcla de Hexano/Éter** (v/v)

Tapar el matraz y dejarlo en agitación homogénea durante 10 minutos

Pasar la muestra a un embudo de decantación y dejarlo en reposo durante 10 minutos

Recoger la fase acuosa de nuevo en el matraz, y la fase orgánica en un tubo

Añadir 2 ml de **Hexano/Éter** (v/v) a la fase acuosa y repetir la agitación, reposo y extracción.

La fase orgánica unirla con la anterior, y con la fase acuosa repetir el proceso.

El tubo con la fase orgánica (recogida tras 3 extracciones) se tapa y agita para romper la emulsión formada.

Con una pipeta recoger la fase superior y pasarla a un vial.

Sellar el vial.

Todo el material debe limpiarse con **dicromato potásico**

Análisis de los extractos

2 µl de muestra son inyectados en un Cromatógrafo de gases. El equipo utilizado era un Hewlett-Packard 4890A conectado a un Integrador Hewlett-Packard 3393A con un detector de ionización de llama (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). La columna utilizada era una FFAP-HP 30 m × 0,25 mm y 0,25 µm de espesor (Agilent).

El programa de temperatura era: 50°C × 4°C/min hasta 240°C (15 minutos). La temperatura del inyector y detector eran 240°C.

El gas vector utilizado era el Helio a un flujo constante de 1,0 ml/min.

Los patrones internos utilizados eran los ácidos heptanoico (3,22 mg/l) y heptadecanoico (2,90 mg/l) y el 1-nonanol (0,92 mg/l). El ácido heptanoico servía como patrón interno para los ácidos C4:0; C6:0; C8:0; C10:0; C12:0; C14:0; C14:1, el ácido heptadecanoico se utilizaba para

los ácidos C16:0; C16:1; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3; C20:0, mientras que el 1-nonanol era el patrón interno de todos los alcoholes superiores y los ésteres de los alcoholes superiores y ácidos grasos.

Los compuestos volátiles se identificaron a partir de los tiempos de retención obtenidos al inyectar una solución de referencia que contenía una concentración conocida de todos los compuestos volátiles que se querían determinar. La solución de referencia fue tratada exactamente igual que si fuera una muestra.

Los cálculos realizados fueron los siguientes, siendo A.G. ácido graso, P.I. patrón interno y ref. solución de referencia:

$$K_{\text{ref}} = [\text{A.G.}]_{\text{ref}} \times \frac{\text{Área P.I.}_{\text{ref}}}{\text{Área A.G.}_{\text{ref}}}$$

$$[\text{A.G.}]_{\text{muestra}} = K_{\text{ref}} \times \frac{\text{Área A.G.}_{\text{muestra}}}{\text{Área P.I.}_{\text{muestra}}}$$

6. Determinación de la concentración intracelular de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes

Extracción de los metabolitos intracelulares (Gonzalez *et al.*, 1997)

Centrifugar las células (1×10^8 cel/ml)

Al precipitado, añadirle rápidamente de 3 a 5 ml de **Etanol puro diluido al 75% con Hepes** (70 mM, pH 7,5) hirviendo.

Incubar durante 3 minutos a 80°C

Concentrar hasta la sequedad y resuspender el precipitado en 1-2 ml de H₂O millipore.

Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Recuperar el sobrenadante donde están disueltos los metabolitos intracelulares.

Congelar a -20°C.

Análisis del extracto

El extracto (25 µl) fue analizado por HPLC. El equipo utilizado era un Hewlett-Packard HP 1050 conectado a un Integrador Hewlett-Packard 3395A equipado con un detector HP 1047 RI (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). La columna utilizada era una AMINEX HPX-87H de 300 × 7,8 mm (BioRad, Hercules, CA, USA). El solvente utilizado era H₂SO₄ 2,5 mM, previamente desgasificado, a un flujo constante de 0,5 ml/min. La temperatura de análisis era 60°C.

La concentración de cada metabolito se calculó mediante una recta patrón y los resultados se expresaron como mg por g de peso seco.

7. Análisis químicos

El grado alcohólico se ha medido con un ebuliómetro electrónico (García Barceló, 1990).

La medida de la glucosa/fructosa, acetaldehído, glicerol y los ácidos succínico, acético y málico se realizó por métodos enzimáticos (Boehringer Mannheim).

7.1. Acidez total (Ough y Amerine, 1987)

Colocar 10 ml de muestra en un Erlenmeyer y añadir 2-3 gotas de **fenoftaleína** (1%)

Valorar con **NaOH 0,1 N**.

Cálculos:

$$N_{\text{muestra}} = \frac{\text{ml de NaOH gastados} \times 0,1 \text{ N}}{10 \text{ ml muestra}}$$

$$N_{\text{muestra}} \text{ (eq/l)} \times \frac{1 \text{ eq Ác. Tart.}}{2 \text{ eq NaOH}} \times \frac{150 \text{ g Ác. Tart}}{1 \text{ eq Ác. Tart.}} = \text{Acidez total expresada en g/l de Ác tartárico}$$

7.2. Análisis de los azúcares reductores mediante el método GAB (García Barceló, 1990)

Se fundamenta en la reducción del cobre por los azúcares y valoración del cobre residual por yodometría

Reactivos:

- Solución de **sulfato de cobre** pentahidrato: 41,92 g de sulfato cúprico, 10 ml de ácido sulfúrico 0,5 M y enrasar con agua a 1 litro.
- Solución **alcalina**: 250 g de tartrato sódico potásico se disuelven en 400 ml
80 g de hidróxido sódico se disuelven en 400 ml
Mezclar ambas soluciones en un matraz de un litro y enrasar con agua cuando la solución esté fría.

- Solución de **yoduro potásico**: En un matraz de un litro se colocan 300 g de yoduro potásico y unos 500 ml de agua. Se disuelve y se añaden 100 ml de solución de hidróxido sódico 1 M. Se mezcla bien y se enrasa con agua.
- Solución de **Ácido sulfúrico al 16%**: 175 ml de ácido concentrado sobre agua y enrasar a 1 litro.
- Solución de **almidón**: 8 g de almidón en agua se vierten en 500 ml de agua hirviendo y se mantienen durante 2 minutos. Se deja enfriar. En 400 ml de agua se disuelven 20 g de yoduro potásico y 10 ml de hidróxido sódico 1 M. Se mezclan las dos soluciones y se enrasa a 1 litro.
- Solución de **tiosulfato**: 13,78 g de tiosulfato sódico puro, 50 ml de hidróxido sódico 1 M y enrasar con agua hasta 1 litro.

En un Erlenmeyer se vierten 10 ml de la solución de **sulfato de cobre**, medidos exactamente con la pipeta de doble enrase, 5 ml de solución **alcalina**, 2 ml de muestra y un poco de piedra pómez.

Se tapa con un vidrio de reloj y a continuación se coloca en un calefactor eléctrico previamente caliente y se espera a que comience a hervir.

A partir de ese momento se cuentan exactamente un minuto y medio.

Dejar enfriar y añadir 10 ml de **yoduro**, 10 ml de **almidón** y 10 ml de **ácido sulfúrico**.

Se valora con **tiosulfato sódico**. La valoración habrá acabado cuando se obtenga una coloración color crema.

La graduación de las buretas GAB viene dada directamente en gramos de azúcares reductores por litro. Si la muestra se ha diluido, el resultado se deberá multiplicar por el factor de dilución.

7.3. Análisis del anhídrido sulfuroso libre y total mediante el método GAB (García Barceló, 1990)

- **Sulfuroso libre**

Colocar en un Erlenmeyer: 25 ml de muestra medidos con pipeta, 2-3 ml de **indicador** (solución de almidón al 1%) y 5 ml de **ácido sulfúrico al 33%**.

Se valora con **yodato potásico** (N/128).

Para calcular la cantidad de sulfuroso en la muestra se multiplica el volumen gastado por 10 (1 ml equivale a 10 mg de SO₂/l).

- **Sulfuroso total**

Colocar en un Erlenmeyer: 25 ml de muestra y 10 ml de **NaOH al 4%**.

Tapar, agitar y dejar en reposo durante 10 minutos.

Añadir 2-3 ml de **indicador** (solución de almidón al 1%).

Valorar con **yodato potásico** (N/128).

Para calcular la cantidad de sulfuroso en la muestra se multiplica el volumen gastado por 10.

7.4. Determinación del nitrógeno total asimilable o Índice de formol (Aerny, 1996)

Calibrar el pH

Ajustar el pH de la solución de **formaldehído** con **NaOH 0,25 M** a 8,1

Poner 25 ml de muestra en un vaso de precipitados. Si la muestra contiene anhídrido sulfuroso, añadir algunas gotas de **agua oxigenada al 30%**.

Ajustar a pH 8,1 con la solución de **NaOH 0,25 M**

Añadir 10 ml de la solución de **formaldehído** (pH = 8,1) y mezclar

Después de dejarlo en reposo durante un minuto a temperatura ambiente, valorar la solución con **hidróxido de sodio 0,25 M** hasta que el pH vuelva a ser 8,1.

Si la valoración necesita más de 20 ml de solución de NaOH, repetir el proceso añadiendo 15 ml de formaldehído en lugar de 10 ml.

Cálculos:

Índice de formol (no tiene unidades) = 10 × ml de NaOH 0,25 M gastados

Nitrógeno total asimilable (mg de N/l) = 14 × Índice de formol

7.5. Análisis de la acidez volátil mediante el método García-Tena (García Barceló, 1990)

Se basa en una destilación fraccionada del vino y valoración separada de las fracciones recogidas. El primer volumen se recoge en una probeta de 5,1 ml y el segundo en una probeta

de 3,2 ml. El equipo empleado es el GAB, que consiste en una placa calefactora eléctrica y un destilador.

Encender el aparato 15 minutos antes del primer análisis para que el calefactor alcance la temperatura adecuada.

Medir 10 ml de la muestra descarbonizada y colocar en el matraz de destilación. Añadir un poco de piedra pómez.

Colocar el matraz en el destilador y la probeta de 5,1 ml en la salida del refrigerante.

Colocar la placa calefactora bajo el matraz, procurando que el fondo del mismo, asiente perfectamente.

Cuando la probeta de 5,1 ml esté llena, se substituye rápidamente por la probeta de 3,2 ml.

Cuando se llena la probeta de 3,2 ml se da por terminada la destilación.

El líquido recogido en la probeta de 3,2 ml se valora con **NaOH 0,0204 M** utilizando la **fenoftaleína** (1%) como indicador.

Con los ml de NaOH gastados se consultan unas tablas y se determina la acidez volátil.

7.6. Determinación del color del vino y de los compuestos fenólicos

• **Intensidad colorante (IC)** (OIV, 1990)

Indica la intensidad del color, así como la contribución del color amarillo, rojo y azul.

En una cubeta de 1 mm de camino óptico se miden las absorbancias a 420, 520 y 620 nm de un vino previamente centrifugado. El resultado se multiplica por 10 para referirlo a la cubeta estándar de 10 mm de camino óptico.

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

• **Compuestos fenólicos totales** (OIV, 1990)

La medida de la absorbancia a 280 nm del vino da un índice del contenido en compuestos fenólicos totales. Se utiliza una cubeta de cuarzo de 10 mm de camino óptico. Para los vinos blancos, rosados y tintos, las muestras se diluyen con agua: 1:10, 1:30 y 1:100, respectivamente.

El resultado se multiplica por la dilución.

• **Análisis de los antocianos** (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965)

En un vaso de precipitados se añade:

- 1 ml de vino
- 1 ml de **etanol absoluto**
- 20 ml de **HCl al 0,7%**

A continuación se toman dos tubos de ensayo y se añade:

<u>Tubo 1</u>	<u>Tubo 2</u>
5 ml de la mezcla	5 ml de la mezcla
2 ml de Agua destilada	2 ml de NaHSO₃ al 7%

Se tapan cuidadosamente los tubos, se agitan y al cabo de 10 minutos se leen las absorbancias a 520 nm en la cubeta de 10 mm de camino óptico (tubo 1 = A₁; tubo 2 = A₂)

$$\text{Antocianos totales (mg/l)} = (A_1 - A_2) \times 875$$

El coeficiente de 875 es el coeficiente de extinción molar de la malvidina corregido para dar directamente el resultado en mg/l.

• **Análisis de los taninos totales** (Glories, 1978)

Se preparan dos tubos con tapón de rosca con la siguiente mezcla:

<u>Tubo 1</u>	<u>Tubo 2</u>
2 ml de vino diluido 1:50	2 ml de vino diluido 1:50
1 ml de Agua destilada	1 ml de Agua destilada
6 ml de HCl 12N	6 ml de HCl 12N

El tubo 1 se tapa herméticamente y se protege de la luz con papel de aluminio. A continuación, se coloca al baño María durante 30 minutos. El tubo 2 se deja a temperatura ambiente.

Al cabo de los 30 minutos de ebullición, el tubo 1 se enfría de forma rápida.

A los tubos 1 y 2 se les añade 1 ml de **etanol absoluto** y después de agitar se leen las absorbancias a 550 nm (tubo 1 = A₁; tubo 2 = A₂)

$$\text{Taninos condensados totales (g/l)} = (A_1 - A_2) \times 19,33$$

El coeficiente 19,33 corresponde al coeficiente de extinción molar de la cianidina obtenida de la hidrólisis ácida de los taninos condensados corregido para dar directamente el resultado en g/l.

BIBLIOGRAFÍA

- Aerny, J.** (1996) Composés azotés des moûts et des vins. *Revue suisse Vitic Arboric. Hortic.* 28, 161-165.
- García Barceló, J.** (1990) Técnicas analíticas para vinos. (Ed. J. García Barceló). GAB: Barcelona.
- Glories, Y.** (1978) Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Tesis doctoral, Université Bordeaux II, Bordeaux, France.
- Gonzalez, B., François, J. y Renaud, M.** (1997) A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13, 1347-1356.
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. y Querol, A.** (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
- Harris, J.O. y Watson, W.** (1968) *J. Inst. Brew.* 74, 286
- Jacobs, C.J., Fourie, I. y van Vuuren, H.J.J.** (1988) Occurrence and detection of killer yeast on Chenin blanc grapes and grapes skins. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 9, 28-31.
- Lema, C., García-Jares, C., Orriols, I. y Angulo, L.** (1996) Contribution of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 206-216.
- Morris, E.O. y Eddy, A.A.** (1957) *J. Inst. Brew.* 63, 34.
- OIV** (1990) Recueil des Méthodes International d'Analyse des Vins et des Moûts. A. Dedon Confecit: Paris.
- Ough, C.S. y Amerine, M.A.** (1987) Methods for analysis of must and wines. Wiley-Interscience Publication: California.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D.** (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
- Ribéreau-Gayon, P. y Stonestreet, E.** (1965) Le dosage des anthocyanes dans les vins rouges. *Bull. Soc. Chim.* 9, 2649-2652.
- Rozès, N., García-Jares, C., Larue, F. y Lonvaud-Funel, A.** (1992) Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J. Sci. Food Agric.* 59, 351-357.

ANEXO 2:

**REGISTRO DE LA PATENTE Y
FOLLETO COMERCIAL DE LA CEPA
RV1**

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL
PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

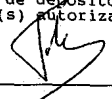
FORMULARIO INTERNACIONAL

DESTINATARIO:

Dr. Alberto Mas Baron.
Facultad de Enologia, Universitat
Novira i Virgili. 43005 TARRAGONA

RECIBO EN CASO DE DEPOSITO INICIAL
expedido en virtud de la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPOSITO
identificada en la parte inferior de esta página

NOMBRE Y DIRECCION
DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación asignada por el DEPOSITANTE: PTA3	Número de orden atribuido por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPOSITO: Saccharomyces cerevisiae CECT 11462
II. DESCRIPCION CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I venía acompañado:	
<input checked="" type="checkbox"/> de una descripción científica	
<input checked="" type="checkbox"/> de una designación taxonómica propuesta (Márquese lo que corresponda)	
III. RECEPCION Y ACEPTACION	
Esta autoridad internacional de depósito acepta el microorganismo identificado en I, que ha recibido el 12 Noviembre 1999 (fecha del depósito inicial) ¹	
IV. RECEPCION DE UNA PETICION DE CONVERSION	
Esta autoridad internacional de depósito ha recibido el microorganismo identificado en I, el (fecha del depósito inicial) y recibió una petición de conversión de depósito inicial en depósito conforme con el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la petición de conversión)	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPOSITO	
Nombre: Autoridad Internacional de Depósito (CECT)	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la autoridad internacional de depósito o del (de los) empleado(s) autorizado(s)
Dirección: 43005 TARRAGONA (España)	Fecha 23 Noviembre 1999 

¹En caso de aplicación de la Regla 6.4d), ésta será la fecha en la que haya sido adquirido el estatuto de autoridad internacional de depósito.

Formulario BP/4 (página única)

1692S/IPD

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL
PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DESTINATARIO:
Dr. Alberto Mas Baron.
Facultad de Enologia. Uni-
versitat Rovira i Virgili.
43005 TARRAGONA
NOMBRE Y DIRECCION DE LA PARTE
A LA QUE SE EXPIDE LA
DECLARACION SOBRE LA VIABILIDAD

DECLARACION DE VIABILIDAD,
expedida en virtud de la Regla 10.2 por la
AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPOSITO
identificada en la página siguiente

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO
Nombre: Dr. Alberto Mas Baron. Facultad de Enologia. Uni- Dirección: versitat Rovira i Virgili. 43005 TARRAGONA	Número de orden atribuido por la CECT 11462 AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPOSITO: Fecha del depósito o de la transferencia ¹ : 12 Noviembre 1999
III. DECLARACION DE VIABILIDAD	
<p>La viabilidad del microorganismo identificado en II ha sido controlada el 22 Noviembre 1999 ². En esa fecha, el microorganismo</p> <p>³ <input checked="" type="checkbox"/> era viable</p> <p>³ <input type="checkbox"/> ya no era viable</p>	

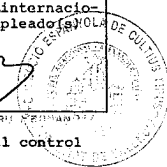
¹ Indíquese la fecha del depósito inicial o, si se ha efectuado un nuevo depósito o una transferencia, la más reciente de las fechas pertinentes (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

² En los casos previstos en la Regla 10.2.a)ii) y iii), menciónese el control de viabilidad más reciente.

³ Márquese el recuadro correspondiente.

Formulario BP/9 (primera página)

IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA EFECTUADO EL CONTROL DE VIABILIDAD⁴	
Resiembra en medios de cultivo adecuados.	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPOSITO	
Nombre: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) Dirección: UNIVERSIDAD DE VALENCIA EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN Campus de Burjassot 46100 BURJASOT (Valencia)	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la autoridad internacional de depósito o del(de los) empleado(s) autorizado(s) Fecha: 23 Noviembre 1990



⁴ Deberá cumplimentarse si se ha solicitado esta información y si los resultados del control fuesen negativos.

Selección de una levadura de **TERRA ALTA** y **PRIORAT** para su utilización como iniciador de fermentación

Equipo Investigador:

Maria Jesus Torija, Nicolas Rozès, JoséManuel Guillamón y Albert Mas

Justificación

Las condiciones de elaboración de vinos en Catalunya son muy variables, encontrándonos con zonas de muy diversa innovación tecnológica, con zonas punteras líderes en innovación (Penedés) y zonas consideradas por la misma administración catalana como "desfavorecidas", indicando un mundo rural poco receptivo a innovaciones. Entre éstas, dos zonas destacan por lo que se refiere a sus vinos: Priorat y Terra Alta.

Las características de estas zonas se incluyen en la siguiente tabla:

	Priorat	Terra Alta
Superficie de viñedo (ha)	1.000	10.000
Producción de vinos (hl)	10.000- 15.000	170.000- 200.000
Nº elaboradores	19	35
Tipos preferentes de vinos	Tintos	Blancos

A pesar de los datos expresados en las tablas, estas zonas coinciden en una serie de características, que las hacen idóneas para un estudio de selección de levaduras:

- Vinos característicos con mucho cuerpo y elevado grado alcohólico (13-16%) lo que hace que las levaduras hayan de ser resistentes a elevada graduación alcohólica.
- Reticencia a la innovación tecnológica, a pesar de su disminución durante los últimos años, tanto por aspectos culturales como económicos, lo que supone:
 - Falta de regulación térmica en las fermentaciones y en las bodegas. Las fermentaciones se realizan a temperatura ambiente en muchos casos y ésta puede ser muy variable, desde 12° a 32°C, lo que implica que las levaduras pueden tener un amplio rango de temperaturas de fermentación.
 - Sistemas clásicos de conducir la fermentación, lo que incluye elevadas dosis de SO₂ (levaduras resistentes), higiene precaria (buena capacidad competitiva), ausencia de inoculación (cepas de levaduras realmente autóctonas, residentes habituales en bodega y campo).

A estas características se les debe añadir un fuerte orgullo de tierra, con una defensa cultural de las cosas que les son propias. La existencia de cepas de levaduras que puedan defender la tipicidad de sus vinos serán fácilmente acogidas entre la población y, de hecho, puede suponer un paso inicial a su renovación tecnológica, imprescindible desde el punto de vista de unos mercados cada vez más competitivos.

La necesidad de asegurar la fermentación alcohólica requiere, cada vez más, el uso de cultivos iniciadores. Actualmente, la selección de levaduras en enología consiste en elegir entre la flora autóctona una o más cepas de levaduras características y adaptadas a ciertas condiciones que

aseguren tanto el buen desarrollo de la fermentación como la tipicidad de los vinos. Las características particulares de estas dos denominaciones de origen donde se producen vinos de elevado grado alcohólico y temperaturas de fermentación extremas, las hacen muy interesantes para la selección de cepas.

Características de la levadura seleccionada

Los criterios de selección de levaduras para las regiones de Terra Alta y de Priorat han sido las siguientes:

- conservación de las características típicas de los vinos de cada región
- capacidad alcohólica elevada
- potenciar a través de la selección algunas características como la capacidad fermentativa a altas temperaturas (32°-35°C) o de amplio rango de temperaturas (15°-35°C), resistencia a SO₂

La selección de levaduras autóctonas permitirá la implantación de la práctica de inocular los mostos sin que esto provoque la pérdida de la tipicidad de los vinos y haciendo posible que el proceso de vinificación transcurra en las condiciones tradicionales.

La levadura seleccionada se ha ensayado en diversas ocasiones tanto a nivel industrial como de laboratorio habiéndose observado su buena capacidad de imposición y la conducción de fermentaciones frente a otras poblaciones de levaduras. Asimismo, se ha ensayado la posibilidad de aplicación industrial mediante pruebas de secado y estabilidad genética, mediante la empresa Lallemand Inc en sus plantas de investigación de Toulouse y Montreal. Los resultados han demostrado su capacidad de secado, rehidratación y el posterior mantenimiento de la capacidad fermentativa, condiciones todas ellas necesarias para su posterior explotación industrial.

Explotación de la patente

De acuerdo con el contrato firmado en su día con la empresa SEPSA, se mencionaba la preferencia de la URV para depositar la patente, apareciendo como inventores el equipo investigador arriba mencionado. SEPSA, a su vez se obligaba a colaborar en la defensa y al pago anual del derecho de patente así como a las cargas fiscales y de producción que se generen mientras tuviera la exclusividad de la explotación (Cláusulas novena, décima y undécima). Durante la explotación en exclusiva, la empresa satisfará el 5% del importe de la facturación del producto a nivel mundial.

De acuerdo con la normativa de propiedad industrial de la URV, los beneficios obtenidos en la explotación de la patente se distribuyen al 60% entre la Universidad y el 40% entre el equipo investigador. De acuerdo con la participación de los diferentes miembros en el proyecto, éstos acuerdan distribuirse su parte de acuerdo con la siguiente distribución:

- M. J. Torija: 40%
- N. Rozès, J.M. Guillamón y A. Mas: 20% cada uno.

LALVIN**RV1***Saccharomyces cerevisiae var. cerevisiae*
**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**

ORIGEN

Cepa seleccionada por el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Facultad de Enología de Tarragona (Univ. Rovira i Virgili). Fue aislada en las **Denominaciones de Origen Priorat y Terra Alta**, a partir de mostos en fermentación con alto contenido en azúcares, polifenoles y bajo contenido en nitrógeno fácilmente asimilable.

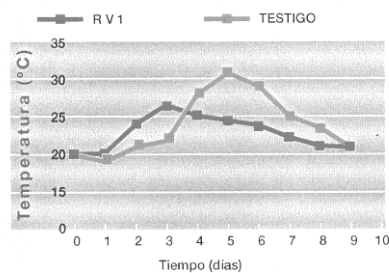
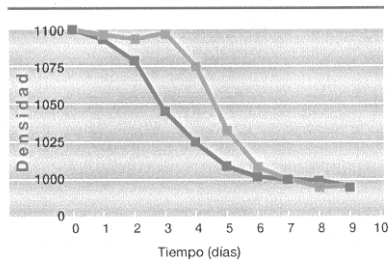
PROPIEDADES ENOLÓGICAS

Cinética de fermentación. Desarrollo rápido y regular de la fermentación (*Ver figuras*). Fase de latencia reducida al mínimo incluso en presencia de elevadas concentraciones de SO₂.

Poder alcoholígeno. Caracterizada por su vigor fermentativo, posee un poder alcoholígeno comprendido entre 14-15 % (v/v).

Tolerancia al etanol. La cepa RV1 se distingue por su elevada tolerancia al etanol, asegurando finales de fermentación rápidos y completos.

Temperatura óptima. Fermenta bien entre 20-30°C, siendo también adecuada para fermentaciones a temperatura controlada por debajo de 18°C.



RV1: Curvas de variación de densidad, y temperatura en fermentación.

LALLEMAND

LALLEMAND INC. 1620 Préfontaine H1W2N8 - MONTREAL CANADA - Tel.: +1 514 522 21 33 - Fax: +1 514 522 28 84

LALLEMAND

LEVURE SECHE DE VINIFICATION • LEVITO SECCO PER VINIFICAZIONE •
TROCKENREIZUCHTHEFE FÜR WEIN •
LEVADURA SECA PARA VINIFICACION • DRY WINE YEAST

Producción de acidez volátil: baja

Producción de acetaldehído: inferior a 15 mg/l.

Producción de ácido sulfhídrico: en fermentaciones industriales, no ha dado evidencia de producción de H₂S.

Resistencia al anhídrido sulfuroso: elevada.

Producción de espuma: muy escasa.

Características organolépticas. La cepa RV1 exalta la tipicidad de variedades tintas como Garnacha y Cabernet Sauvignon.

Proporciona aromas ligeros de frutas maduras en perfecta sinergia con la sensación de suavidad y redondez en boca.

Recomendado para destacar los aromas primarios varietales y potenciar los de crianza.

CAMPO DE APLICACIÓN

La cepa RV1 ha demostrado ser particularmente apropiada en fermentación de mostos de elevado contenido en azúcar. Las pruebas, efectuadas con mostos de Cabernet Sauvignon y Garnacha tinta en bodegas de las D.O. Terra Alta y Priorat, mostraron una imposición total de la cepa sobre la microbiota autóctona.

DOSIS Y MODO DE EMPLEO

Para obtener los mejores resultados es indispensable asegurar la buena implantación de la cepa en el medio, por lo tanto es importante:

- Mantener una buena higiene en la bodega.
- Añadir la levadura lo antes posible.
- Respetar la dosis prescrita.
- Rehidratar bien la levadura.

Dosis: Vino blanco 25-40 g/Hl.
Vino tinto 15-30 g/Hl.

Rehidratación:

1. Sumergir las levaduras secas en 10 veces su peso en agua a 35°-40°C (10 litros de agua por 1 kg de levadura).
2. Esperar 15 minutos.
3. Agitar la mezcla.
4. Esperar 15 minutos e incorporar al mosto, procurando que no haya una diferencia de más de 10°C entre el medio rehidratado y el mosto.

DISTRIBUIDO POR:



Vilafranca del Penedés:
93 892 00 00
Alcazar de San Juan:
926 54 00 20
Valencia:
96 331 02 39
Logroño:
941 22 06 31
Jerez de La Frontera:
956 34 17 10

El fabricante garantiza la calidad del producto en su embalaje de origen.

Los datos y procesos descritos que figuran en este documento son el resultado de experiencias científicas y ensayos técnicos realizados siguiendo un criterio de objetividad. Tanto la adaptación a cada caso particular como las consecuencias y circunstancias específicas de cada tratamiento no están bajo nuestra responsabilidad.

LALLEMAND

LALLEMAND INC. 1620 Préfontaine H1W2N8 - MONTREAL CANADA - Tel.: +1 514 522 21 33 - Fax: +1 514 522 28 84

LLEVURE SECHE DE VINIFICATION • LIEVITO SECCO PER VINIFICAZIONE •
TROCKENREINZUCHTHEE FÜR WEIN •
LEVADURA SECA PARA VINIFICACIÓN • DRY WINE YEAST

LALLEMAND