

Evaluación tecnológica en bodega de una levadura vínica patagónica previamente propagada en un sustrato no convencional

BRAVO Sebastián M.E.^{1,2}, MORALES Manuel A², DEL MÓNACO
Silvana M¹, VICENTE
Fausto², CONSTENLA Diana T³ y CABALLERO Adriana C.^{1,2}

¹Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas. PROBIEN (UNCo-CONICET). Buenos Aires 1400. Neuquén. Neuquén.

²Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. (FACTA-UNCo). Reconquista y 25 de Mayo. Villa Regina. Río Negro.

³Departamento Ing. Química UNS - Planta Piloto de Ingeniería Química. PLAPIQUI (UNS-CONICET). Bahía Blanca. Bs As.
e-mail: sebastianxbravo@gmail.com

En los últimos años, la vitivinicultura nacional recuperó el lugar de relevancia que históricamente tuvo dentro de las agroindustrias. En la región del Comahue (Patagonia noroccidental) este renacer de la vitivinicultura se tradujo en una significativa reactivación de la actividad en las áreas productivas históricas (Alto Valle de Río Negro) y en el desarrollo de nuevas áreas (Departamento de Añelo, provincia del Neuquén). Actualmente la producción regional está mayoritariamente orientada a la elaboración de vinos tintos jóvenes y secos (80%) de variedades neutras de vid como Malbec y Merlot [1], contando la región con condiciones agroecológicas óptimas para expresar todo su potencial enológico [2]. No obstante, una economía globalizada, manejada por el consumo y mercados exigentes por productos cada vez más selectos, impone a los vitivinicultores regionales nuevos desafíos que requieren de innovación tecnológica. Mientras la vinificación es un proceso complejo desde el punto de vista ecológico en el que las levaduras, responsables de conducir la fermentación primaria o alcohólica (FA), desempeñan un rol protagónico, las tendencias innovadoras de la enología actual están mayoritariamente orientadas a la exploración de las propiedades del vino relacionadas con este recurso microbianos y a su manejo adecuado mediante el uso de cultivos iniciadores de la FA [3].

Los cultivos iniciadores son cultivos puros de cepas de levaduras especialmente seleccionadas por sus propiedades para uso en enología que se comercializan bajo la forma de levadura seca activa (LSA) y que previa rehidratación se adicionan al mosto fresco en altas densidades celulares con el fin de normalizar la biota asociada al proceso fermentativo y rendir vinos de calidad controlada. Existe evidencia que variaciones geográficas observadas en la composición de las poblaciones microbianas asociadas a terruños vitivinícolas se correlacionan con las características organolépticas distintivas de los vinos elaborados en ellos, permitiendo proponer el concepto de “terroir microbiano” [4, 5 y 6], comunidades constituidas por especies y cepas de

microorganismos típicas de la zona geográfica de producción del vino [7]. En este contexto, la conducción de las vinificaciones mediante el uso de cultivos iniciadores (*starters*) autóctonos de cada terruño es actualmente una tendencia en expansión en la vitivinicultura mundial con el fin de agregar valor a los vinos mediante el control y la diferenciación de su calidad [8].

Con el objetivo de desarrollar cultivos iniciadores de la FA autóctonos de la Patagonia, actualmente inexistentes en el mercado, en trabajos previos se caracterizaron la diversidad específica e intraespecífica de la biota levaduriforme asociada a uvas, mostos de fermentación y superficie de bodegas de la región del Comahue seleccionándose diversas cepas autóctonas con propiedades adecuadas para uso enológico [9]. Una de estas cepas, *Saccharomyces cerevisiae* F8 (*Sc* F8 propagada en pie de cuba fue evaluada en vinificaciones regionales a escala piloto con excelentes resultados [10] proponiéndose su producción a nivel industrial en la forma de LSA para su comercialización como cultivo iniciador.

1. Objetivo del trabajo

Evaluar a escala industrial (Bodega) la capacidad de esta cepa autóctona *S. cerevisiae* F8 de conducir exitosamente vinificaciones en tinto regionales otorgando carácter diferencial en la calidad del vino previa propagación de su biomasa en un sustrato no convencional.

2. Metodología y resultados

Las células de *Sc* F8 se propagaron a escala piloto utilizando un sustrato no convencional abundante en la región como es el bagazo de manzanas (medio EBM) [11] en sistema de cultivo por lotes a 30°C [12]. Previa evaluación de su calidad sanitaria y microbiológica por métodos convencionales y moleculares [12], la biomasa húmeda se inoculó en 15.000L de mosto Malbec sulfitado (Bodega Favretto, Villa Regina, Vendimia 2019). Los controles fueron vinificaciones conducidas por cultivos comerciales ampliamente utilizados en vinificaciones en tinto regionales, *S. cerevisiae* F15 de Lafort (*Sc* F15, LSA) o por la bodega elaboradora, *S. cerevisiae* Bacofer de Tudela (*Sc* BA, levadura líquida). La cinética de las fermentaciones alcohólicas (FA) se siguió por evolución de los grados Baumé (°Bmé) y de la temperatura, y la capacidad de implantación de las cepas por recuento de viables en GPY agar y análisis molecular para identificación de especies (ITS PCR/RFLP) [13] y discriminación de cepas (ADNmit/RFLP con *HinfI*) [14]. El análisis fisicoquímico de los vinos se realizó conforme a los métodos propuestos por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) y el sensorial mediante una prueba de preferencia realizada por 17 enólogos regionales de vasta experiencia profesional. En esta prueba los diferentes vinos elaborados se identificaron con diferentes letras (A, B y C) debiendo el consumidor asignarle a cada vino un valor 1, 2 o 3 según su preferencia. Uno, el preferido en primer lugar, dos en segundo lugar y tres en tercer lugar. En esta degustación a ciegas, el promedio obtenido para cada vino es más cercano a uno cuanto mayor es su preferencia

por el consumidor.

Todas las vinificaciones conducidas mostraron cinéticas correspondientes a FA normales (Figura 1) y los ensayos moleculares de discriminación a nivel de individuos evidenciaron que las tres cepas de *S. cerevisiae* son capaces de implantarse, entendiéndose por implantación la capacidad de dominar numéricamente a la biota indígena, y conducir exitosamente la FA (datos no mostrados). No obstante, los cultivos autóctonos presentaron un inicio de fermentación y un secado mosto más rápido que los comerciales (Figura 1) completando el proceso 48 h antes que éstos. Esta mayor actividad fermentativa no se tradujo en una mayor temperatura del proceso, que nunca superó los 22°C (Figura 1), evidenciando una mayor eficiencia energética de la cepa autóctona acreditada por la menor disipación de energía en forma de calor respecto de sus contrapartes comerciales. Ambos comportamientos del cultivo autóctono son de gran importancia industrial por sus efectos positivos sobre los costos de producción (reducción de tiempo y energía).

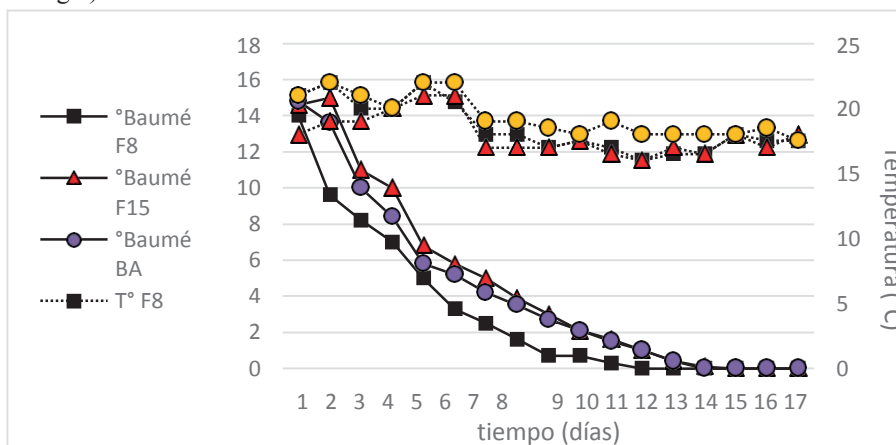


Figura 1: Cinética de las fermentaciones alcohólicas de las vinificaciones en tinto Patagónicas conducidas por los cultivos iniciadores autóctono (*Sc* F8) y comerciales (*Sc* F15 y *Sc* BA).

Los vinos presentaron características fisicoquímicas de vinos normales, aunque *Sc* BA fue incapaz de secar el mosto ($ART > 2 \text{ g L}^{-1}$) debido a su mayor dificultad de fermentar la fructosa respecto de la glucosa (Tabla 1). El cultivo iniciador autóctono y *Sc* F15 presentaron buena capacidad para fermentar ambos monosacáridos y menores concentraciones de ácido málico y mayores de ácido láctico en sus vinos en relación a las observadas en el elaborado con *Sc* BA indicando una mayor permisividad de estos cultivos para el desarrollo de la maloláctica que la *Sc* BA. La FML, descarboxilación enzimática del ácido L(-) málico en ácido L(-) láctico realizada por las bacterias del ácido láctico

es una fermentación secundaria opcional deseable en la elaboración de los vinos tintos porque incrementa su estabilidad microbiológica y su complejidad aromática [15].

Finalmente, el análisis sensorial realizado por los consumidores mediante pruebas de preferencia (Tabla 2) indican que el vino elaborado con el cultivo autóctono *Sc F8* obtuvo el mejor promedio, pero, por el tamaño muestral analizado, la diferencia no fue significativa respecto de la preferencia por el elaborado con el *Sc F15*, pudiendo concluirse que los consumidores mostraron una mayor preferencia por los vinos elaborados con los cultivos iniciadores *Sc F8* y *Sc F15* que por el elaborado con *BA*.

Tabla 1: Calidad fisicoquímica de vinos Malbec obtenidos en la Vendimia 2019 mediante fermentaciones alcohólicas conducidas por cultivos iniciadores autóctono puro (*Sc F8*) comerciales (*Sc BA* y *Sc F15*)

Parámetro	VINOS		
	<i>Sc F8</i>	<i>Sc BA</i>	<i>Sc</i>
Etanol % v/v	13,74	13,90	13,67
ART (g L ⁻¹)	1,90	2,86	2,21
pH	3,81	3,80	3,82
Acidez Titulable (g L ⁻¹)*	5,09	5,77	5,06
Acidez Volátil (g L ⁻¹) □	0,40	0,30	0,29
Fructosa (g L ⁻¹)	0,74	2,03	0,91
Glucosa (g L ⁻¹)	0,27	0,73	0,55
Ácido Málico (g L ⁻¹)	0,41	1,44	0,81
Ácido Láctico (g L ⁻¹)	0,98	0,50	0,92
Glicerol (g L ⁻¹)	7,74	7,42	6,95

ART: azúcares reductores totales. *Expresado como g L⁻¹ de Ácido Tartárico. □ Expresado como g L⁻¹ de Ácido Acético.

Tabla 2: Prueba de preferencia de los consumidores por los vinos elaborados mediante fermentaciones alcohólicas conducidas por cultivos iniciadores autóctonos (*Sc F8*) y comerciales (*Sc F15* y *Sc BA*)

VINO	PREFERENCIA			
	Promedio	1	2	3
<i>Sc F8</i>	1,65±0,17 ^a	8	5	4
<i>Sc F15</i>	1,94±0,19 ^a	7	8	2
<i>Sc BA</i>	2,41±0,21 ^b	2	4	1

Medias con superíndices diferentes, son significativamente diferentes, modelo lineal generalizado y prueba de DGC con $p < 0,05$ y $n = 17$. [16]

3. Conclusión

La capacidad demostrada por la biomasa de la levadura *Sc F8* propagada en medio EBM de iniciar rápidamente la fermentación, implantándose satisfactoriamente, conduciendo el proceso hasta el completo secado del mosto y rindiendo vinos con características sensoriales diferenciadas y de preferencia por los consumidores permite concluir que el proceso de propagación propuesto conserva en la cepa las propiedades tecnológicas por las que fuera seleccionada reafirmando a escala industrial la aptitud de esta levadura para uso enológico como cultivo iniciador autóctono de la Patagónica.

4. Bibliografía

1. INV. (2019). Informe Anual de Cosecha y Elaboración 2019 (base de datos congelada al 1/9/19) Subgerencia de Estadísticas y Asuntos Técnicos Internacionales. Mendoza, Argentina. Noviembre 2019.
2. Llorente A y Casazza M (2005). Región Vitivinícola Sur *El vino y su industria* 40:7-13
3. Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., and Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* 181,75–83, doi: 10.1016/j.micres.2015.10.005.
4. Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., and Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Sci. Rep.* 5:14233. doi: 10.1038/srep14233.
5. Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allene, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., LMills, D.A. (2016) Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio* 7: e00631-16. doi:10.1128/mBio.00631-16.
6. Belda, I., Zorraoindia, I., Perisin, M., Palacios, A., and Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Front Microbiol* 8:821. doi: 10.3389/fmicb.2017.00821.
7. Petruzzi, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Spano G., and Sinigaglia, M. (2017). Microbial Resources and Enological Significance: Opportunities and Benefits. *Front Microbiol* 8, 995. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2017.00995
8. Pretorius, I.S. (2020). Tasting the *terroir* of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Res.* 20(1): foz084 <https://orcid.org/0000-0001-9127-3175>.
9. del Mónaco S.M., Curilén Y.L., Bravo S.M.E., Simes A.B, Carreño V.A, Maturano R del C., Caballero A.C. (2016). Wild yeasts selection for high-quality Patagonian wines. In: *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*. Olivera N., Libkind D. and Donatti E. (Eds). Ed Springer. Chapter 16, 30pp. ISBN: Print book: 978-3-319-42799-7.
10. del Mónaco, S.M., Bravo, S.M.E., Curilén, Y.L., Carreño, V.A. and Caballero, A.C. (2014). A regional starter for high quality wines: an Argentinean Patagonia experience. *Bulletin de l'OIV* 87 (998-999-1000): 217–224.
11. Bravo S.M.E., Morales M.A., Caballero A.C., del Mónaco S.M. (2019) Apple bagasse as a substrate for the propagation of Patagonian wine yeast biomass *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), pp. 1414- 1425.
12. Bravo, S.M.E. (2020) Producción de Biomasa de Levaduras Patagónicas Seleccionadas para su Uso en Enología. Tesis Doctoral Universidad Nacional del Sur.
13. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Quero, A. (1999). Identification of

yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Int.J. Sys. Bacteriol.* 49:329-337.

14. Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M., Querol, A. and Caballero, A.C. (2007). Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 34(8):539- 546.
15. Bartowsky, E.J., Costello, P.J. and Chambers, P.J. (2015). Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Aust J Grape Wine Res* 21(S1), 663-669.
16. Di Rienzo, J.A., Guzmán, A.W. and Casanoves, F. (2002). A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *journal of Agricultural Biological Environmental Statistics.* 7(2): 129-142.