

# LEVADURAS INMOVILIZADAS: EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ENOLÓGICO

Anna Puig <sup>1</sup>, Eva Bertran <sup>1</sup>, Margarita Vilavella <sup>1</sup>, Teresa García-Martínez <sup>2</sup>,  
Juan Carlos Mauricio <sup>2</sup>, Santiago Minguez <sup>1</sup>

<sup>1</sup>**INCAVI-IRTA (Institut Català de la Vinya i el Vi). Estació de Viticultura i Enologia. Plaça Àgora, 2. 08720 Vilafranca del Penedès (Barcelona). Spain, Telf: 0034938900211, [apuigpujol@gencat.cat](mailto:apuigpujol@gencat.cat)**

<sup>2</sup>**Departamento de Microbiología. Edificio Severo Ochoa. Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales. 14014 Córdoba. Spain. Telf: 0034957218640, [mi1gamaj@uco.es](mailto:mi1gamaj@uco.es)**

## RESUMEN

Mostos procedentes de dos variedades de uva blanca: Xarel·lo y Moscatel de Alejandría, realizaron la fermentación alcohólica con las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* QA23 en el primer caso y G1 en el segundo, para la obtención de vinos tranquilos de graduación alta y muy alta respectivamente. Los mostos se dividieron en tres lotes, por triplicado en cada caso; el primer lote fermentó con células libres inoculadas en forma de levaduras secas activas (LSA); el segundo con las mismas cepas inmovilizadas en esferas de alginato cálcico; el último lote fermentó con las cepas de levadura bioinmovilizadas con el hongo *Penicillium chrysogenum* cepa H3 (biocápsulas). Las levaduras inmovilizadas en biocápsulas tuvieron un inicio de fermentación más rápido en ambos casos. Los vinos de Xarel·lo elaborados con la cepa QA23 inmovilizada en esferas de alginato presentaron una menor acidez volátil y un mayor contenido en calcio; los elaborados con biocápsulas tuvieron un menor contenido de alcoholes superiores. No hubo diferencias remarcables en los vinos de Moscatel. En el análisis sensorial, no se detectaron diferencias entre los formatos de inoculación en la cata triangular, pero sí en algunos parámetros de la cata descriptiva, donde fueron mejor valorados los vinos elaborados con LSA y biocápsulas.

## PALABRAS CLAVE

Levaduras; inmovilización; vino. Yeast; immobilization; wine. Levures; immobilisation; vin.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han propuesto varios sistemas de inmovilización celular para su utilización en bioconversiones como la fermentación alcohólica. Las levaduras inmovilizadas se pueden definir como biocatalizadores localizados físicamente en un espacio definido, de tal manera que se pueden emplear de forma repetitiva y continua, conservándose su capacidad metabólica (Suárez-Lepe e Iñigo-Leal, 2004). Así pues, el uso de levaduras inmovilizadas para vinificación está recibiendo una gran atención por sus ventajas técnicas y económicas. Los sistemas de inmovilización aumentan la productividad, reducen los costes de

proceso y también influyen en el metabolismo de las levaduras y, en consecuencia, en las características organolépticas del producto final.

Diferentes tipos de materiales de origen diverso: sintéticos, naturales, orgánicos e inorgánicos, se han probado como soportes de inmovilización (Peinado et al, 2006; Kandyliis et al, 2008). En la mayoría de sistemas de esta naturaleza, las células son inmovilizadas de una manera artificial. Aunque se han propuesto varios soportes de inmovilización para la fermentación alcohólica, sólo unos pocos pueden aplicarse adecuadamente a escala industrial. En el sector vínico, el sistema de inmovilización más utilizado ha sido la encapsulación de levaduras en alginato cálcico, compuesto orgánico que se obtiene de algas marinas y que se usa tanto en el sector alimentario como en el farmacéutico. La utilización de levaduras encapsuladas en esferas de alginato se ha aplicado sobretodo en el proceso de elaboración de vino espumoso ya que presenta grandes ventajas en la etapa de clarificación y degüelle de las botellas, por la rapidez con que sedimentan las levaduras en el cuello de éstas (Fumi et al., 1988). En estos casos, las levaduras no se encuentran en su estado natural y, dependiendo del daño causado por el procedimiento de inmovilización, su viabilidad puede verse alterada y su metabolismo puede sufrir desviaciones que repercuten en las características organolépticas del producto fermentado. No obstante, existen microorganismos que, espontáneamente, en determinadas condiciones, producen inmovilizaciones naturales. Tal es el caso de las levaduras de flor y bacterias acéticas que forman biofilms, compuestos por polímeros extracelulares que secretan las mismas células.

Recientemente se ha puesto a punto un nuevo procedimiento de inmovilización natural (Peinado et al, 2005; Peinado et al, 2006; García-Martínez et al., 2008) que favorece la co-inmovilización espontánea entre un hongo filamentoso de la especie *Penicillium chrysogenum* (cepa H3) y cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en ausencia de soportes inertes externos. Mediante este procedimiento se obtienen esferas huecas de los dos microorganismos denominadas biocápsulas de levaduras. En estas condiciones, las levaduras no necesitan ningún tratamiento para su inmovilización y se supone que puede ofrecer mejores aplicaciones potenciales al realizarse ésta de manera natural. El hongo filamentoso muere a los pocos días de iniciarse la fermentación alcohólica, quedando éste como mero soporte inerte.

El comportamiento de levaduras inmovilizadas en biocápsulas sólo se ha realizado en primera fermentación alcohólica, hasta el momento, en fermentaciones llevadas a cabo a escala experimental, a nivel de laboratorio, con poco volumen de mosto. El objetivo del trabajo que se presenta ha sido valorar el comportamiento fermentativo a escala industrial de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentadas en tres formatos de uso para vinificación: células libres (LSA) y dos tipos de inmovilización: encapsuladas en esferas de alginato cálcico e inmovilizadas en forma de biocápsulas, en dos lotes de mosto de distintas características. Se ha estudiado su cinética fermentativa y se han analizado distintos parámetros enológicos para identificar posibles diferencias de producción de metabolitos. Se han realizados dos tipos de análisis sensorial de los vinos resultantes: cata triangular y cata descriptiva, con el fin de determinar diferencias a nivel organoléptico.

## 2. METODOLOGÍA

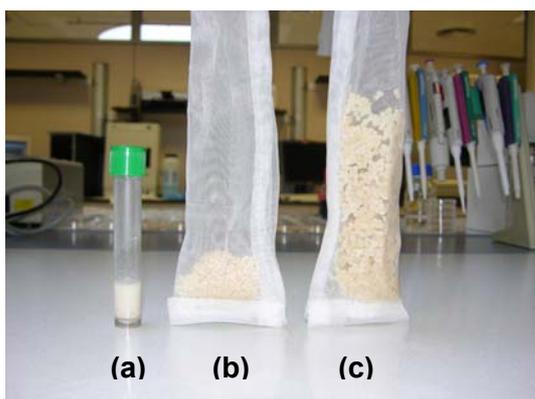
### 2.1. Cepas de levaduras y formatos

Se utilizaron dos cepas de *S. cerevisiae*: la cepa G1 (ATCC: MYA-2451) aislada de un velo perteneciente a un vino con crianza biológica en la D.O. Montilla-Moriles y la cepa QA23, comercializada por Lallemand Bio y seleccionada en la región de los vinos verdes por la C.V.R.V.V. y por la U.T.A.D. en Portugal.

La inmovilización de estas cepas en esferas de alginato cálcico fue realizada por la empresa Proenol, Industria Biotecnológica, Lda. (Portugal) según los protocolos de la misma. La deshidratación de la cepa G1 en forma de levadura seca activa fue llevada a cabo por la empresa Lallemand Bio (Toulouse).

La inmovilización de G1 y QA23 en forma de biocápsulas se efectuó en el laboratorio de INCAVI siguiendo el protocolo establecido por el grupo del Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba (Peinado et al., 2005; Peinado et al., 2006; García-Martínez et al., 2008).

Las células inmovilizadas en alginato y las biocápsulas se inocularon en el recipiente de fermentación mediante una malla porosa (figura 1) que permitía el intercambio de nutrientes entre el medio y las levaduras incluidas en las esferas.



**Figura 1.** Formatos de levadura utilizados en el estudio: (a) células libres (LSA hidratadas); (b) levaduras inmovilizadas en esferas de alginato cálcico; (c) levaduras inmovilizadas en forma de biocápsulas. En el caso de los dos tipos de levadura inmovilizada, el inóculo en el recipiente de fermentación se realizó mediante una bolsa formada por una malla porosa.

### 2.2. Mostos y condiciones de fermentación

Las fermentaciones alcohólicas para la obtención de vinos tranquilos se realizaron en volúmenes de 20 L por triplicado para cada tipo de formato de levadura inoculado. Para la cepa QA23 se utilizó un mosto de la variedad Xarel·lo con un grado alcohólico probable inicial alto. Para la cepa G1, dado el ámbito de aislamiento de la cepa (Aguilera et al., 2006), se utilizó un mosto de la variedad Moscatel de Alejandría de grado alcohólico probable muy alto. Las características enológicas de los mostos de partida se describen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Análisis enológicos de los mostos de partida.

	XAREL·LO	MOSCATEL DE ALEJANDRÍA
Grado Brix	21,4	24,6
Grado alcohólico probable (GAP) (%vol)	12,35	14,56
Acidez total (en ác. tartárico) (g/l)	4,9	5,2
pH	3,39	3,38
Ácido málico (g/l)	1,3	1,5
Glicerol (g/l)	0,2	0,47
Ácido glucónico (mg/l)	28	163
Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) (mg/l)	186	127
Potasio (mg/l)	1485	1197
Calcio (mg/l)	86	98

El proceso fermentativo tuvo lugar a una temperatura de  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ . La dinámica de las fermentaciones se controló mediante la medida periódica de la densidad y la temperatura.

Previamente a la inoculación en los depósitos hubo una aclimatación de los dos formatos de levadura inmovilizados: esferas de alginato cálcico (según indicaciones del fabricante) y biocápsulas, durante 24 h en un mosto pasteurizado de la variedad Parellada con un nivel de azúcar reductor inicial de 180 g/l, pH 3.25 y acidez total 7.3 g/l para que ambos formatos partieran de las mismas condiciones iniciales. La hidratación de las LSA se realizó según protocolo del fabricante. El inóculo en mosto para cada tipo de formato se calculó entre 2 y  $3 \times 10^5$  células/ml.

### 2.3. Controles microbiológicos y análisis de parámetros enológicos

El funcionamiento de las dos cepas y los tres sistemas de presentación de las levaduras se controlaron mediante el estudio de la imposición de las levaduras a mitad y final de la fermentación alcohólica por análisis del perfil de su ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP) (Querol et al., 1992; Puig et al., 2002). La viabilidad se determinó a través del recuento de la población total mediante cámara de recuento y observación al microscopio óptico de las levaduras totales y viables y también mediante el análisis de población viable a mitad del proceso fermentativo sobre agar YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa y 1,5% de agar-agar) e incubación a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 48 h.

Los parámetros químicos generales de mostos y vinos: °Brix, grado alcohólico probable (GAP), grado alcohólico volumétrico (GAV), acidez total, acidez acética, pH, ácido málico, ácido láctico, ácido glucónico, azúcares totales (glucosa + fructosa), glicerol, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre libre y total se determinaron de acuerdo con métodos oficiales de la U.E. y la O.I.V. (E.E.C. 1990; O.I.V., 2005). Las absorbancias  $A_{420}$ ,  $A_{520}$ ,  $A_{620}$  y  $A_{280}$  se realizaron en un espectrofotómetro Lambda 25 UV/Vis de Perkin-Elmer. Los cationes Ca y K se determinaron mediante espectrometría de adsorción atómica por llama en un equipo Perkin-Elmer 280. Los alcoholes superiores y el acetaldehído se cuantificaron mediante cromatografía de gases (GC-FID) en un equipo Hewlett Packard 5890 series II, utilizando una columna Suprawax 280 de 30 m y diámetro interno de  $0,53 \mu\text{m}$ . La  $T^{\text{a}}$  inicial fue de  $45^{\circ}\text{C}$  y la  $T^{\text{a}}$  final de  $120^{\circ}\text{C}$  durante 10 min

con un rampa de 4,5°C/min. La T<sup>a</sup> del inyector fue de 220°C y la del detector FID 260°C.

## **2.4. Análisis sensorial**

Se realizó un análisis sensorial de los vinos obtenidos del Xarel·lo y Moscatel mediante dos tipos de pruebas: una prueba triangular y una cata descriptiva. En la prueba triangular (Norma ISO 4120-1983 / UNE 87-006-92) se presentó, para cada variedad de vino, a los 11 analistas o catadores participantes, tres series con tres juegos de copas por serie. En cada serie, dos copas eran idénticas (correspondientes a la misma vinificación). Las muestras se presentaron totalmente aleatorizadas según las distintas combinaciones posibles, teniendo en cuenta también los triplicados de cada tipo de vinificación. Se pedía al catador que identificara la muestra diferente de cada serie. Con esta prueba se pretendía detectar si el cambio realizado durante el proceso de elaboración (en el estudio que nos ocupa, el tipo de inóculo de levadura realizado), ocasionaba diferencias en el vino.

En la cata descriptiva se pidió a 10 expertos catadores que evaluaran, en una escala del 0 al 9 los siguientes descriptores: intensidad de color y tonalidad (referente al color); intensidad de aroma, calidad de aroma, aroma a fruta fresca, aroma floral, aroma a fruta cocida, aroma herbáceo o vegetal, aroma a especias, aroma a reducción (referente a las características olfativas); intensidad de gusto, calidad de gusto, sensación alcohólica, sensación acidez, sensación de amargor, astringencia, cuerpo o volumen y persistencia (referente a las calidades gustativas) y, finalmente, valoración final del vino.

## **2.5. Análisis estadístico**

Los valores de los parámetros enológicos obtenidos al final de la fermentación con células libres (LSA), inmovilizadas en alginato y en biocápsulas, por triplicado en cada caso, por cada variedad de vino se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y una separación de medias por el método Tukey para determinar si existían diferencias significativas en la concentración de dichos compuestos. Para ello se utilizó el paquete estadístico SYSTAT 10.

Los resultados de la cata triangular se procesaron según la normativa ISO 4120-1983 / UNE 87-006-92, evaluando el número mínimo de respuestas correctas para establecer una diferencia a diferentes niveles de significación.

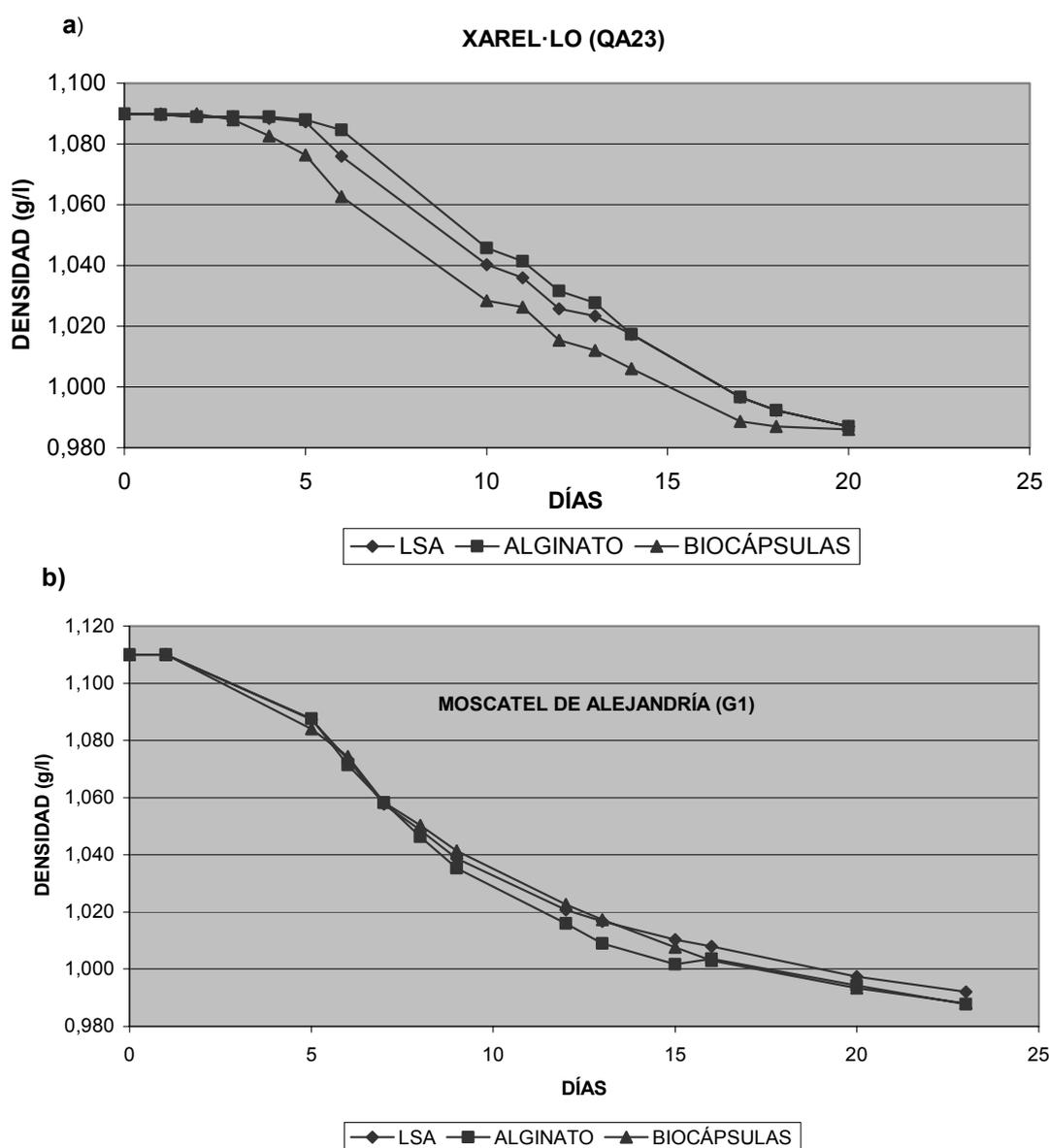
Para el análisis sensorial descriptivo, se representaron gráficamente las medias aritméticas. Las puntuaciones de los 10 catadores para cada descriptor se incluyeron en un análisis de la varianza para determinar la existencia de diferencias significativas entre las vinificaciones realizadas con células de levadura inmovilizadas en biocápsulas o esferas de alginato y con LSA para cada cepa.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Evolución de la fermentación alcohólica

La figura 2 (a y b) muestra las cinéticas fermentativas de ambas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* inoculadas en los tres formatos. En cada caso, se representa la media aritmética de las densidades de los triplicados. Para la cepa QA23 (figura 2a), las fermentaciones realizadas con células inmovilizadas en biocápsulas tuvieron una fase de latencia dos días más corta que los otros dos formatos: mientras que en el primer caso la fermentación empezó a los 3 días de la siembra de la levadura, en el caso de LSA y las levaduras inmovilizadas en alginato cálcico, el inicio de la fermentación se produjo a los 5 días. En general, la transformación de azúcar en etanol de estos dos formatos evolucionó de forma similar, considerándose acabado el proceso a los 20 días de haberse iniciado. Sin embargo, el inóculo con biocápsulas presentó una cinética más rápida, terminando la fermentación alcohólica a los 18 días. Similares resultados obtuvieron Peinado et al, (2005) y García-Martínez et al., (2008) comparando fermentaciones con células libres y bioencapsuladas. El recuento de levaduras a densidad 1,030 g/l fue de  $3-4 \times 10^7$  ufc/ml en las 9 vinificaciones de este lote de mosto. Por lo tanto, la velocidad de fermentación más rápida encontrada en las biocápsulas podría atribuirse a una mejor adaptación al medio de este tipo de inmovilizados en un mosto de estas características.

Para la cepa G1 y el mosto procedente de la variedad Moscatel de Alejandría, cabe señalar que, aunque la figura 2b muestra una evolución de la densidad de fermentación muy similar en los tres casos, el alto grado alcohólico alcanzado en los vinos: 15 %vol para el inóculo con LSA, 15,38 %vol para los inmovilizados en alginato y 15,5 %vol para las biocápsulas (ver tabla 2) provocó que las fermentaciones no acabaran completamente y que quedaran con una concentración variable de azúcar residual: 11,23 g/l para las LSA, 4,77 g/l para las inmovilizadas en alginato y 5,33 g/l para las células de G1 bioinmovilizadas. El balance entre el grado alcohólico volumétrico y el azúcar residual de los vinos indicó que el inóculo con levaduras inmovilizadas tanto en alginato cálcico como en forma de biocápsulas habían conseguido un mejor rendimiento fermentativo. Estos resultados reafirman el hecho descrito en otros trabajos en que la inmovilización celular permite el metabolismo de las levaduras en condiciones extremas de baja temperatura (Kourkoutas et al., 2002; Kandyliis et al., 2008) o alto contenido de alcohol (Margaritis y Merchant, 1984; Baptista et al., 2007). El recuento de las levaduras viables a densidad 1,050 g/l fue en las 9 vinificaciones de este lote de 5 a  $6 \times 10^7$  ufc/ml. El análisis del ADN mitocondrial indicó la pureza de la cepa QA23 y G1 en todos los puntos de muestreo analizados.



**Figura 2.** Cinética de fermentación (pérdida de densidad por consumo de azúcar a lo largo del tiempo) del mosto Xarel-lo inoculado con la cepa QA23 y Moscatel de Alejandría inoculado con la cepa G1, en forma de células libres (LSA), inmovilizadas en esferas de alginato cálcico e inmovilizadas en biocápsulas.

### 3.2. Caracterización enológica de los vinos elaborados

Los vinos, una vez finalizada la fermentación alcohólica, se sometieron a un análisis de parámetros enológicos que pudieran indicar diferente comportamiento de la levadura durante el proceso de elaboración. En la tabla 2 se detallan las variables determinadas, expresadas como la media aritmética de las tres vinificaciones realizadas en cada caso y su desviación estándar. Los vinos resultantes de las fermentaciones con la cepa QA23 alcanzaron un grado alcohólico de 13,3 % vol y apenas quedaron azúcares residuales por metabolizar.

Los inóculos con LSA y biocápsulas produjeron vinos de características muy similares, hecho que también se demuestra en el análisis sensorial (ver apartado 3.3). Sólo se encontraron diferencias significativas en el caso de los vinos producidos con levaduras inmovilizadas en esferas de alginato en los niveles de acidez volátil, NFA y calcio. Respecto a este catión, anteriores estudios (Fumi et al., 1988) ya habían descrito que el hecho de utilizar un soporte de inmovilización como el alginato cálcico presentaba algunos inconvenientes como un incremento de calcio en el vino y la consiguiente precipitación de tartrato de calcio. Respecto a los vinos de Moscatel de Alejandría producidos con la cepa G1, como se comentó en el apartado anterior, todos los lotes alcanzaron un grado alcohólico superior a 15 % vol. Los vinos producidos con LSA presentaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) respecto a este parámetro (valores más bajos) y al de azúcares residuales (concentraciones más altas). La concentración de calcio también fue en este formato significativamente más baja ( $P = 0,003$ ) que los formatos de levaduras inmovilizadas.

**Tabla 2.** Valores de parámetros enológicos en los vinos de Xarel-lo y Moscatel de Alejandría fermentados con las cepas QA23 y G1 mediante los tres formatos del estudio. Los valores representan la media aritmética de tres fermentaciones efectuadas en cada caso  $\pm$  DE (desviación estándar).

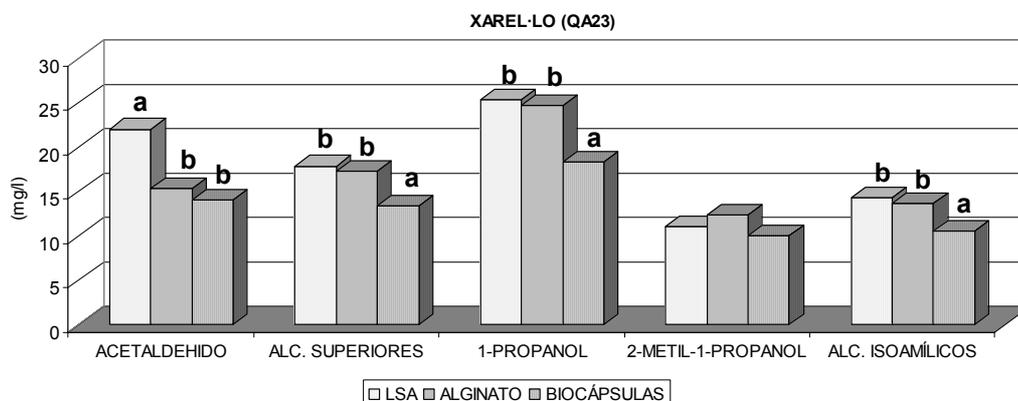
	XAREL-LO (cepa QA23)			MOSCATEL DE ALEJANDRÍA (cepa G1)		
	LSA	ALGINATO	BIOCÁPSULA	LSA	ALGINATO	BIOCÁPSULA
GAV (%vol)	13,32 $\pm$ 0,03	13,32 $\pm$ 0,10	13,33 $\pm$ 0,03	15,00 $\pm$ 0,05 (*)	15,38 $\pm$ 0,14	15,50 $\pm$ 0,15
Azúcares totales (G+F) (g/l)	1,07 $\pm$ 0,49	0,50 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,00	11,23 $\pm$ 2,36 (**)	4,77 $\pm$ 2,95	5,33 $\pm$ 2,15
pH	3,19 $\pm$ 0,01	3,13 $\pm$ 0,01	3,18 $\pm$ 0,01	3,21 $\pm$ 0,01	3,21 $\pm$ 0,01	3,21 $\pm$ 0,01
Ac. total (g/l ác. tartárico)	4,73 $\pm$ 0,06	4,83 $\pm$ 0,06	4,80 $\pm$ 0,10	5,03 $\pm$ 0,06	4,97 $\pm$ 0,06	5,03 $\pm$ 0,06
Ac. volátil (g/l ác. acético)	0,44 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01 (*)	0,44 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,03
Ác. málico (g/l)	0,97 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	1,20 $\pm$ 0,00	1,20 $\pm$ 0,00	1,13 $\pm$ 0,06
Ac. láctico (g/l)	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00
Glicerol (g/l)	6,23 $\pm$ 0,23	5,93 $\pm$ 0,21	6,27 $\pm$ 0,15	7,10 $\pm$ 0,10	7,03 $\pm$ 0,15	6,87 $\pm$ 0,21
NFA (mg/l)	81,00 $\pm$ 1,00	50,33 $\pm$ 4,93 (*)	79,33 $\pm$ 1,53	68,33 $\pm$ 3,06	62,00 $\pm$ 3,46	61,33 $\pm$ 4,04
Calcio (mg/l)	46,67 $\pm$ 1,53	55,67 $\pm$ 1,53 (*)	50,00 $\pm$ 1,73	57,00 $\pm$ 0,00 (*)	62,67 $\pm$ 1,53	61,00 $\pm$ 0,00
Potasio (mg/l)	400,67 $\pm$ 6,81	400,67 $\pm$ 6,43	402,67 $\pm$ 16,07	545,67 $\pm$ 11,55	531,67 $\pm$ 5,86	531,67 $\pm$ 9,87

(\*) Valores donde se detectaron diferencias significativas:  $p < 0,01$  y (\*\*)  $p < 0,05$ .

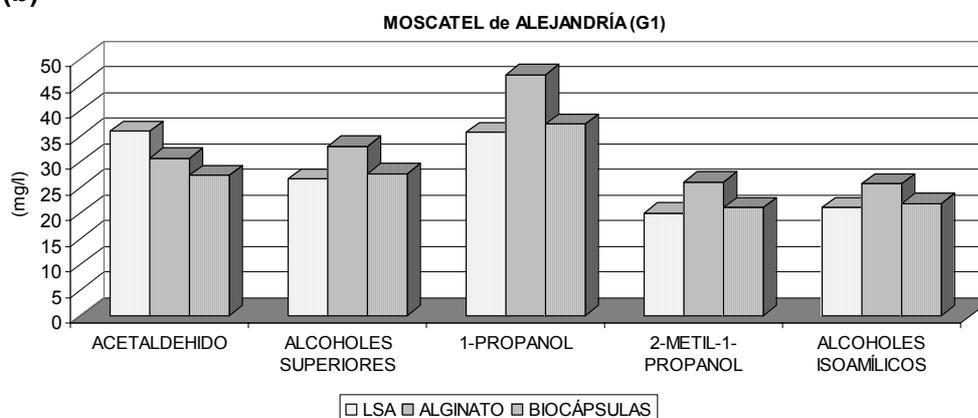
En el caso de los parámetros cromáticos analizados en ambos vinos:  $A_{420}$ ,  $A_{520}$ ,  $A_{620}$ ,  $A_{280}$  e intensidad colorante (IC) (datos no mostrados), no existieron diferencias significativas entre los vinos.

También se determinó la fracción de compuestos volátiles de los vinos acabados (figura 3, a y b).

(a)



(b)



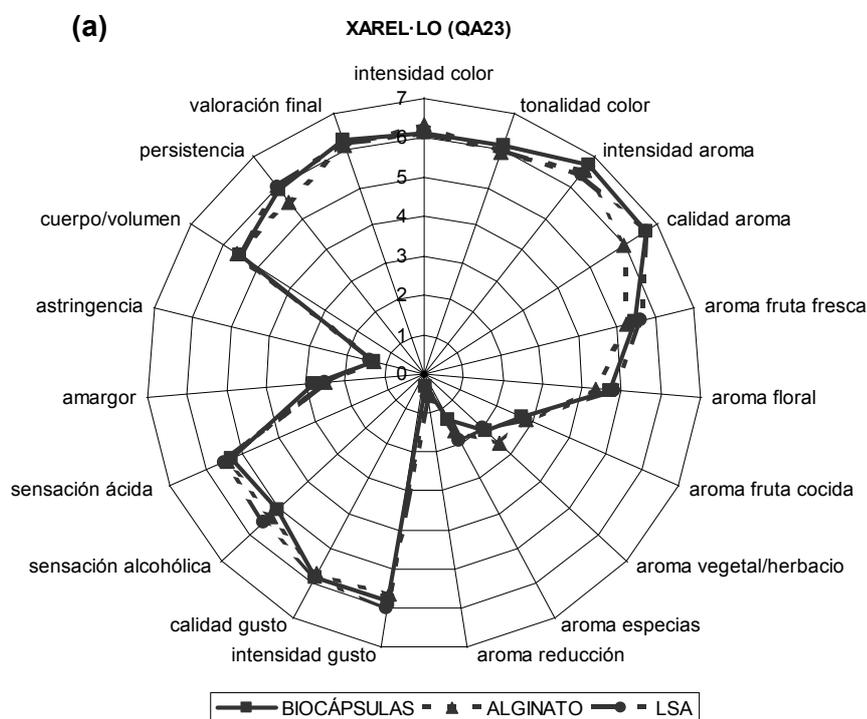
**Figura 3.** Contenido en acetaldehído y alcoholes superiores (1-propanol, 2-metil-1-propanol, alcoholes isoamílicos y suma de los anteriores: alcoholes superiores) en los vinos de Xarel-lo fermentados con *S. cerevisiae* QA23 (a) y los de Moscatel de Alejandría con la cepa G1 (b). El valor de alcoholes superiores y alcoholes isoamílicos representado en la gráfica corresponde al valor real dividido por 10. Las letras en la parte superior de las columnas indican diferencias significativas en los valores de los tres formatos.

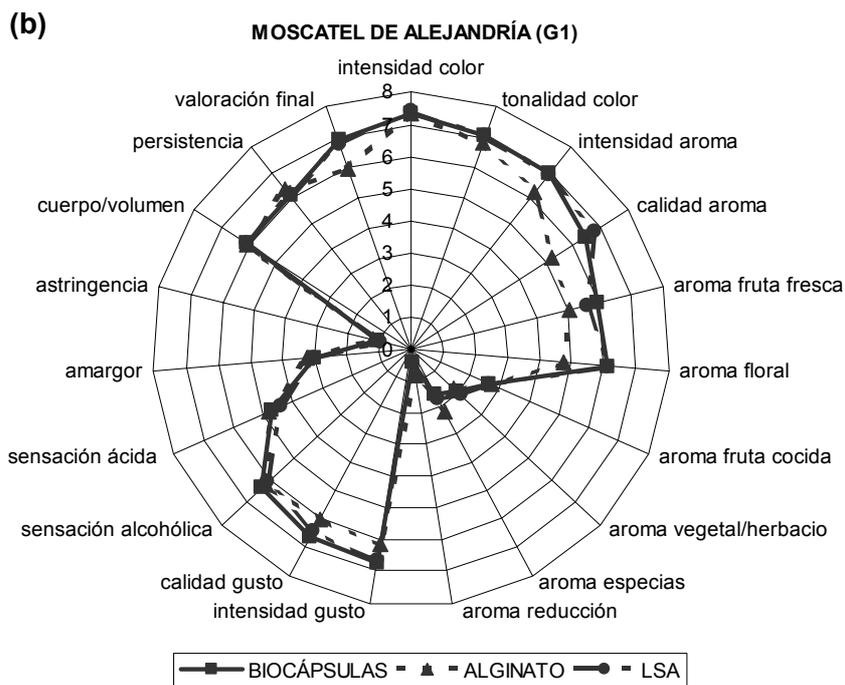
No se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de estos metabolitos en los vinos de Moscatel entre formatos de inoculación de levaduras. Sin embargo, sí aparecieron diferencias en los vinos procedentes de la variedad Xarel-lo. El formato de LSA presentó una mayor concentración de acetaldehído ( $P=0.013$ ) que los dos formatos de levaduras inmovilizadas. Este factor podría indicar una mayor tendencia a la oxidación de estos vinos. Otro hecho remarcable es el menor contenido en alcoholes superiores en las muestras de vinos elaborados con biocápsulas ( $p<0,01$ ). Aunque los alcoholes superiores contribuyen de manera favorable no sobrepasando los 350-400 mg/l (Rapp y Mandery, 1986), poder mantener las concentraciones de estos compuestos a niveles bajos favorece organolépticamente al vino producido. Esta tendencia de una menor producción de algunos alcoholes superiores en levaduras inmovilizadas y bioinmovilizadas ya había sido descrita por otros autores (Kandyliis et al., 2008; García Martínez et al., 2008; Puig et al., 2009). No se detectó ni 1-butanol, ni 2-butanol en ninguno de los 18 vinos analizados.

### 3.3. Análisis organoléptico

Los resultados derivados de la cata triangular demostraron que los 11 jueces que participaron en la prueba no fueron capaces de encontrar diferencias entre los vinos elaborados con células libres (LSA), o inmobilizadas en los dos tipos de soporte, ni en el caso del Xarel·lo ni en el caso de los vinos de Moscatel. Al aplicar las tablas de interpretación de datos descritas en la norma ISO 4120-1983, no existieron diferencias significativas entre vinos ni al 5 %, ni al 1% ni al 0,1 % de significación.

Sin embargo, cuando se realizó la cata descriptiva sobre los mismos vinos (figura 4, a y b), se observaron diferencias significativas en algunos de los descriptores evaluados. En la variedad Xarel·lo fermentada con *S. cerevisiae* QA23 (figura 4a), se pudo observar una tendencia en una mejor puntuación en la calidad de aroma, aroma a fruta fresca y aroma floral en las vinificaciones inoculadas con LSA y biocápsulas. Al aplicar el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) sobre todos los descriptores, sólo existieron diferencias significativas ( $P=0,038$ ) en la calidad del aroma. Cuando el análisis se realizó por parejas de tratamiento, las diferencias se detectaron entre los vinos elaborados con alginato y biocápsulas ( $P=0,037$ ) y alginato y LSA ( $P=0,014$ ). Respecto a los vinos de Moscatel elaborados con la cepa G1 (figura 4b), la tendencia de opinión fue muy parecida a los vinos de Xarel·lo: en general fueron mejor puntuados los vinos fermentados con biocápsulas y LSA. En este caso, existieron diferencias significativas en tres de los descriptores: en la calidad del aroma ( $P=0,026$ ), en el aroma floral ( $P=0,0027$ ) y en la valoración final ( $P=0,023$ ).





**Figura 4.** Análisis descriptivo de los vinos de Xarel-lo (a) y los vinos de Moscatel de Alejandría (b) fermentados con la cepa QA23 y G1, respectivamente, en formato de biocápsulas, inmovilizadas en esferas de alginato cálcico y en forma de células libres (LSA). Los datos para cada descriptor representan la media aritmética de las puntuaciones otorgadas por 10 catadores expertos.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un uso potencial en primera fermentación alcohólica de las levaduras inmovilizadas. La efectividad en la elaboración de vinos de alta y muy alta graduación queda reflejada en la aceptabilidad analítica y sensorial de los vinos producidos. Este trabajo demuestra también un buen comportamiento enológico del nuevo sistema de inmovilización en biocápsulas. Se ha comprobado que es posible la reutilización de un mismo inóculo de biocápsulas a escala de laboratorio hasta en 11 fermentaciones consecutivas sin perder actividad (datos no mostrados). Aunque son necesarios estudios adicionales con mostos de otras características, las propiedades organolépticas de los vinos elaborados utilizando este formato como inóculo inicial se evalúa positivamente.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera, F.; Peinado, R.; Millán, C.; Ortega, J.M.; Mauricio, J.C. (2006). "Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strain". *Int. J. Food Microbiol.*, 110: 34-42.

Baptista, C.M.S.G.; Cóias, J.M.A.; Oliveira, A.C.M. y Rocha, J.M.S. (2007). "Immobilisation of yeasts for continuous fermentation". *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Microbiology Series nº1 Vol 1. A. Méndez-Vilas (Ed.) (ISBN-13: 978-84-611-9422-3): 418-425.

E.E.C. (1990). *Official report of European Community* nº 2676/90, L-272. Madrid. Mundi-Prensa.

Fumi, M.D.; Trioli, G.; Colagrande, O. (1988). "Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle-fermented sparkling wine production". *Am.J. Enol. Vitic.*, 39: 267-272.

García-Martínez, T.; Peinado, R.A.; Maestre, O.; Moreno, J.; Mauricio, J.C. (2008). "Fermentación de mostos con elevado contenido en azúcares mediante bioinmovilización de levaduras". *Bulletin de l'OIV*, 932-934: 559-568.

International Organization of Vine and Wine (OIV), (2005). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, vols. 1 and 2, OIV, Paris.

Kandylis, P; Goula, A; Koutinas, A.A. (2008). "Corn Starch Gel for Yeast Cell Entrapment. A View for Catalysis of Wine Fermentation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 12037-12045.

Kourkoutas, Y.; Douma, M.; Komaitis, M.; Koutina, A.A.; Kanellaki, M.; Banat, I.M; Marchant, R. (2002). "Continuous winemaking fermentation using quince-immobilized yeast at room and low temperatures". *Process Biochemistry*, 39: 143-148.

Margaritis, A. y Merchant, F.J.A. (1984). "Advances in ethanol production using immobilized cell systems". *Crit. Rev. Biotechnol*, 1: 339-393.

Peinado, R.A.; Moreno, J.J.; Maestre, O; Mauricio, JC. (2005). "Use of a novel immobilization yeast system for winemaking". *Biotechnology Letters*, 27: 1421-1424.

Peinado, R.A.; Moreno, J.J.; Villalba, J.M.; González-Reyes, J.A.; Ortega, J.M.; Mauricio, J.C. (2006). "Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications". *Enz Microb Technol*, 40: 79-84.

Puig, A.; Vilavella, M.; Bartra, E.; Mínguez, S. (2002). "Suivi de la dynamique de la population de levures dans des fermentations viniques industrielles au travers de l'étude de l'ADN mitochondrial". *Revue des Oenologues*, 105: 33-36.

Puig, A., E. Bertran, M.C. Masqué, T. García-Martínez, R.A. Peinado, J. Moreno, J.C. Mauricio. (2009). "Comportamiento enológico de cepas de levadura en distintos formatos de inmovilización". *Nuevos Horizontes en la Viticultura y Enología*. Ed. Servizo de Publicacións. Universidade de Vigo. I.S.B.N. 978-84-8158-438-7. (pág.: 213-216).

Querol, A. Barrio, E. and Ramón, D. (1992). "A comparative study of different methods of yeast strain characterization". *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 439-446.

Rapp, A.; Mandery, H. (1986). "Wine aroma". *Experientia*, 42: 873.

Suárez-Lepe, J.A. y Iñigo-Leal, B. (2004). *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación*. (ISBN. 84-8476-184-3), Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. Pgs: 668-672.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen la financiación de este estudio al Proyecto RTA2008-00056-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA). Agradecemos a la empresa Proenol su colaboración en el proyecto mediante la encapsulación en alginato cálcico de las cepas del estudio y a la empresa Lallemand Bio la cesión de las levaduras en forma de LSA.