

# USO DE UN NUEVO SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN DE LEVADURAS EN VINIFICACIÓN. ESTUDIO DE SU REUTILIZACIÓN.

A. Puig<sup>1\*</sup>, E. Bertran<sup>1</sup>, M. C. Masqué<sup>1</sup>, M. Vilavella<sup>1</sup>, T. García-Martínez<sup>2</sup>, J. C. Mauricio<sup>2</sup>,  
S. Mínguez<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, [milgamaj@uco.es](mailto:milgamaj@uco.es)

## RESUMEN

Se ha determinado la capacidad y viabilidad fermentativa de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* encapsuladas en un nuevo sistema de bioinmovilización sin soportes físico-químicos externos. La bioinmovilización se ha conseguido mediante la co-inmovilización espontánea y natural de las levaduras y un hongo filamentoso (cepa H3 de *Penicillium chrysogenum*). Las levaduras inmovilizadas en biocápsulas se han reutilizado en 11 fermentaciones sucesivas, manteniendo su potencial fermentativo durante al menos 85 días. Se ha efectuado el seguimiento cinético de las fermentaciones y se han analizado distintos parámetros enológicos para identificar posibles diferencias de producción de metabolitos en cada una de las reutilizaciones que pudieran afectar a la calidad del vino producido. La utilización sucesiva del mismo inóculo de levaduras inmovilizadas no afectó de manera significativa la velocidad en las 11 fermentaciones. Tampoco existieron diferencias remarcables en la composición final de los vinos obtenidos.

## SUMMARY

The fermentative capacity and viability of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* encapsulated in a new bioimmobilization system without physic-chemical external supports has been determined. Bioimmobilization was achieved through the spontaneous and natural co-immobilization of the yeasts and a natural filamentous fungus (*Penicillium chrysogenum* strain H3). Yeasts immobilized in biocapsules were reused in 11 successive fermentations, maintaining their fermentation potential for at least 85 days. Fermentation kinetics was recorded in each case and different parameters to identify possible differences in oenological metabolites production that can affect sensory quality of produced wine were analyzed in each of the biocapsules reuses. The consecutive use of the same immobilized yeast inoculum did not significantly affect the speed of the 11 fermentations. Also there were not remarkable differences in the final composition of obtained wines.

## INTRODUCCIÓN

La inmovilización celular aplicada en diferentes aspectos de la vinificación está recibiendo un gran impulso en los últimos años por sus ventajas técnicas y económicas. Los sistemas de microorganismos inmovilizados protegen a las células contra el estrés ambiental y por ello

aumentan la productividad, permitiendo un mejor control de la cinética del proceso, reducen los costes debido a la posibilidad de recuperación y reutilización (Godia *et al.*, 1991) y también influyen en el metabolismo de las levaduras y, en consecuencia, en las características organolépticas del producto final.

La mayoría de sistemas de inmovilización celular conocidos y testados son artificiales. En la industria vínica el sistema de inmovilización más utilizado ha sido la encapsulación de levaduras en alginato cálcico, compuesto orgánico que se obtiene de algas marinas. 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.

Peinado, *et al.* (2005) describieron un nuevo procedimiento de inmovilización natural donde se 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 obtuvieron esferas huecas constituidas por los dos microorganismos denominadas biocápsulas de levaduras. Este formato, como otros sistemas de inmovilización celular, tienen la ventaja de que fácilmente introducen y retiran los microorganismos de los medios de cultivo después de la total o parcial biotransformación de los sustratos, reduciendo el riesgo de contaminación, acortando el tiempo del proceso y permitiendo desarrollar procesos continuos de fermentación (Groboillot *et al.*, 1994).

El objetivo del trabajo que se presenta ha sido estudiar el comportamiento fermentativo a escala de laboratorio de dos cepas de *S. cerevisiae* inoculadas en formato de biocápsulas y la caracterización enológica de los vinos obtenidos cuando el mismo lote o inóculo inicial de levaduras ha sido reutilizado a lo largo de once fermentaciones sucesivas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Microorganismos**

Se utilizaron dos cepas de *S. cerevisiae*: la cepa P29 (CECT 11770) aislada en la zona vitivinícola de la D.O. Penedés, perteneciente a la colección de levaduras de INCAVI 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 P29 y QA23 en forma de biocápsulas se efectuó en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba según lo establecido por Peinado *et al.*, 2005; Peinado *et al.*, 2006 y García-Martínez *et al.*, 2008.

### **Condiciones de fermentación**

Se realizaron once fermentaciones (FA1 a FA11) para cada cepa (P29 y QA23), cada una de ellas por triplicado. Para las fermentaciones se utilizaron matraces erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 400 ml de mosto pasteurizado de la variedad de uva blanca Parellada con un

nivel de azúcar reductor inicial de 180 g/l, pH 3.25 y acidez total 7.3 g/l (expresada en ácido tartárico). Las fermentaciones tuvieron lugar a una temperatura controlada de 28°C en una estufa con agitación a 120 rpm. El inóculo inicial en mosto en la FA1 se calculó entre 2 y 3 x10<sup>6</sup> células/ml. Cuando se alcanzaron 10,3%-10,4% (v/v) de etanol, las biocápsulas se retiraban del medio, se lavaban con agua destilada estéril en condiciones asépticas y se volvían a inocular en un nuevo recipiente con mosto.

### **Controles analíticos**

La cinética fermentativa en cada caso se monitorizó por la cantidad de CO<sub>2</sub> liberado como medida de la pérdida de peso (Sablayrolles *et al.*, 1987) y por el seguimiento del consumo de azúcar mediante la medida de la pérdida de grado Brix.

La pureza de la cepa implantada al final de cada fermentación alcohólica se determinó mediante el estudio del perfil de restricción de su ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP) (Querol *et al.*, 1992; Puig *et al.*, 2002) para comprobar que no había habido contaminación durante el proceso.

Los parámetros químicos generales: grado alcohólico (GAV), acidez total, acidez volátil, azúcares (glucosa+fructosa) y pH se determinaron de acuerdo con métodos oficiales de la U.E. y la O.I.V. (Organización Internacional de la Viña y el Vino) (E.E.C. 1990; O.I.V., 2005). El glicerol fue analizado mediante método enzimático (Bermeyer, 1974).

Los alcoholes superiores se cuantificaron mediante cromatografía de gases (GC-FID) utilizando una columna Suprawax 280 de 30 m y diámetro interno de 0,53 µm. La T<sup>a</sup> inicial fue de 45°C y la T<sup>a</sup> final de 120°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.

### **Análisis estadístico**

Los valores de los parámetros enológicos obtenidos de cada fermentación 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 las diferentes reutilizaciones. Para ello se utilizó el paquete estadístico SYSTAT 10.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Seguimiento de la cinética fermentativa**

La Fig. 1 muestra las cinéticas fermentativas para cada reutilización de las dos cepas de levadura según la pérdida de peso por desprendimiento de CO<sub>2</sub> de cada matraz. En cada caso se representa la media aritmética de los triplicados realizados. En ambas cepas existió un comportamiento similar: la primera fermentación alcohólica (FA1) se realizó más rápida (6 días) que las diez posteriores. En las siguientes, la cinética se ralentizó paulatinamente en la mayoría de los casos, observándose un retraso sucesivo a nivel de horas en su finalización. Este factor se justifica por la pérdida de viabilidad celular en el inóculo de células inmovilizadas a lo largo del tiempo. Todas las fermentaciones se consideraron acabadas a los 7 días de haberse inoculado las biocápsulas (ver concentración de azúcares en Tabla 1). Un retraso en un rango de horas en la finalización del proceso fermentativo en el transcurso de las distintas reutilizaciones puede considerarse insignificante a nivel industrial.

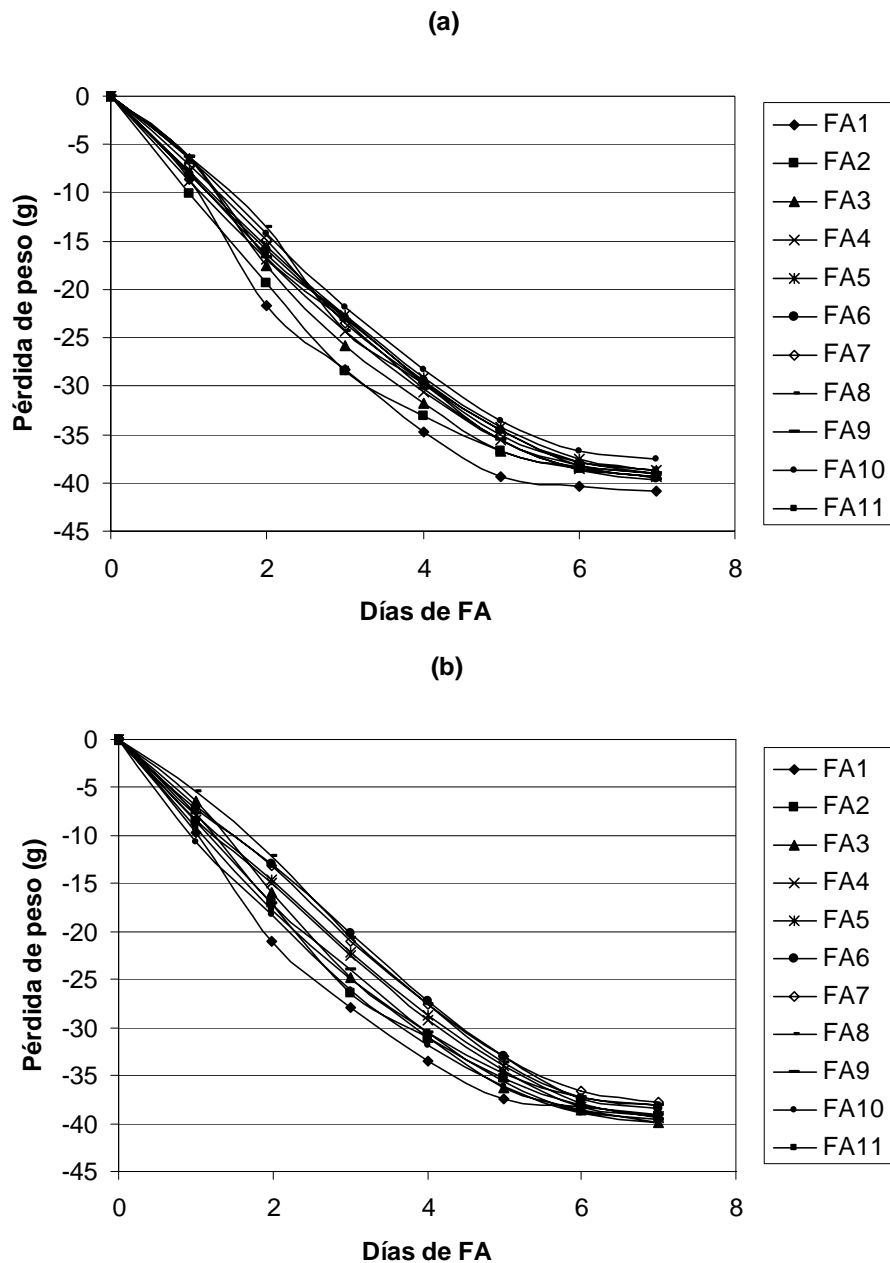


Fig. 1. Cinética de fermentación (medida de pérdida de peso por desprendimiento de  $\text{CO}_2$  a lo largo del tiempo) del mosto inoculado con la cepa P29 (a) y QA23 (b) en 11 reutilizaciones sucesivas.

Las biocápsulas se hincharon durante la fase tumultuosa de cada fermentación debido a la emisión de  $\text{CO}_2$  pero recuperaron su diámetro, forma y consistencia original pasada esta etapa. Esto demuestra las propiedades elásticas de esta forma de inmovilización. No se produjeron roturas ni por crecimiento de las levaduras ni por el desprendimiento de  $\text{CO}_2$ , como ocurre algunas veces cuando se utilizan otros soportes de inmovilización. El lavado con agua destilada estéril después de cada utilización no afectó el funcionamiento de las levaduras.

Aunque hubo liberación de levaduras al medio, como también ocurre cuando se utilizan inmovilizados en esferas de alginato cálcico, el inóculo de células incluidas en las biocápsulas fue suficiente para mantener la cinética fermentativa a lo largo de las 11 reutilizaciones.

## Análisis de parámetros enológicos

En el sector vínico no es costumbre el mantenimiento y reutilización de un mismo inóculo de levadura en varias (o sucesivas) fermentaciones. En la industria cervecera, esta operación sí se realiza y se ha comprobado que las células se someten a considerables tensiones o estreses que afectan a su vitalidad y a la calidad del producto final (Powell *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta este hecho, aunque se ha demostrado que la viabilidad en las fermentaciones vínicas de este estudio no se vio significativamente afectada, se determinó si existían diferencias en las distintas reutilizaciones en algunos parámetros enológicos o en la producción de metabolitos importantes para la calidad organoléptica del vino. En la Tabla 1 se detallan las concentraciones de las variables enológicas clásicas determinadas en las once fermentaciones efectuadas para cada cepa.

Tabla 1. Valores de parámetros enológicos en el mosto fermentado con P29 y QA23. Los valores representan la media aritmética de las tres fermentaciones efectuadas en cada reutilización  $\pm$  la desviación estándar.

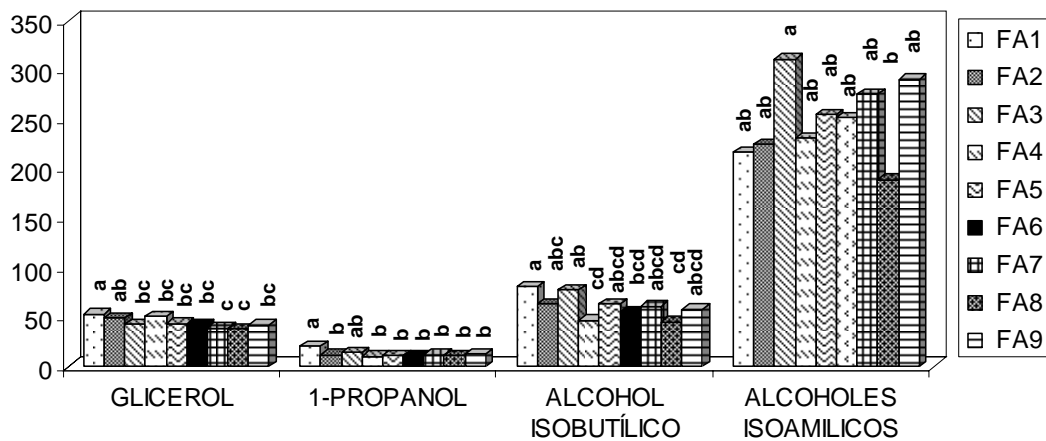
Reutilizaciones	P29					QA23				
	GAV (%vol)	Azúcares totales (G+F) (g/L)	pH	Ac. volátil (g/L ác. acético)	Ac. total (g/L ác. tartárico)	GAV (%vol)	Azúcares totales (G+F) (g/L)	pH	Ac. volátil (g/L ác. acético)	Ac. total (g/L ác. tartárico)
FA1	9,95 $\pm$ 0,10	0,3 $\pm$ 0,00	3,27 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,13	6,83 $\pm$ 0,21	9,95 $\pm$ 0,00	0,3 $\pm$ 0,00	3,26 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,05	7,05 $\pm$ 0,07
FA2	10,25 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,00	3,16 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,03	6,80 $\pm$ 0,00	10,25 $\pm$ 0,09	0,4 $\pm$ 0,00	3,17 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,04	7,23 $\pm$ 0,015
FA3	10,20 $\pm$ 0,07	0,3 $\pm$ 0,00	3,19 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	7,35 $\pm$ 0,07	10,12 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,00	3,22 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 0,05	8,17 $\pm$ 0,06
FA4	10,33 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,00	3,14 $\pm$ 0,00	0,34 $\pm$ 0,01	6,75 $\pm$ 0,21	10,18 $\pm$ 0,06	0,4 $\pm$ 0,00	3,19 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,05	8,00 $\pm$ 0,10
FA5	10,23 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,00	3,16 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,01	7,45 $\pm$ 0,07	10,10 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,00	3,21 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,16	8,30 $\pm$ 0,20
FA6	10,23 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,00	3,14 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,00	7,10 $\pm$ 0,00	10,18 $\pm$ 0,06	0,4 $\pm$ 0,00	3,20 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,12	7,87 $\pm$ 0,15
FA7	10,25 $\pm$ 0,00	0,4 $\pm$ 0,00	3,15 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,03	7,00 $\pm$ 0,28	10,00 $\pm$ 0,28	0,4 $\pm$ 0,00	3,22 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,48	8,15 $\pm$ 0,78
FA8	10,40 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,00	3,17 $\pm$ 0,00	0,39 $\pm$ 0,04	6,70 $\pm$ 0,14	10,35 $\pm$ 0,00	0,4 $\pm$ 0,00	3,18 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,01	7,25 $\pm$ 0,07
FA9	10,25 $\pm$ 0,00	0,4 $\pm$ 0,00	3,17 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,01	7,70 $\pm$ 0,14	10,18 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,00	3,20 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,00	8,20 $\pm$ 0,00
FA10	10,30 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,00	3,16 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,06	6,95 $\pm$ 0,35	10,33 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,00	3,17 $\pm$ 0,00	0,54 $\pm$ 0,01	7,20 $\pm$ 0,14
FA11	10,34 $\pm$ 0,09	0,2 $\pm$ 0,00	3,16 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,09	6,95 $\pm$ 0,49	10,22 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,00	3,18 $\pm$ 0,00	0,57 $\pm$ 0,00	7,40 $\pm$ 0,14

Tanto en el caso de la cepa P29 como en la QA23 se pudo observar en la primera fermentación un menor rendimiento en producción de etanol, supuestamente debido a la adaptación de las biocápsulas al medio. Esta menor concentración de etanol en la FA1 puede relacionarse con una mayor producción de glicerol (estadísticamente significativa) en ambas levaduras (ver Fig. 2). Estas diferencias a nivel de la primera reutilización no pueden atribuirse a la acción del hongo filamentoso que forma la estructura de la biocápsula ya que éste muere a los pocos días de iniciarse la fermentación alcohólica, quedando como mero soporte inerte (Peinado *et al.*, 2006). La FA1 con la P29 registró un valor de acidez volátil superior al resto de reutilizaciones realizadas con la misma cepa, pero por debajo del umbral de percepción ( $>0,7$  g/l). En el caso de la cepa QA23 se detectó un aumento de acidez volátil en las reutilizaciones 5, 6 y 7, pero asociada a una desviación estándar también más elevada de los replicados. No obstante, a partir de la FA 8, los niveles volvieron a los encontrados en las primeras fermentaciones, pudiéndose descartar una alteración del metabolismo de las biocápsulas de levadura reutilizadas.

Respecto al nivel de glicerol (Fig. 2) en los vinos producidos en las 11 reutilizaciones analizadas, existió la misma tendencia de comportamiento en ambas cepas: la mayor producción de este metabolito, con diferencias estadísticamente significativas, se detectó en la

FA1 y la FA2 (5,3 g/l y 4,7 g/l para la P29 y 5,1 g/l y 4,3 g/l para la QA23 respectivamente). En el caso de los alcoholes superiores, donde se analizaron las 9 primeras reutilizaciones, con la cepa P29 (Fig. 2a) no existieron diferencias significativas ( $P=0,741$ ) en el conjunto de los alcoholes superiores (suma de 1-propanol, alcohol isobutílico y alcoholes isoamílicos), aunque sí por separado. Respecto al 1-propanol y al alcohol isobutílico, las principales diferencias en su concentración se observaron en la FA1 y FA3, algo superiores al resto, asumiéndose un periodo de adaptación al medio y mayor actividad de las levaduras. A partir de la FA4 la producción de estos compuestos se estabilizaron. En cuanto a los alcoholes isoamílicos, las diferencias significativas se encontraron entre la FA3 y la FA8, sin observarse ninguna tendencia clara a lo largo de las 9 fermentaciones sucesivas. Respecto al metabolismo de los alcoholes superiores de *S. cerevisiae* QA23 (Fig. 2b), la máxima producción tuvo lugar en la FA1 y la FA3 en la mayoría de los casos, como en la P29. No obstante, con la cepa QA23 se observó un descenso en la concentración de alcoholes superiores a partir de la séptima reutilización. Esto puede significar una cierta alteración en el metabolismo de la levadura a partir de esta fermentación que podría repercutir en la calidad organoléptica del vino final.

(a)



(b)

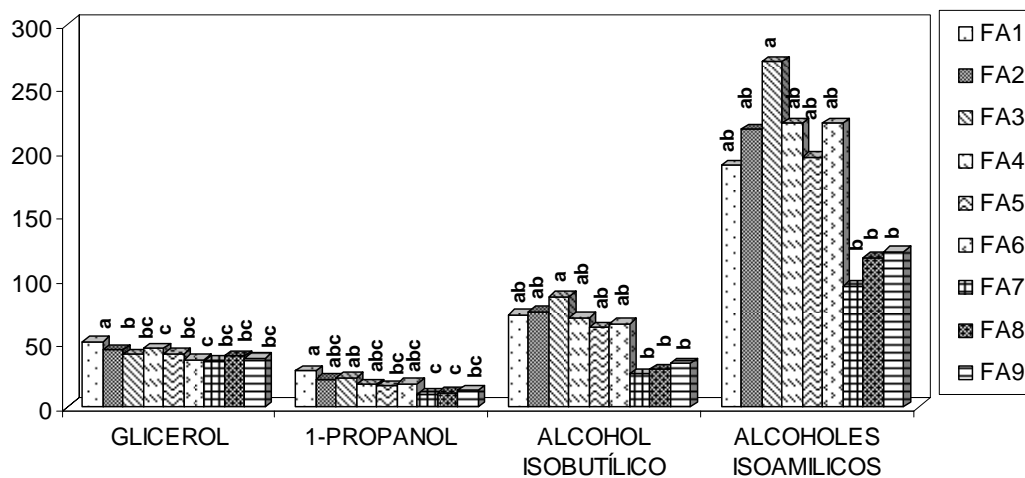


Fig. 2. Contenido en glicerol (g/L) y alcoholes superiores (mg/L) en los mostos fermentados con P29 (a) y QA23 (b): media aritmética de tres fermentaciones en cada reutilización. El valor de glicerol representado corresponde al valor real (x10). Las letras de cada columna indican la separación de medias determinada por el método Tukey.

## CONCLUSIONES

Este estudio describe la aplicación de un sistema innovador de inmovilización celular para levaduras vínicas y su viabilidad para la utilización en distintos procesos fermentativos consecutivos. Se demuestra que las biocápsulas pueden reutilizarse hasta en once vinificaciones, sin perder la actividad fermentativa. Este sistema de co-inmovilización natural mantiene la viabilidad de las células de levadura al menos durante 85 días y conserva la consistencia esférica e integridad, demostrando que el hongo filamentoso actúa como un buen soporte. Los compuestos analizados en el vino se encuentran dentro de los límites de concentración descritos en la literatura y no se muestran cambios sustanciales a lo largo de las distintas reutilizaciones. Aunque son necesarios estudios adicionales con mostos de otras características y con un volumen inicial superior para poder llevar a cabo un análisis sensorial del vino, el uso de este nuevo formato de inmovilización puede permitir agilizar el proceso, reducir costes y tener una futura aplicación en procesos continuos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de este trabajo al Proyecto RTA2008-00056-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA).

## BIBLIOGRAFÍA

Bermeyer, H.U. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie.

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

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.

Godia, F.; Casas, C.; Sola, S. (1991). Application of immobilised yeast cells to sparkling wine fermentation. *Biotechnol. Progr.*, 7: 468-470.

Groboillot, A.; Boadi, D.K.; Poncelet, D.; Neufeld, R.J. (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 14: 75-107.

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

Peinado, R.A.; Moreno, J.J.; Maestre, O.; Mauricio, J.C. (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.

Powell, C.D.; Van Zandycke, S.M.; Quain, D.E.; Smart, K.A. (2000). Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact in brewing fermentations. *Microbiology*, 14: 1023-1034.

Powell, C.D.; Quain, D.E.; Smart, K.A. (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Research*, 3: 149-157.

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.

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

Sablayrolles, J.M.; Barre, P.; Grenier, P. (1987). Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnol Tech*, 1: 181-184.