

## Relevamiento y caracterización de levaduras autóctonas de interés enológico en la Región del Sudeste Bonaerense (Argentina)

Pereyra, Estefanía<sup>1</sup>; Marcos Valle, Facundo<sup>1\*</sup>; Godoy, Carlos<sup>1</sup>; Castellari, Claudia<sup>1</sup>; Andreoli, Yolanda<sup>1</sup>

Pereyra, Estefanía; Marcos Valle, Facundo; Godoy, Carlos; Castellari, Claudia; Andreoli, Yolanda

<sup>1</sup>Unidad Integrada Balcarce (FCA, UNMdP – EEA Balcarce, INTA), Ruta 226 km 73,5 Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

\*autor de contacto: [marcosvalle.facundo@inta.gob.ar](mailto:marcosvalle.facundo@inta.gob.ar)

### Resumen

En la actualidad, las bodegas buscan diferenciar sus productos con el fin de posicionarse en el mercado mundial. Una estrategia es la diferenciación que surge a través de características propias del terroir. Estudios realizados señalan a las levaduras autóctonas como una herramienta para lograr tipicidad en los vinos. El objetivo del presente estudio fue cuantificar y caracterizar las levaduras nativas presentes en los racimos y durante la fermentación del mosto de uvas de las variedades *Pinot Noir* y *Chardonnay* cultivadas en un viñedo de la región sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina y relacionarlas con las características del sustrato. Para esto, se extrajeron del cultivo a campo racimos de uva de las variedades mencionadas y se recolectó el mosto de cada variedad, en diferentes tiempos de la fermentación en botellas estériles. Se caracterizaron las poblaciones de levaduras y se evaluaron parámetros físicos y químicos. Se determinó el pH y los sólidos solubles en cada variedad de uva y en cada tiempo de mosto evaluado. Se identificaron diferentes especies de levaduras por taxonomía convencional. La población de levaduras disminuyó a lo largo del tiempo de fermentación evaluado. No se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el recuento de levaduras entre ambas variedades de uvas. En las bayas de *Chardonnay* se aislaron *Rhodotorula mucilaginosa* y *Candida parapsilosis* y en las bayas de *Pinot Noir*, se identificaron *Zygosaccharomyces bisporus* y *Kloeckera apiculata*. En los mostos de *Chardonnay* y *Pinot Noir* se identificó *Candida parapsilosis*. La diversidad de levaduras no varió desde el inicio de la fermentación y durante los tiempos evaluados.

**Palabras clave:** vino; uva; mosto; levaduras autóctonas; fermentación alcohólica; *Saccharomyces*.

### Abstract

Currently, wineries seek to differentiate their products in order to position themselves in the world market. One strategy is the differentiation that emerges through the characteristics of the terroir. Studies carried out indicate native yeasts as a tool to achieve typicality in wines. The objective of the present study was to quantify and characterize the native yeasts present in the bunches and during the fermentation of grape must of the *Pinot Noir* and *Chardonnay* varieties grown in a vineyard in the southeast region of the province of Buenos Aires, Argentina and relate them to the characteristics of the substrate. For this, grape bunches of the mentioned varieties were extracted from the field crop and the must of each variety was collected, at different times of the fermentation in sterile bottles. Yeast populations were characterized and physical and chemical parameters were evaluated. The pH and soluble solids were determined in each variety of grapes and in each time of must evaluated. Different yeast species were identified by conventional taxonomy. The yeast population decreased throughout the fermentation time evaluated. There were no

significant differences ( $p > 0.05$ ) in the yeast count between both grape varieties. In the *Chardonnay* grapes, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Candida parapsilosis* were isolated and in the *Pinot Noir* grapes, *Zygosaccharomyces bisporus* and *Kloeckera apiculata* were identified. In the musts of *Chardonnay* and *Pinot Noir*, *Candida parapsilosis* was identified. The diversity of yeasts did not vary from the beginning of the fermentation and during the times evaluated.

**Keywords:** Wine, grape; must, native yeasts, alcoholic fermentation, *Saccharomyces*.

## Introducción

En el marco de la política de las grandes bodegas para ampliar su cartera de vinos y ofrecer al mercado nacional e internacional productos novedosos, se están explorando nuevas áreas de cultivo. La tendencia hacia vinos aromáticos, con menor graduación alcohólica típicos de los climas oceánicos, como los neozelandeses y los del sur de Australia, despertó el interés por la región del sudeste bonaerense en Argentina (Godoy, 2015).

En la actualidad, el uso de cultivos seleccionados (*Saccharomyces cerevisiae*) en la producción de vinos es una práctica extendida en todas las zonas vitivinícolas del mundo, lo que ha contribuido a un mejor control de la vinificación, pero también a una simplificación de las comunidades microbianas (Carrau, 2005) que participan en las fermentaciones, lo que puede conducir a una estandarización de los vinos elaborados (Ocón Sáenz, 2014).

El aislamiento y selección de cepas autóctonas de levaduras procedentes de viñedos de una zona vitivinícola determinada permite resaltar las cualidades distintivas de las fermentaciones espontáneas de la zona, con la seguridad y reproducibilidad que requieren las fermentaciones industriales (Beldaet *al.*, 2014).

En la actualidad, existe una demanda continua de nuevas cepas de levaduras adaptadas a diferentes tipos y estilos de vinos. En particular despiertan interés las levaduras vínicas “no-*Saccharomyces*”, que podrían ser incluidas en cultivos iniciadores y satisfacer dicha demanda (Viana Garrido, 2011).

En este estudio, el interés se centra en la cuantificación e identificación de levaduras autóctonas aisladas de viñedos de diferentes variedades ubicados en la región sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina), para su posible utilización como inóculo en fermentaciones industriales, con el fin de obtener tipicidad en los vinos de esta región.

## Zona de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en un viñedo de Chapadmalal, partido de General Pueyrredón, provincia de Buenos Aires, Argentina ( $38^{\circ}08'13''$  S;  $57^{\circ}43'37''$  W). Las vides están plantadas a nivel del mar y a 3km de la costa con un clima templado oceánico (Cano y Benseny, 2013). La temperatura media anual es de  $14^{\circ}\text{C}$  y las precipitaciones alcanzan los 920mm anuales lo que posibilita el cultivo en seco.

## Determinaciones realizadas

En marzo de 2016 se recolectaron quince racimos (T1) al azar de la variedad *Pinot Noir* y quince de la variedad *Chardonnay*. El muestreo del mosto (250 mL de mosto de cada variedad) se realizó en diferentes momentos de la fermentación, uno al inicio (T2), el día posterior al ingreso del mosto al tanque de fermentación y el otro a los tres días de haber comenzado el proceso (T3).

Se determinó el pH de las uvas y mostos utilizando un peachímetro digital (Oakton) y el contenido de sólidos solubles (SS) utilizando un refractómetro (Atago Master  $\alpha$ ) con compensación automática de la temperatura (Nuñez Hinostroza, 2010).

El análisis microbiano consistió en el recuento e identificación de levaduras vínicas. Se seleccionaron entre 6-7 bayas (10 gramos), obtenidas al azar de los racimos

correspondientes a cada variedad y se colocaron en una botella estéril conteniendo 90 mL de solución fisiológica estéril, se trituraron con espátula y se homogeneizaron en agitador eléctrico a 140 rpm durante 15 minutos. En el caso del mosto, obtenido de cada tiempo de muestreo, se colocaron 20 mL de mosto en 180 mL de solución fisiológica estéril y se homogeneizó del mismo modo que las bayas. Se realizaron diluciones seriadas al décimo en tubo y siembra en superficie en placas de Petri conteniendo el medio de cultivo YPD (Gonzalez *et al.*, 2013). Las placas fueron incubadas en estufa a 28°C durante 48-72 h y se determinaron las unidades formadoras de colonia por gramo de baya (UFC.g<sup>-1</sup>) o por mililitro de mosto (UFC.mL<sup>-1</sup>). Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (R versión 3.1.1, 2014). Dichos datos fueron transformados logarítmicamente (log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) de acuerdo con Clewer y Scarisbrick (2001).

Para la identificación microbiana se seleccionaron los aislamientos que presentaron morfologías macroscópicas diferentes en las placas de recuento y se identificaron empleando claves de taxonomía convencional (Pitt y Hocking, 2009; Kurtzman y Fell, 1999).

## Resultados y Discusión

### - Evaluaciones físico-químicas

La determinación de sólidos solubles, en el caso de las bayas, registró valores de 20,6 °Brix para *Chardonnay* y de 16,6 °Brix para *Pinot Noir* y, en el caso de los mostos, 17,15 y 15,5 °Brix para *Chardonnay* y *Pinot Noir*, respectivamente.

La acidez del vino, expresada por el pH, registró valores de 3,67 y 3,56 para bayas de *Chardonnay* y *Pinot Noir*, respectivamente. En el caso de los mostos, el valor promedio registrado fue de 3,38 y 3,74 para la variedad *Chardonnay* y *Pinot Noir*, respectivamente, valores que se ubican dentro del rango objetivo para cada variedad (Urbina Vinos, 2013).

### - Recuento de levaduras vínicas

Los recuentos de levaduras en las bayas en el cultivo y durante la fermentación del mosto no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las variedades *Chardonnay* y *Pinot Noir*, registrándose recuentos de 4,49 y 4,52 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente (Figura 1).

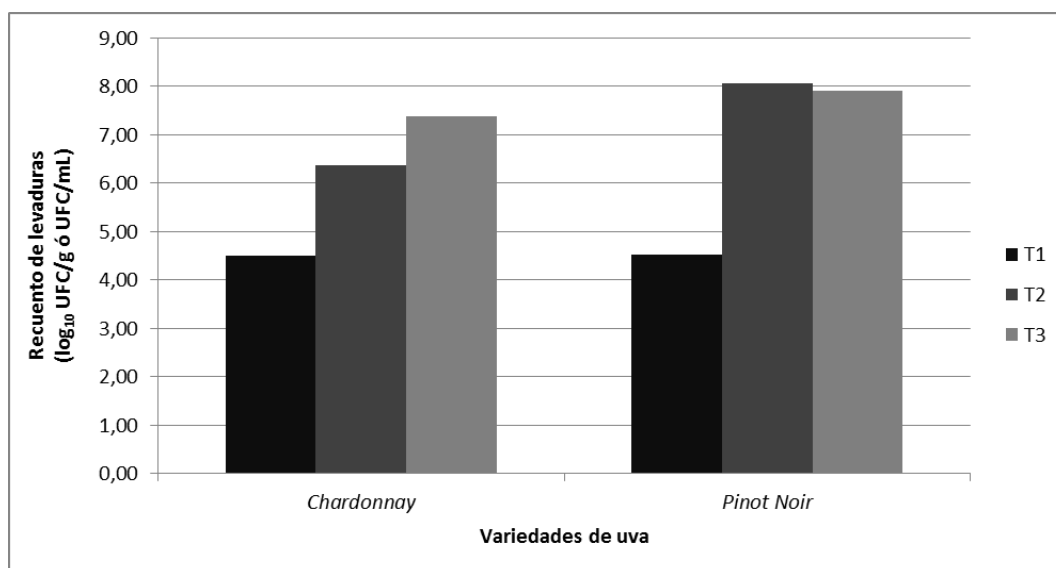


Figura 1. Recuento de levaduras en bayas del cultivo a campo (T1) y en diferentes tiempos durante la fermentación del mosto (T2 y T3) para cada variedad de uva analizada.

El tamaño de las poblaciones de levaduras en uvas registrado es coincidente con lo expresado por la bibliografía ( $10^3$ - $10^5$  UFC/baya) y el mismo depende del grado de madurez de la fruta, del estado sanitario, de las condiciones climáticas del cultivo y de los tratamientos sanitarios aplicados (Hidalgo Togores, 2003; y Fleet, 2008).

Con respecto a los recuentos en los mostos, el recuento en *Chardonnay* fue menor al de *Pinot Noir*. El recuento en T2 fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que en T3 en el caso de *Chardonnay*, no registrando diferencias significativas entre éstos para la variedad tinta (Tabla 1).

Tabla 1. Recuento de levaduras en dos tiempos de fermentación del mosto de uvas de las variedades *Chardonnay* y *Pinot Noir*.

Variedad de uva	Tiempos de fermentación	Recuento de levaduras ( $\log_{10}$ UFC/mL)
<i>Chardonnay</i>	T2	6,37 b
	T3	7,37 a
<i>Pinot Noir</i>	T2	8,07 a
	T3	7,91 a

\*letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los recuentos microbianos entre los tiempos de fermentación de cada variedad de uva.

#### - Identificación de levaduras vínicas

En las bayas *Chardonnay* se identificaron *Rhodotorula mucilaginosa* y *Candida parapsilosis* y en *Pinot Noir*, se identificó *Kloeckera apiculata* y *Zygosaccharomyces bisporus*. Según Combina *et al.* (2005), cada región tiene una microflora característica de acuerdo con el área geográfica y sus labores culturales. Siendo las condiciones climáticas de esta zona particular las que probablemente limiten la presencia de otras levaduras (Beltran *et al.*, 2002).

Según Rementeria *et al.* (2003) las levaduras apiculadas suelen ser las más frecuentes en las uvas, aunque existen estudios en los que éstas son escasas y otros géneros como *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y algunas especies de *Candida* son más frecuentes.

No se identificó *S. cerevisiae* en las uvas. Según la bibliografía la ocurrencia de *S. cerevisiae* es baja en uvas sanas (Mercado *et al.*, 2007). Entre los factores que pudieron haber contribuido a la baja participación de *S. cerevisiae* en la flora presente en el viñedo podemos mencionar los tratamientos fungicidas con productos cúpricos tradicionales y ampliamente utilizados en viticultura. El viñedo fue sometido a tratamientos periódicos con sulfato de cobre. Lin, (1981) demostró que *Saccharomyces* es susceptible al cobre, a diferencia de *K. apiculata*, *Rhodotorula* y *Candida*, que son tolerantes.

El empleo de dióxido de azufre es una herramienta fundamental en la producción de vino (Serres, 2017) donde algunas levaduras se muestran susceptibles y otras resultan tolerantes (Henick-Kling *et al.*, 1998).

Ocón Sáenz (2014) menciona que la distribución de especies varía entre zonas geográficas e incluso entre vendimias sucesivas. Es importante señalar que el uso

continuo de levaduras comerciales y seleccionadas reduce la diversidad e importancia de las cepas indígenas (Cordero Bueso, 2011) limitando la tipicidad en los vinos.

### Referencias bibliográficas

- BELDA, I.; NAVASCUÉS, E.; ALONSO, A.; MARQUINA, D.; SANTOS, A. 2014. Microbiología del proceso de vinificación: selección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas con óptimas propiedades enológicas. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología. 7 (1): 1-14.
- CANO, J.; BENSENY, G. 2013. Clima y turismo. En: Benseny, G. *et al.* Gestores costeros de la teoría a la práctica: una aplicación en áreas litorales. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, pp.137-169
- CARRAU, F.M. 2005. Levaduras nativas para enología de mínima intervención. Biodiversidad, selección y caracterización. *Agrociencia* 9(1-2):388-389.
- CENTRO TECNOLÓGICO DE LA VID Y EL VINO (CTVV). 2016. Información técnica. Monitoreo de madurez. [en línea] <[http://ctvv.utralca.cl/medios/ctvv/InformacionTecnica/Publicaciones/Monitoreo\\_de\\_madurez.pdf](http://ctvv.utralca.cl/medios/ctvv/InformacionTecnica/Publicaciones/Monitoreo_de_madurez.pdf)> [consulta: diciembre de 2018].
- CLEWER, A.G.; SCARISBRICK, D.H. 2001. Practical statistics and experimental design for plant and crop science. John Wiley y Sons, England, 332 p.
- COMBINA, M.A.; ELÍA, L., MERCADO, C.; CATANIA, A.; GANGA, C.; MARTINEZ.2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of FoodMicrobiology* 99: 237-243.
- CORDERO BUESO, G.A. 2011. Efecto de los parámetros agronómicos del viñedo sobre la biodiversidad de levaduras asociadas a la uva. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Física Aplicada. Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Madrid. 268 p.
- FLEET, G.H. 2008. Wine yeast for the future. *FEMS YeastResearch* 8(7):979-995.
- GODOY, C. 2015. Vinos de Mar. *Visión Rural XXII* (110): 51-53.
- GONZALEZ, S.; ALCOBA-FLOREZ, J.; LAICH, F. 2013. *Lachancealanzarotensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from grapes and wine fermentation in Lanzarote, Canary Islands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 358–363.
- HENICK-KLING, T.; EDINGER, W.; DANIEL, P.; MONK, P. 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology* 84: 865-876.
- HIDALGO TOGORES, J. 2003. Tratado de enología. Mundi-Prensa. Madrid, España 1424 p.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. 1999. The Yeast, a taxonomic study. 4ta. ed. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. eds. USA. 1055 p.
- LIN, Y. 1981. Formulation and testing of cupric sulphate medium for wild yeast detection. *Journal Institute Brewing* 87: 151-154.

- MERCADO, L.A.; DALCERO, R.; MASUELLI, M.; COMBINA. 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology* 24: 403-412.
- NUÑEZ HINOSTROZA, R.A.; BRUMOVSKY, L.A. 2010. Evaluación sensorial de jugos de uva turbios y límpidos. [en línea] <<http://www.scielo.org.ar/img/revistas/recyt/n13/html/n13a06.htm>>. Ingeniería-tecnología-informática. [consulta: 9 junio 2017].
- OCÓN SAENZ, M. E. 2014. Diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas. Tesis doctoral. Universidad de La Rioja. Logroño. 159 p.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. 2009. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. Springer. New York. 540p.
- R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING c. 2014 The R Project for Statistical Computing R versión 3.1.1 (11-08-14). [en línea] <https://www.r-project.org/alt-home/> [consulta: 30 noviembre 2017].
- REMENTERIA, A.; RODRÍGUEZ, J.A.; CADAVAL, A.; AMENABAR, R.; MUGURUZA, J.R.; HERNANDO, F.L. 2003. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the Txakoli de Bizkaia region (Basque Country, North Spain). *International Journal Food Microbiology* 86(1-2): 201–207. 21.
- SERRES, C. 2017. El dióxido de azufre y su función en los vinos: Haro. Rioja. [en línea] <<http://www.carlosserres.com/dioxido-azufre-funcion-vino/>> [Consulta: 07 julio 2017].
- URBINA VINOS. 2013. Influencia del pH sobre el vino. [en línea] <<http://urbinavinos.blogspot.com.ar/2013/04/influencia-del-ph-sobre-el-vino.html>>. [consulta: 7 septiembre 2017].
- VIANA GARRIDO, F. V. 2011. Levaduras no-*Saccharomyces* para modular el aroma secundario de los vinos: incremento del acetato de 2-feniletilo mediante cultivos iniciadores mixtos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. 206 p.