

ORIGINAL

La inoculación de levaduras killer *Saccharomyces cerevisiae* en la fase de tiraje mejora la crianza y la calidad del cava

Velázquez Molinero, Rocío¹, Zamora de Alba, Emiliano², Álvarez, Manuel³, Álvarez Franco, M^a Luz², Cotilla del Hoyo, Pedro² y Ramírez Fernández, Manuel¹

¹: Departamento de Ciencias Biomédicas, Área de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz, Spain. Email: mramirez@unex.es.

²: Estación Enológica, Junta de Extremadura, 06200 Almendralejo, Badajoz, Spain.

³: Heral Enología, SL. C/ Alfonso Iglesias Infante n 11, 06200 Almendralejo, Spain.

Recibido 27 de enero de 2017 / Aceptado 23 de marzo de 2017 / Publicado 1 de mayo de 2017

RESUMEN

Se pretende acelerar la muerte celular y la autólisis de las levaduras durante la segunda fermentación y crianza del cava inoculando con levaduras killer *S. cerevisiae* en la fase de tiraje. Partimos de la base de que varias levaduras killer matan a otras levaduras vínicas (killer o sensibles) en condiciones de laboratorio similares a las utilizadas en la elaboración de cava (bajo pH y temperatura). Afortunadamente, algunas de estas estirpes de levaduras también mostraron un fenotipo killer intenso durante la segunda fermentación en botella bajo presión de anhídrido carbónico. Además, el efecto killer en los cavas inoculados con cultivos mixtos de levaduras (killer + sensibles) mejoró la calidad de la espuma y la sensación en boca respecto a los cavas elaborados sin efecto killer inoculados con cada levadura por separado. Esta mejora fue muy evidente cuando el efecto killer fue más intenso y se produjo de forma rápida pocos días después del tiraje, y menos destacada cuando este efecto fue menos intenso y más lento. Sólo en los cavas en los que se produjo efecto killer se detectaron levaduras destruidas consecuencia de la autólisis celular durante los primeros días de fermentación, que fueron reabsorbiéndose en el vino progresivamente hasta desaparecer. La calidad del cava no correlacionó siempre con la concentración de polisacáridos, proteínas, manano, o compuestos aromáticos. Esto sugiere que la sensación en boca y la calidad de la espuma de estos vinos son características complejas dependientes de los distintos compuestos liberados por las levaduras autolisadas y de las interacciones entre ellos.

PALABRAS CLAVE

Levadura, killer, *Saccharomyces cerevisiae*, cava, crianza, autólisis, espuma, aromas.

ABSTRACT

It is intended to accelerate cell death and autolysis of yeasts during the second fermentation and aging of traditional sparkling-wine by inoculating *S. cerevisiae* killer yeast for second fermentation. We already knew that several killer yeasts kill other yeasts (killer or sensitive) in laboratory conditions similar to those used in the elaboration of sparkling-wine (low pH and temperature). Fortunately, some of these yeast strains also showed an intense killer phenotype during the second fermentation under carbon dioxide pressure. In addition, the killer effect in the sparkling-wine inoculated with mixed cultures of yeasts (killer + sensitive) improved the quality of the foam and the mouthfeel with respect to those sparkling-wines elaborated without killer effect, that were inoculated with each yeast strain separately. This improvement was very evident when the killer effect was intense and it occurred quickly few days after the yeast inoculation, and less evident when this effect was poor and slower. Destroyed yeasts resulting from cellular autolysis were detected during the first days of fermentation only in the sparkling-wines in which the killer effect occurred, and these yeasts were gradually reabsorbed in the wine until disappearing. Wine quality improvement did not correlate with the polysaccharide, protein, mannan, or aromatic compound concentrations, suggesting that the mouthfeel and foaming quality of sparkling wine are very complex properties influenced by different wine compounds coming from autolysed yeasts and their interactions.

KEY WORDS

Yeast, killer, *Saccharomyces cerevisiae*, sparkling wine, aging, autolysis, foam, aroma.

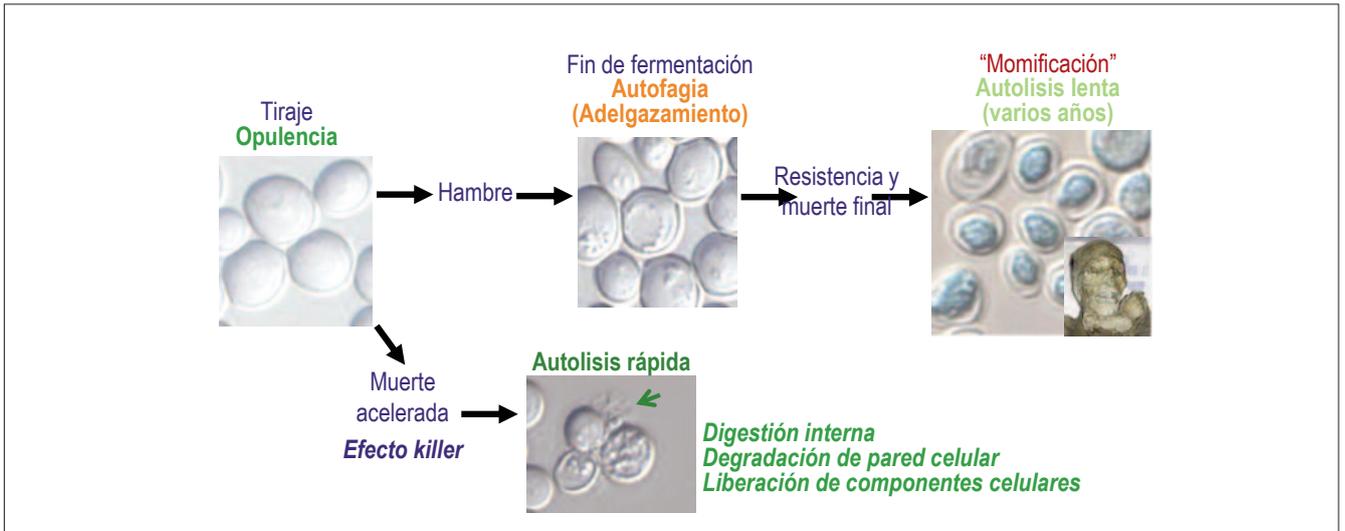


Figura 1. Esquema del proceso habitual de degradación de las levaduras durante la segunda fermentación del cava (parte superior), y de muerte y autólisis rápida en cavas inoculados con mezclas de levaduras killer y sensibles (parte inferior).

INTRODUCCIÓN

El cava es un vino espumoso de crianza elaborado mediante el método tradicional (champenoise). Su calidad depende del proceso de envejecimiento con las lías de levaduras. Estas células muertas sufren un proceso muy lento de autólisis liberando muchos compuestos interesantes, especialmente polímeros coloidales como polisacáridos y manoproteínas que, supuestamente, mejoran la sensación en boca y la calidad de la espuma del cava. La autólisis natural de las levaduras en el cava es un proceso que puede durar años debido a que las condiciones ambientales (pH 2.8-3.3, temperatura 12-15°C, aproximadamente 12% etanol, y 6-7 atm de presión) distan mucho de las ideales para que se complete este proceso (pH 5 y 45°C, (Kemp et al., 2015)). Se han probado distintas estrategias para acelerar la crianza del cava, como añadir autolisados de levaduras en el tiraje o aumentar la temperatura ambiente. Aunque se han obtenido resultados interesantes (Charpentier et al., 1993), estos procedimientos suelen conferir defectos organolépticos (Peppler, 1982) y sabores a tostado desagradables.

Una vez terminada la segunda fermentación del cava, las levaduras mueren progresivamente antes de que empiece el proceso de autólisis. El problema está en que antes de morir, cuando los nutrientes escasean, las levaduras sufren un proceso de autofagia en el que digieren gran parte de sus componentes celulares para utilizarlos y mantenerse vivas más tiempo, similar al adelgazamiento que se produce en muchos seres vivos en respuesta a inanición prolongada. En esta situación crítica, cuando las células mueren en las condiciones de elaboración del cava, tienen más tendencia a “momificarse” y mantener sus estructuras intactas,

que a autolisarse cediendo compuestos interesantes al cava (Fig. 1). Esto es así porque en estas condiciones (bajos pH y temperatura, y ambiente reductor con alta presión de CO₂) se conserva muy bien la integridad de la materia orgánica. En consecuencia, la autólisis de las levaduras es lentísima y comienza muy tarde. Dependiendo de la composición del vino, temperatura de crianza y la estirpe de levaduras, la degradación de las levaduras comienza de tres a nueve meses después del tiraje (Moreno-Arribas and Polo, 1996), de forma que no se puede completar satisfactoriamente en cavas jóvenes de nueve meses de crianza. Resulta pues evidente la necesidad de que parte de las levaduras inoculadas en el tiraje mueran una vez realizada la segunda fermentación o incluso algo antes, y siempre antes de sufrir el adelgazamiento provocado por la autofagia. De esta manera, los polímeros que componen las células en estado saludable pueden degradarse en el subsecuente proceso de autólisis de las levaduras muertas, antes de que las levaduras tengan oportunidad de sufrir autofagia, adelgazar y momificarse. Una alternativa para acelerar la autólisis de las levaduras consiste en utilizar mezclas de levaduras asesinas (killer) y sensibles como inóculos en la segunda fermentación. La toxina asesina puede matar a las células sensibles y acelerar su autólisis (Todd et al., 2000), pero esta estrategia no había sido probada a nivel de bodega hasta muy recientemente (Velázquez et al., 2016). En este trabajo se analiza el uso de nuevas levaduras killer *S. cerevisiae* para acelerar la muerte celular e incrementar la autólisis de las levaduras durante la segunda fermentación y crianza en botella del cava (Fig. 1). Se evalúa su efecto sobre la cinética de fermentación, la espuma y la calidad organoléptica del producto final.

La inoculación de levaduras killer *Saccharomyces cerevisiae* en la fase de tiraje mejora la crianza y la calidad del cava

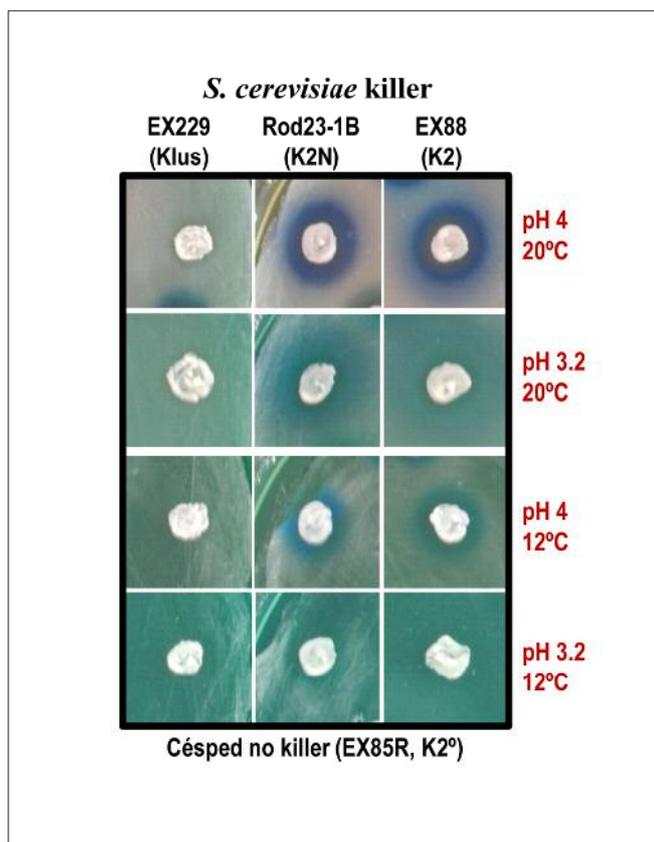


Figura 2. Test de fenotipo de levaduras killer en placas de medio MB-agar frente a césped de levaduras no-killer en distintas condiciones de pH y temperatura. La presencia de halo azul alrededor del pegote de levadura indica su fenotipo killer sobre las células del césped, las cuales se tiñen de azul una vez muertas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La segunda fermentación del cava se realizó inoculando el vino base con distintas combinaciones de cinco estirpes de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*: dos killer tipo K2, EX85 (K2, CYH^S) y Rod23-1B (K2, ROD^{PC}, CYH^R); una killer tipo Klus, EX229 (Klus, CYH^S); y dos no killer, EX85R (K2-, CYH^R) y EX229-R1 (Klus-, CYH^R). Previo al tiraje, las levaduras se crecieron en YEPD, se concentraron 10× y se adaptaron al crecimiento en vino base. Al vino base (Macabeo) se le añadió 24 g/L azúcar y 0,2 g/L de (NH₄)₂HPO₄. No se añadió bentonita ni ningún otro coadyuvante de fermentación. Se realizó el tiraje en botellas de 0,75 L con obturador de plástico y tapón de corona. Para cada levadura por separado o mezcla de dos levaduras, se inoculó 1-4×10⁶ CFU/mL (la mitad de cada levadura en el caso de los inóculos mixtos), y se incubaron a 18-19°C durante los primeros 15 días para potenciar el efecto killer, y posteriormente a 12-14°C hasta los 9 meses. A lo largo de la segunda fermentación se midió la presión (expresada en atm) a temperatura ambiente (corregida

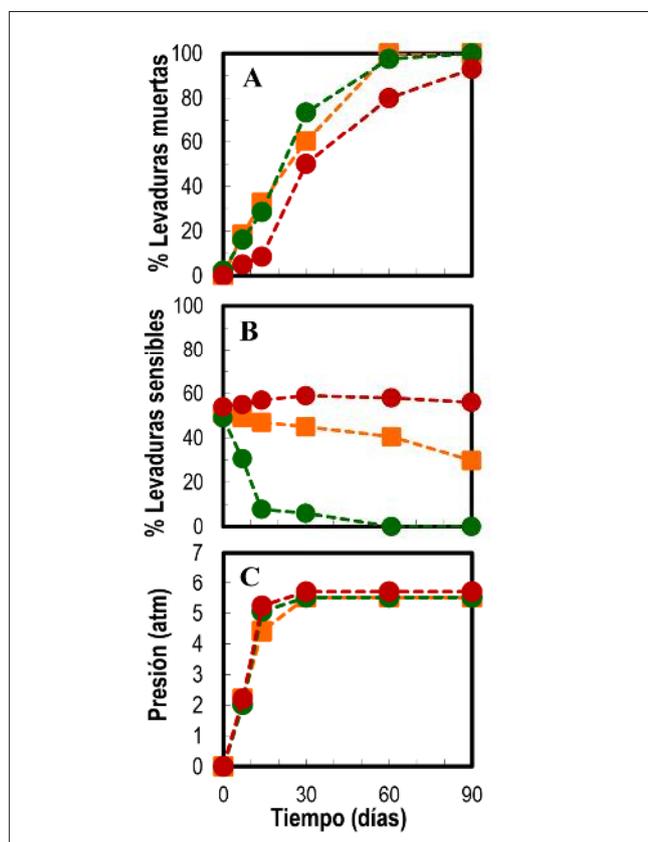


Figura 3. Evolución de la muerte celular (A), de la población de levaduras sensibles a la toxina killer (B), y de la presión en botella (C) durante la segunda fermentación de tres cavas representativos inoculados con las mezclas de levaduras: EX85 killer + EX85R sensible (---■---), EX229-R1 no-killer + Rod23-1B sensible (---●---), y EX229 killer + Rod23-1B sensible (---▲---).

posteriormente a 20 °C) usando un afrometro acoplado al cuello de la botella. Se monitorizó la población de cada levadura analizando su resistencia a cicloheximida (CYH^R) o rodamina 6G (ROD^{PC}) mediante réplica en placas de YEPD suplementado con cicloheximida o rodamina 6G. La proporción de muerte celular se determinó por tinción con azul de metileno, los polisacáridos con el método del fenol-ácido sulfúrico, la manosa con un método desarrollado previamente (Quiros et al., 2012), y proteínas con el método Bradford. El test de fenotipo killer se realizó como se ha descrito previamente (Ramírez et al., 2015). Los volátiles minoritarios se midieron por cromatografía gases-masas en el Servicio de Análisis Elemental y Molecular de la UEx (García-Carpintero et al., 2011), y los parámetros de la espuma con equipo Mosalux. El análisis organoléptico se realizó por catadores expertos de la Estación Enológica de Almendralejo. El análisis estadístico de los datos se realizó con test paramétrico ANOVA (p<0.05) empleando el software SPSS versión 20.0 para Windows (Chicago, IL).

Rocío Velázquez, Emiliano Zamora, Manuel Álvarez, M^a Luz Álvarez, Pedro Cotilla y Manuel Ramírez

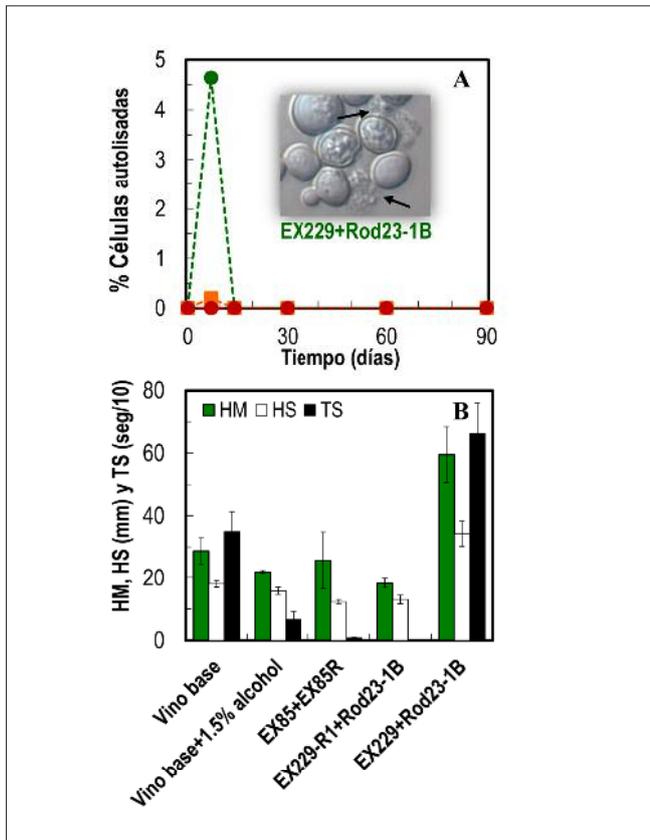


Figura 4. Proporción de levaduras autolisadas (A) y análisis de espuma (B) de tres ejemplos representativos de cavas elaborados con mezclas de levaduras killer y sensibles. Parámetros de espuma: HM, altura máxima; HS, altura de la espuma estabilizada; TS, tiempo de mantenimiento de la espuma. Símbolos: EX85 killer + EX85R sensible (●-●-), EX229-R1 no-killer + Rod23-1B sensible (●-●-), y EX229 killer + Rod23-1B sensible (●-●-).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Las estirpes killer de levaduras *S. cerevisiae* matan a las estirpes sensibles en las condiciones de elaboración de cava, sin afectar negativamente a la toma de espuma*

Con carácter previo a este estudio, se seleccionaron nuevas estirpes de levaduras killer procedentes de la D.O. Ribera del Guadiana en base a su capacidad para realizar la segunda fermentación del cava a nivel industrial. En los test realizados en placas de medio MB, las levaduras killer tipo K2 mostraron buen fenotipo killer frente a levaduras sensibles a pH 4 y 20°C; sin embargo, este efecto perdió intensidad cuando las condiciones fueron más similares a las de elaboración de cava, pH 3,2 y 12°C. Por el contrario, las levaduras killer Klus mostraron siempre un fenotipo killer casi inapreciable, especialmente a pH 3,2 y 12°C (Fig. 2).

Ambos tipos de levaduras mantuvieron el fenotipo killer en condiciones reales de elaboración de cava, con la salvedad de que las levaduras killer Klus mostraron un fenotipo más intenso que las K2 en estas condiciones (Fig. 3), al contrario de ocurrido en el ensayo en placa. Esto puede ser debido a la mejor difusión de la toxina Klus en medio líquido, y a que la segunda fermentación de cava es mucho más larga (meses) que el test killer en placa de agar (menos de 8 días). La cantidad de células muertas incrementó más rápidamente en los cavas con efecto killer (Fig. 3A), y las levaduras sensibles fueron claramente desplazadas por las levaduras killer, que fueron las mayoritarias al final de fermentación (Fig. 3B). A pesar de esta muerte acelerada de parte de la población de levaduras sensibles, la cinética de fermentación fue correcta en todos los casos, alcanzándose aproximadamente la misma presión en todos los cavas, con o sin efecto killer (Fig. 3C). Sólo en los cavas con efecto killer se detectaron levaduras destrozadas consecuencia de la autólisis celular durante los primeros días de fermentación (Fig. 4A), que fueron reabsorbiéndose en el vino progresivamente hasta desaparecer.

El efecto killer mejora la calidad de la espuma y organoléptica del cava

Se produjo una mejora evidente de la calidad de la espuma solo en los cavas con el mayor efecto killer y más del 3,5% de levaduras autolisadas (Fig. 4B). Estos mismos cavas resultaron ser los más apreciados por su calidad organoléptica (Tabla 1). A pesar de esto, no se encontró correlación significativa entre la calidad de estos cavas con la cantidad de coloides o compuestos aromáticos, o diferencias significativas relevantes respecto a los cavas de menor calidad. El efecto killer, en estas condiciones de alta presión, solo incrementó ligeramente la cantidad de manoproteínas. Esto sugiere que la sensación en boca y la calidad de la espuma de estos vinos son características muy complejas dependientes de muchos compuestos distintos liberados por las levaduras muertas, y de las interacciones entre ellos. Probablemente, el efecto positivo de todos estos compuestos también dependa de la composición química específica de cada vino en cuestión. A pesar de esto, esta situación compleja y pendiente de conocer con más precisión, no resta validez a nuestra propuesta de realizar el tiraje con inóculos mixtos de levaduras killer y sensibles, ya que esta estrategia acelera la autólisis celular y mejora la calidad del cava.

La inoculación de levaduras killer *Saccharomyces cerevisiae* en la fase de tiraje mejora la crianza y la calidad del cava

Levadura inoculada	Alcohol (% v/v)	Presión (atm)	Células autolisadas (%)*	Preferencia (%)
Sin efecto killer				
EX85	11,31	5,7	0,00	65
EX229	11,35	5,6	0,00	65
EX85R	11,35	5,7	0,00	65
EX229-R1	11,32	5,5	0,00	65
EX229-R1+Rod23-1B	11,32	5,5	0,00	68
Con efecto killer				
EX85+EX85R	11,35	5,6	0,20	75
EX85+EX229-R1	11,29	5,6	0,13	70
EX229+EX85R	11,27	5,5	0,15	72
EX229+Rod23-1B	11,29	5,5	4,64	85
EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R	11,29	5,5	4,00	80

Tabla 1. Parámetros relevantes y calidad organoléptica de los cavas elaborados con una levadura o mezcla de levaduras (killer + sensibles). Los datos son la media de dos análisis independientes. La desviación estándar fue siempre menos del 8% de la media. *, Células autolisadas después de 7 días de segunda fermentación.

CONCLUSIÓN

La inoculación con cultivos mixtos de levaduras killer provoca la muerte celular y la autólisis temprana de las levaduras sensibles durante la elaboración de cava, sin afectar negativamente a la cinética de fermentación ni al consecuente incremento de presión. Cuando este efecto killer provoca la autólisis temprana de más del 3,5% de las células, se libera la suficiente cantidad de compuestos celulares como para mejorar significativamente la calidad de la espuma y organoléptica del cava. Sin embargo, no se encontró ninguna correlación clara entre la calidad de la espuma y la concentración de polisacáridos, proteínas o manano, compuestos que han sido previamente propuestos como factores muy influyentes en la cantidad y estabilidad de la espuma del cava.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos GR15071 (Consejería de Infraestructura y Desarrollo Tecnológico, Junta de Extremadura) y AGL2011-25711 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España). Rocío Velázquez ha sido becaria de la Consejería de Economía, Comercio e Innovación (Junta de Extremadura).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Charpentier, C., Feuillat, M., Fleet, G., 1993. Yeast autolysis, Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers, pp. 225-242.
García-Carpintero, E.G., Sánchez-Palomo, E., González-

Viñas, M.A., 2011. Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. Food Res. Int. 44, 61-70.

Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., Marchal, R., 2015. Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. J Agric Food Chem 63, 19-38.
Moreno-Arribas, V., Polo, M.C., 1996. Peptides in musts and wines. Changes during the manufacture of cavas (Sparkling wines). Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 3783-3788.

Peppler, H.J., 1982. Yeast extracts, in: Rose, A.H. (Ed.), Economic Microbiology. Fermented Foods. Academic Press, London, pp. 293-312.

Quiros, M., Gonzalez, R., Morales, P., 2012. A simple method for total quantification of mannoprotein content in real wine samples. Food Chem 134, 1205-1210.

Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñero, A., Ribas, J.C., 2015. A new wine *Torulaspota delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. Front. Microbiol. 6, 983.

Todd, B.E.N., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 2000. Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. Am.J.Enol.Vitic. 51, 65-72.

Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M.L., Álvarez, M.L., Ramírez, M., 2016. Using mixed inocula of new killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of traditional sparkling-wine. Food Microbiology 59, 150-160.