

## Explorando el potencial bioprotector de levaduras nativas no-*Saccharomyces* en la vinificación: resultados preliminares

### Exploring the bioprotective potential of native non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking: preliminary results

Valentina Martín<sup>1</sup>, Eduardo Boido<sup>1</sup>, Belén Listur<sup>1</sup>, Francisco Carrau<sup>1</sup> y Karina Medina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Enología y Biotecnología de las Fermentaciones, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay

**Resumen.** Bioprotección en vinificación se refiere al uso de levaduras para prevenir el desarrollo de microorganismos no deseados como de fenómenos que afectan la calidad del vino como puede ser la oxidación y el consecuente amarronamiento. Surge como alternativa al uso de sulfitos (SO<sub>2</sub>) en las etapas pre-fermentativas. El SO<sub>2</sub> tiene múltiples funciones, siendo las principales el poder antiséptico y antioxidante. Este trabajo se enfocó en el estudio y selección de levaduras nativas del tipo no-*Saccharomyces*, específicamente de los géneros *Metschnikowia* y *Pichia* con potencial actividad de bioprotección y biocontrol en los mostos de uva. Para estudiar dicho potencial, se realizaron pruebas a escala de laboratorio con cepas pertenecientes a las especies *Metschnikowia fructicola*, *Pichia kudriavzevii* y *Pichia membranifaciens*, evaluando su capacidad fermentativa y características sensoriales en mosto Chardonnay. Con las 10 levaduras seleccionadas se realizaron fermentaciones en mosto modelo frente a 2 controles con y sin agregado de SO<sub>2</sub>, a las cuales se les evaluó su capacidad bioprotectora frente a la flora nativa y sobre el amarronamiento de los vinos. Los resultados obtenidos muestran el potencial de la aplicación de levaduras nativas como alternativa al agregado de sulfitos.

**Abstract.** Bioprotection in winemaking refers to the use of yeasts to prevent both the development of undesirable microorganisms and phenomena that affect wine quality, such as oxidation and consequent browning. It emerges as an alternative to the use of sulfites (SO<sub>2</sub>) in pre-fermentative stages. SO<sub>2</sub> serves multiple functions, primarily as an antiseptic and antioxidant. This study focused on the investigation and selection of native non-*Saccharomyces* yeasts, specifically from the genera *Metschnikowia* and *Pichia*, with potential bioprotective and biocontrol activity in grape musts. To explore this potential, laboratory-scale tests were conducted with strains of *Metschnikowia fructicola*, *Pichia kudriavzevii*, and *Pichia membranifaciens*, evaluating their fermentative capacity and sensory characteristics in Chardonnay must. Fermentations were carried out with the 10 selected yeasts in a model must against 2 controls, with and without added SO<sub>2</sub>, to assess their bioprotective capacity against native flora and their effect on wine browning. The results demonstrate the potential of applying native yeasts as an alternative to the addition of sulfites.

#### 1. Introducción

En el mosto de uva coexisten microorganismos muy diversos que interactúan entre sí y con el medio ambiente. Al principio del proceso de vinificación, las levaduras no-*Saccharomyces* (NS) predominan en el mosto. Dentro de las NS el género más frecuente de encontrar en las uvas es *Hanseniaspora*. Algunas de las especies de este género

pueden tener un impacto negativo en las propiedades organolépticas de los vinos [1–3]. Durante la fase inicial del proceso, las poblaciones de levaduras NS evolucionan, principalmente a favor de las cepas fermentadoras, hasta que *Saccharomyces cerevisiae* se impone en el mosto para llevar a cabo la fermentación alcohólica, produciendo una concentración de etanol superior al 10% en volumen [3]. Para evitar pérdidas económicas debidas al deterioro

microbiano, los vinicultores añaden tradicionalmente dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>).

El SO<sub>2</sub> es el aditivo más utilizado en el proceso de vinificación, debido a sus múltiples propiedades antimicrobianas (frente a levaduras y bacterias), antioxidantes (frente al O<sub>2</sub>), antioxidásicas (oxidasas y polifenoloxidasas) y su bajo costo. En las bodegas, la adición de SO<sub>2</sub> al mosto de uva es la herramienta más común para protegerlo contra el pardeamiento enzimático. El mismo se utiliza en distintas etapas del proceso de vinificación, antes o después de la fermentación dependiendo de la uva que se utilice. Sin embargo, el SO<sub>2</sub> ha sido señalado por su potencial para causar malestar en consumidores con intolerancia al mismo, ya que aproximadamente el 1% de la población humana presenta sensibilidad frente a los sulfitos [4].

Por otro lado, los consumidores ahora tienen mayor conocimiento sobre los compuestos conservantes, deseando limitar su presencia en los alimentos que consumen [2]. En respuesta a estos problemas de salud, las regulaciones europeas, han reducido las dosis máximas permitidas de SO<sub>2</sub> en la vinificación, estableciendo un límite de 100 mg/L de SO<sub>2</sub> total para vinos tintos con menos de 2 g/L de azúcares [5].

Debido a estos cambios regulatorios y a su impacto negativo en la salud, la búsqueda de alternativas al SO<sub>2</sub> ha sido un desafío importante en enología en estos últimos años [1,6]. Se han propuesto varias soluciones, tanto químicas como físicas, para reducir el deterioro microbiano del mosto o vino [7].

Una alternativa a la utilización del SO<sub>2</sub> es la bioprotección, la cual consiste en la adición temprana de microorganismos en cantidad suficiente (principalmente levaduras no-*Saccharomyces*) directamente a la cosecha, en la prensa o durante la maceración para reemplazar la primera adición de SO<sub>2</sub> que se hace en el proceso de vinificación [8,9]. [10,11], [12].

Más recientemente, la bioprotección se ha propuesto también como una alternativa para proteger contra el pardeamiento enzimático [4–6,9,12–16].

Diferentes microorganismos han sido propuestos como bioprotectores, siendo *Metschnikowia pulcherrima* (*M. pulcherrima*) hasta ahora la especie de levadura más estudiada en cuanto a su capacidad de bioprotección del vino [9,17,18].

*Metschnikowia fructicola* (*M. fructicola*) y *Pichia kudriazevii* (*P. kudriazevii*) no han sido especies demasiado estudiadas con el fin de evaluar su capacidad de bioprotección, sin embargo, se les han estudiado ciertas características que las hacen buenas candidatas, ya que tienen bajo poder fermentativo, aportan buenas características sensoriales y tienen bajos requerimientos nutricionales [19].

Por lo anteriormente expuesto este trabajo tiene como objetivo comenzar a estudiar el efecto bioprotector de levaduras nativas de las especies *M. fructicola*, *P. kudriazevii* y *Pichia membranifaciens* (*P.*

*membranifaciens*) aisladas de uvas en diferentes vendimias.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Levaduras utilizadas

Se utilizaron levaduras pertenecientes a la colección de levaduras nativas del laboratorio de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones de Facultad de Química, Uruguay

Se comenzó con el estudio de 10 cepas *M. fructicola*, 4 cepas *P. kudriazevii* y 1 *P. membranifaciens* (Tabla 1)

**Tabla 1.** Códigos de las levaduras pertenecientes a la especie *M. fructicola* y *Pichia*.

Código	especie
00_25	<i>M. fructicola</i>
10_77	<i>M. fructicola</i>
11_56	<i>M. fructicola</i>
11_68	<i>M. fructicola</i>
11_191	<i>M. fructicola</i>
11_193	<i>M. fructicola</i>
11_23	<i>M. fructicola</i>
12_01	<i>M. fructicola</i>
12_01'	<i>M. fructicola</i>
12_01''	<i>M. fructicola</i>
11_23	<i>P. kudriazevii</i>
11_42	<i>P. kudriazevii</i>
11_47	<i>P. kudriazevii</i>
11_250	<i>P. membranifaciens</i>
12_102	<i>P. kudriazevii</i>

### 2.2. Screening de capacidad fermentativa y evaluación sensorial

Para esta primer actividad se realizaron microfermentaciones en mosto de uva blanca de la variedad Chardonnay. Estas microfermentaciones se realizaron en matraces de 125 mL, donde se fermentaron 60 mL de mosto inoculado con cada una de las levaduras a estudiar en una concentración de 1x10<sup>6</sup> cel/mL. El seguimiento de las fermentaciones se realizó mediante el seguimiento de la pérdida de peso por desprendimiento de CO<sub>2</sub>. La capacidad fermentativa se evaluó durante 6 días para cada una de las cepas estudiadas [20].

El screening de evaluación sensorial de los vinos obtenidos consistió en oler y descartar aquellas levaduras que presentaran defectos sensoriales [20]. Esta actividad se realizó con el panel interno semi-entrenado del Área Enología y Biotecnología de las Fermentaciones de Facultad de Química.

### 2.3. Capacidad bioprotectora

Para este punto se desarrolló un mosto modelo, a partir de un mosto de la variedad Ugni Blanc esterilizado con dicarbonato de dimetilo (DMDC) (Velcorin®), y la posterior inoculación de levaduras típicas de la flora nativa de las uvas como son *Hanseniaspora uvarum* (*H. uvarum*), *Rhodotorula glutinis* (*R. glutinis*) y *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) [2,8,21,22].

Las fermentaciones, se realizaron en tubos de 50 mL, en un volumen total de 30 mL a 15 °C (Puyo et al, 2023). Se inocularon tanto las levaduras del mosto modelo como la levadura a estudiar en el día 0 de forma simultánea. Las levaduras del mosto modelo se inocularon de acuerdo con el porcentaje reportado que se suele encontrar en las uvas, donde una población  $9 \times 10^4$  cel/mL era el 100%. *H. uvarum* se inoculó con un porcentaje del 60%, *R. glutinis* 5% y *S. cerevisiae* 1% respectivamente [23]. Por otro lado, el inóculo de las levaduras a estudiar se fue de  $1 \times 10^6$  cel/mL.

Para estudiar la actividad bioprotectora de las levaduras se realizó durante 48 hs el seguimiento de la población celular mediante siembra en superficie en medio selectivo WLN que permite diferenciar levaduras según la morfología de sus colonias [24]. Cada fermentación se realizó por triplicado, con dos controles, uno con el agregado de  $S_0_2$  como agente de control de microorganismos no deseados en una concentración de 30 mg  $S_0_2$ /L y otro sólo con las levaduras modelo (definido como el mosto modelo).

### 2.4. Protección frente al amarronamiento.

Para este punto, a las fermentaciones realizadas se las dejó durante 20 días con una agitación diaria. Se les determinó la intensidad del color amarillo mediante medida de absorbancia a 420 nm (Bustamante et al., 2024) y las coordenadas de color mediante MSCV®[25,26]. Cada fermentación se realizó por triplicado.

### 2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los diferentes ensayos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA). La diferencia entre las media fue determinada mediante Test de Tuckey o LSD en *Infostat* (2008)

## 3. Resultados y discusión

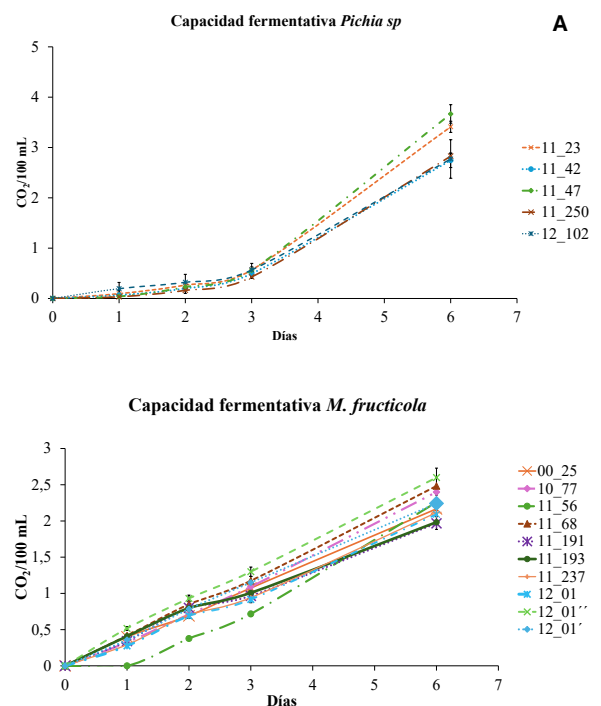
### 3.1. Screening sobre capacidad fermentativa y sensorial

A partir de las fermentaciones realizadas se pudo determinar la capacidad de fermentación de las distintas levaduras estudiadas.

Se pudo observar tanto para las levaduras del género *Pichia* (Figura 1A) como para las de la especie *M. fruticola* (Figura 1B), que no hubo diferencias en cuanto a su capacidad fermentativa para las diferentes cepas.

Estas levaduras con fin bioprotector serán aplicadas en la maceración prefermentativa durante unas horas [1], por lo que, es importante que no comiencen el proceso fermentativo [18], y que de esta manera no participen del proceso fermentativo. En las figuras 1A y 1B, podemos observar las diferencias en la cinética de fermentaciones entre las levaduras *M. fruticola* y las *Pichia*, donde las levaduras del género *Pichia* tienen una fase “lag” más larga, de hasta 2 días. Estos resultados indican que estas levaduras tienen el potencial de ser aplicadas en las etapas prefermentativas de la vinificación ya que no intervendrían en el desarrollo de la fermentación de la levadura que se vaya a inocular [18].

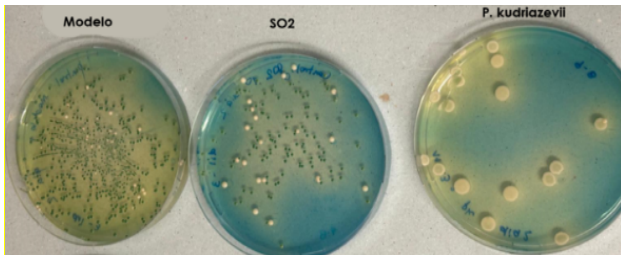
Respecto a la selección de las levaduras, a partir de la producción de defectos aromáticos, se seleccionaron 5 cepas *M. fruticola* (00\_25, 10\_77, 11\_68, 12\_01 y 12\_01'') y no se descartó ninguna del género *Pichia*.



**Figura 1.** Seguimiento de la fermentación por pérdida de peso debida a liberación de CO<sub>2</sub> para las cepas de *Pichia* sp. (A) y *M. fruticola* (B).

### 3.2. Capacidad bioprotectora.

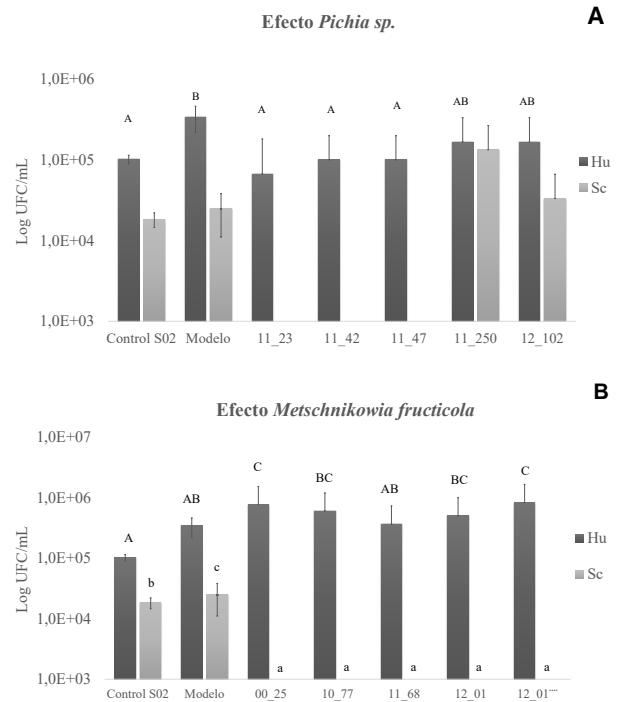
A partir de las levaduras seleccionadas se realizaron las fermentaciones en mosto con el agregado de levaduras modelo para simular un mosto natural en el que pudiesen actuar las potenciales bioprotectoras [2,18]. Durante 48 hs se realizaron siembras en placas con un medio que permite diferenciar levaduras en base a su morfología (Figura 2) y se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) para cada tratamiento al día 0, a las 24 hs y a las 48 hs.



**Figura 2** Placas de medio WLN, donde podemos ver las poblaciones de la fermentación modelo, con el agregado de SO<sub>2</sub> y la última placa donde se inoculó una cepa de *P. kudriazevii*.

En cuanto al crecimiento de la levadura nativa *H. uvarum*, se vio una tendencia a la disminución de su población respecto a los controles, Esto se vio fundamentalmente reflejado en los tratamientos con las levaduras del género *Pichia*, destacándose las cepas 11\_23, 11\_42 y 11\_47 (Figura 3A). Estos resultados confirman los previamente reportados por Englezos y colaboradores [2], donde pudieron ver el potencial *Pichia kluyveri* para disminuir la carga de población nativa de las uvas.

Por el contrario, para el caso del agregado de las levaduras *M. fructicola*, no pudo verse un efecto de disminución de la población de levaduras nativas *H. uvarum*. Es más, en algunos casos la población de *H. uvarum*, fue superior al control modelo (sin agregado de SO<sub>2</sub>) y en un caso, el de la cepa 11\_68 se observó que no presentó diferencia significativa respecto al control con SO<sub>2</sub> (Figura 3B). Esto va en disonancia con lo que esperábamos encontrar dado lo reportado para otras levadura del género *Metschnikowia* como es *M. pulcherrima*, en cuanto a su capacidad biocontroladora [4,9,17,18,27].



**Figura 3.** Crecimiento de UFC a las 48 hs de fermentación de las levaduras nativas inoculadas en el mosto (*Hanseniaspora uvarum* y *Saccharomyces cerevisiae*) en cada uno de los tratamientos, Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas de levadura según teste LSD de Fisher.

Para el caso de las cepas *S. cerevisiae* del mosto modelo, las mismas no pudieron crecer en presencia de ninguna de las cepas de *M. fructicola* (Figura 3B). Sin embargo, cuando la levadura inoculada fue *Pichia*, se observaron diferencias entre las cepas estudiadas; en dos de los tratamientos con *Pichia*, *S. cerevisiae* pudo crecer, *P. kudriazevii* (12\_102) y el tratamiento con *P. membranifaciens* (11\_250) (Figura 3A)

De acuerdo con los resultados obtenidos, el efecto bioprotector fue mayor cuando se utilizan levaduras del género *Pichia*

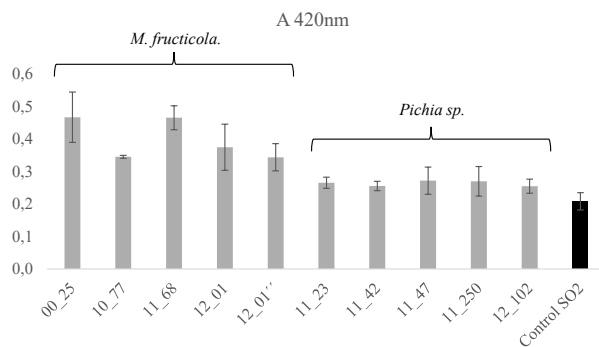
### 3.3. Evaluación del amarronamiento a un mosto de uvas blancas

Para evaluar el efecto sobre el amarronamiento de los vinos obtenidos se midieron parámetros cromatográficos mediante las coordenadas de color con el software MSCV® y se midió la intensidad del color amarillo a 420 nm de absorbancia [13]. De acuerdo con las medidas de absorbancia a 420 nm (Figura 4), se puede ver que las levaduras con mayor capacidad de detener el amarronamiento fueron las *Pichia*, sin presentar diferencias entre ellas ni frente al control con agregado de SO<sub>2</sub>. Estas cepas a su vez coinciden con las que mostraron mayor efecto bioprotector.

En cuanto a la especie *M. fructicola*, dos de las cepas estudiadas no mostraron diferencias significativas frente al control con agregado de SO<sub>2</sub>, esto demuestra el potencial de estas levaduras (10\_77 y 12\_01'') junto a las *Pichia* de

actuar como agente protector frente a amarronamiento de los vinos a la par del SO<sub>2</sub>.

El mecanismo de acción por el que actúan estas levaduras para proteger frente al amarronamiento de los vinos no fue estudiado en esta oportunidad, pero lo que se ha propuesto y estudiado hasta el momento es que actúan debido a que tienen una alta tasa de consumo de oxígeno, lo que hace que disminuyan el oxígeno disponible para procesos de oxidación [4,13]



**Figura 4.** Absorbancia a 420 nm para cada tratamiento y las cepas que mostraron aumento significativo de amarronamiento con respecto al control con SO<sub>2</sub> se indican con un asterisco según test Tuckey.

#### 4. Conclusiones

Es posible encontrar alternativas naturales para disminuir el uso de conservantes, como el SO<sub>2</sub> en la industria vitivinícola.

En cuanto al control de levaduras nativas del viñedo las levaduras estudiadas del género *Pichia* mostraron un mayor potencial de biocontrol frente a las levaduras estudiadas de la especie *M. fructicola*. A esto se suma la larga fase “lag” de las cepas *Pichia*, que también es algo deseado, ya que impedirá que estas interfieran en el proceso fermentativo de la levadura inoculada.

A su vez, las levaduras del género *Pichia* mostraron un mayor potencial de prevención del amarronamiento en los vinos terminados.

Más estudios serán necesarios para profundizar en los hallazgos obtenidos, llevando estos resultados a un escalado piloto con el fin de simular las condiciones reales de bodega. Además, será necesario realizar las pruebas utilizando mosto fresco no esterilizado para evaluar si las tendencias observadas en estos resultados se mantienen en las condiciones reales de producción.

#### 5. Referencias

1. H. Alexandre, M. Puyo, R. Tourdot-Maréchal, H. Alexandre, M. Puyo, and R. Tourdot-Maréchal, *New Advances in Saccharomyces* (2023).
2. V. Englezos, P. Di Gianvito, L. Peyer, S. Giacosa, S. R. Segade, N. Edwards, L. Rolle, K. Rantsiou, and L. Cocolin, *Am J Enol Vitic* 73, 294 (2022).

3. L. F. Bisson and A. Maynard, *Am J Enol Vitic* 50, 107 (1999).
4. S. Windholtz, C. Nioi, J. Coulon, and I. Masneuf-Pomarede, *Int J Food Microbiol* 405, 110338 (2023).
5. P. Di Gianvito, V. Englezos, K. Rantsiou, and L. Cocolin, *Int J Food Microbiol* 364, (2022).
6. A. Morata, I. Loira, C. González, and C. Escott, *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4571 26, 4571 (2021).
7. M. T. Lisanti, G. Blaiotta, C. Nioi, and L. Moio, *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18, 455 (2019).
8. M. Lebleux, H. Alexandre, R. Romanet, J. Ballester, V. David-Vaizant, M. Adrian, R. Tourdot-Maréchal, and C. Roullier-Gall, *Food Research International* 173, 113383 (2023).
9. S. Simonin, C. Roullier-Gall, J. Ballester, P. Schmitt-Kopplin, B. Quintanilla-Casas, S. Vichi, D. Peyron, H. Alexandre, and R. Tourdot-Maréchal, *Front Microbiol* 11, 548771 (2020).
10. H. Alexandre, *Microorganisms* 8, 787 (2020).
11. A. Morata, I. Loira, C. Escott, J. M. del Fresno, M. A. Bañuelos, and J. A. Suárez-Lepe, *Fermentation* 5, (2019).
12. S. Windholtz, E. Vinsonneau, L. Farris, C. Thibon, and I. Masneuf-Pomarede, *Front Microbiol* 12, (2021).
13. M. Bustamante, P. Giménez, A. Just-Borras, I. Solé-Clua, J. Gombau, J. M. Heras, N. Sieczkowski, M. Gil, J. M. Canals, and F. Zamora, *OENO One* 58, 1 (2024).
14. R. Escribano-Viana, L. González-Arenzana, P. Garijo, L. Fernández, R. López, P. Santamaría, and A. R. Gutiérrez, *Fermentation* 2022, Vol. 8, Page 337 8, 337 (2022).
15. P. Rubio-Bretón, A. Gonzalo-Diago, M. Iribarren, T. Garde-Cerdán, and E. P. Pérez-Álvarez, *LWT* 98, 458 (2018).
16. S. Simonin, H. Alexandre, M. Nikolantonaki, C. Coelho, and R. Tourdot-Maréchal, *Food Research International* 107, 451 (2018).
17. P. Giménez, A. Just-Borras, P. Pons, J. Gombau, J. M. Heras, N. Sieczkowski, J. M. Canals, and F. Zamora, *European Food Research and Technology* 249, 1491 (2023).
18. M. Puyo, S. Simonin, B. Bach, G. Klein, H. Alexandre, and R. Tourdot-Maréchal, *Front Microbiol* 14, 1252973 (2023).
19. N. Sieczkowski and M. Bastien, *Bioprotección: Qué Soluciones Naturales En Albariño y Tannat* (n.d.).
20. V. Martín, Ph. D. Thesis in Chemistry. Uruguay, Montevideo: Universidad de La Republica (2016).

21. K. Medina, V. Martin, E. Boido, and F. Carrau, in *Red Wine Technology* (Academic Press, 2018), pp. 69–83.
22. B. Padilla, L. Zulian, À. Ferreres, R. Pastor, B. Esteve-Zarzoso, G. Beltran, and A. Mas, *Front Microbiol* 8, 267961 (2017).
23. B. Padilla, J. V Gil, and P. Manzanares, *Front Microbiol* 7, 411 (2016).
24. C. Pallmann, J. Brown, T. Olineka, L. Cocolin, D. Mills, and L. Bisson, *American Journal of Alternative Agriculture* 3, 198 (2001).
25. M. Monagas, B. Bartolomé, and C. Gómez-Cordovés, *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 85 (2005).
26. A. I. , Negueruela, J. F. Echávarri, and F. Ayala, *Caractéristiques Chromatiques* ( Paris, 2001).
27. L. Chacon-Rodriguez, C. M. L. Joseph, B. Nazaris, J. Coulon, S. Richardson, and D. A. Dycus, *Am J Enol Vitic* 4, 82 (2020).