

NUEVO PROCESO DE SELECCIÓN DE LEVADURAS PARA LA LIBERACIÓN DEL AROMA VARIETAL DE SAUVIGNON BLANC

Charlotte Augustin¹, Stéphane Bonhomme², Marie-Laure Murat², Isabelle Masneuf³

¹Laffort Œnologie, BP 17, 33015 Bordeaux Cedex. Mail : caugustin@sarco.fr

²SARCO, BP 40, 33015 Bordeaux Cedex. Société d'Application, de Recherche et de Conseil Œnologique, filial para la investigación de la sociedad Laffort Œnologie

³ENITA de Bordeaux, 1 cours du Général de Gaulle, CS 40201, 33175 Gradignan cedex

Introducción

El aroma varietal del Sauvignon blanc ha sido objeto de numerosos trabajos de investigación durante varios años; tres compuestos aromáticos pertenecientes al grupo de los tioles volátiles han sido identificados como los que contribuyen de forma mayoritaria al aroma varietal del Sauvignon blanc. Se trata de la 4-metil-4-mercaptopentan-2-ona (4MMP), del 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) y del acetato de 3-mercaptohexanol (A3MH), responsables de las notas de boj (4MMP, A3MH) y de retama (4MMP), de pomelo (3MH) y de fruta de la pasión (3MH, A3MH) en los vinos obtenidos de esta cepa. Estos compuestos se encuentran también presentes en los vinos de otras cepas blancas tales como Gewürztraminer, Riesling, Colombard, Petit Manseng (Tominaga *et al.*, 2000a) y también en los vinos rosados obtenidos de las cepas tintas Cabernet Sauvignon y Merlot (Murat *et al.*, 2001a), así como de Grenache y Syrah (Cacho, 2004; Murat, 2005). En los mostos existen dos compuestos azufrados (la 4MMP y el 3MH) en forma de precursores no volátiles S-conjugados de la cisteína (Tominaga *et al.*, 1995, 1998a ; Murat *et al.*, 2001b). Los tioles volátiles son liberados durante la fermentación alcohólica a partir del correspondiente S-conjugado de la cisteína, por acción de las levaduras (Tominaga *et al.*, 1998a). Sin embargo el mecanismo de transformación del precursor cisteínico sigue sin conocerse. No todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tienen la misma capacidad para liberar tioles (Murat *et al.*, 2001c; Howell *et al.*, 2004). Del mismo modo, el contenido de aromas fermentativos de los vinos (ésteres, alcoholes superiores producidos durante la fermentación alcohólica) varía en función de la cepa utilizada (Rankine, 1967 ; Usseglio Tomasset, 1967 ; Suomalainen, 1971).

El mayor conocimiento de los aromas de los vinos Sauvignon blanc y la aplicación de una técnica tradicional de cruzamiento han permitido desarrollar nuevos métodos de selección y de mejora de cepas de levaduras enológicas más exactos y eficaces. El laboratorio SARCO y la Faculté d'Œnologie de Bordeaux han utilizado el **breeding** : esta técnica consiste en cruzar dos levaduras, con el objetivo de obtener una levadura « hija » que posea las capacidades de sus dos « padres » (ver Figura 1). Por tanto, el cruce de una levadura que posee unas capacidades fermentativas demostradas (cinética fermentativa y tolerancia al alcohol, baja producción de acidez volátil y de compuestos azufrados) con una levadura conocida por su capacidad para producir vinos Sauvignon blanc típicos y aromáticos, ha llevado a la obtención y la comercialización de una nueva cepa Z¹.

¹ De acuerdo con la deontología de Infowine, los nombres comerciales han sido suprimidos de este artículo

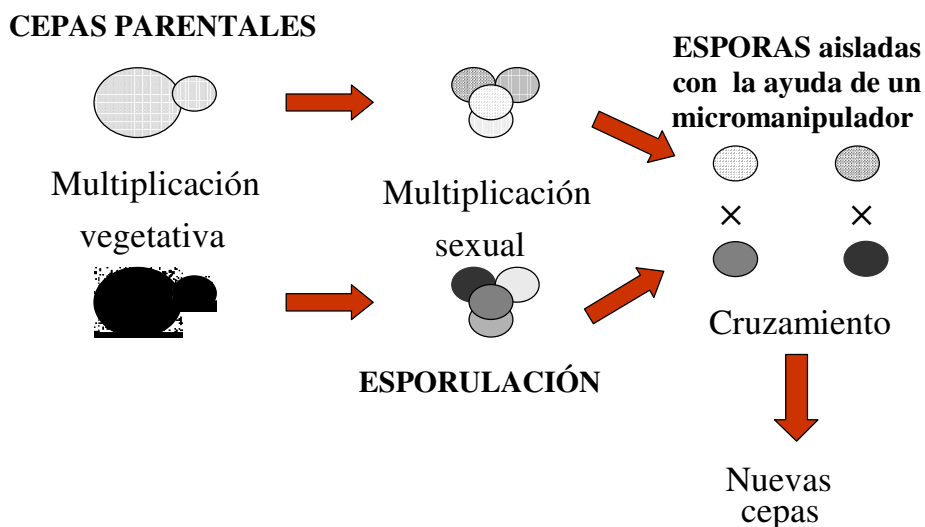


Figura 1 : Esquema de obtención de nuevas cepas de levaduras enológicas por el método de los cruzamientos o « breeding ». Las cepas parentales pueden pertenecer a la misma especie (*S. cerevisiae* o *S. uvarum*) o a dos especies diferentes (*S. cerevisiae* y *S. uvarum*).

El objetivo de este trabajo era estudiar el interés de la cepa Z y comparar su comportamiento fermentativo, su capacidad para liberar los compuestos tioles aromáticos y las características sensoriales finales del vino obtenido con los de otras cepas.

Material y métodos

Cepas de levadura utilizadas

El ensayo ha considerado seis cepas de levaduras secas activas: Y, Z, y cinco cepas comerciales recomendadas principalmente para la elaboración de vinos Sauvignon blanc típicos y aromáticos, identificadas con las letras A,B,C,D y E

Protocolo del ensayo

El ensayo fue realizado en 2005, en el centro experimental de Laffort (Enologie). El mosto provenía de uvas Sauvignon blanc de la región de Burdeos. En el momento de la recepción, la vendimia fue prensada, enzimada, sulfitada con 5 g/hL y estabilizada por frío (48h a 12°C). La turbidez del mosto fue ajustada a 50 NTU. Los depósitos utilizados para los ensayos tenían una capacidad de 200 litros; las seis modalidades se efectuaron por duplicado. Todas las operaciones prefermentativas fueron realizadas al abrigo del aire (inertización del material con CO₂ manteniéndolo hasta el inicio de la FA). La inoculación con 20 g/hL fue realizada el mismo día del encubado. La fermentación fue conducida a 16°C. Los vinos se sulfitaron una semana después del final de la FA ; a continuación fueron conservados sobre las lías finas durante dos meses, con dos batonnages por semana.

Tabla 1 : Características del mosto

	Azúcares Reductores (g/L)	Acidez Total (g/L H ₂ SO ₄)	pH	Turbidez (NTU)	Nitrógeno Asimilable antes de la corrección (mg N/L)
Mosto	213	3,8	3,24	120	101

Seguimiento de la fermentación alcohólica

La densidad y la temperatura se midieron diariamente a lo largo de toda la fermentación. Se realizó un control de implantación de la levadura cuando se alcanzó una densidad de aproximadamente 1,040. Para ello se tomó una muestra de 100 µL de mosto del depósito y se sembró en placa de Petri. El ADN de la biomasa total fue extraído y sometido a un análisis genético por PCR (MiniCycler™, MJ Research), contemporáneamente al ADN de las LSA inoculadas. Una electroforesis permitió comparar los perfiles obtenidos para la biomasa total con los de las LSA y verificar de este modo la buena implantación de éstas.

Análisis químico y sensorial de los vinos

Los análisis convencionales y la cuantificación de los aromas fueron realizados en el vino acabado después del sulfitado. El contenido de tioles volátiles de los vinos fue determinado según el método descrito por Tominaga *et al.* (1998b) modificado por el mismo autor (2000b). Los contenidos de acetato de isoamil (AI), de feniletil acetato (APE) y de alcohol 2-feniletílico (PE) fueron determinados según el método descrito por Bertrand *et al.* (1978).

Se realizó una cata, a ciegas, con un jurado de 15 catadores profesionales, acostumbrados a catar vinos Sauvignon blanc. Se realizó un primer test de clasificación (sensación global : color, nariz, boca) con los 6 vinos (las repeticiones de cada cepa fueron ensambladas). Por otra parte, tres de estas muestras fueron catadas de nuevo, por separado, y se puntuaron del 1 al 5 (siendo 5 la puntuación máxima) 6 descriptores: intensidad olfativa, tipicidad del Sauvignon blanc, notas de boj (descriptor de la 4MMP y del A3MH) y pomelo (descriptor del 3MH) en nariz, redondez y persistencia en boca. Las tres muestras elegidas para estos test descriptivos fueron aquellas que presentaron los contenidos más altos de 4MMP y de A3MH en el análisis; se efectuó también un test de preferencia con estos tres vinos.

Análisis estadístico de los resultados

Se utilizó el software de tratamiento estadístico Stata 9.0 para realizar los análisis de la varianza y los test de Scheffer (cuantificación de los tioles volátiles y de los aromas fermentativos). Se aplicaron los test de Kramer y de Friedmann a los test de preferencia de la cata.

Resultados

Controles de implantación

Los controles de implantación de la levadura han sido positivos para todas las modalidades (resultados no presentados). Esto permite atribuir las diferencias en los vinos acabados únicamente a las levaduras, ya que todas las demás condiciones eran iguales.

Cinética fermentativa

La fermentación duró para todas las cepas 10 días (resultados no presentados). Sólo una cepa (cepa D) mostró una fase de latencia superior a 48 horas y acabó dos días más tarde (resultados no presentados).

Análisis convencionales de los vinos

No se evidenció ninguna diferencia significativa con respecto a los parámetros analizados. La tabla 2 presenta la media de los valores obtenidos para los diferentes vinos.

*Tabla 2 : Características de los vinos acabados (valores medios * de las 14 modalidades)*

	G.A.V. (%vol)	Azúcares Reductores (g/L)	Acidez Total (g/L H ₂ SO ₄)	Acidez Volátil (g/L H ₂ SO ₄)	pH	SO ₂ Total (mg/L)
Vino	13	1,24	4,9	0,19	3,10	53

* No se ha evidenciado ninguna diferencia significativa entre las cepas, se muestra la media de los valores obtenidos con los 14 vinos.

Cuantificación de los tioles volátiles

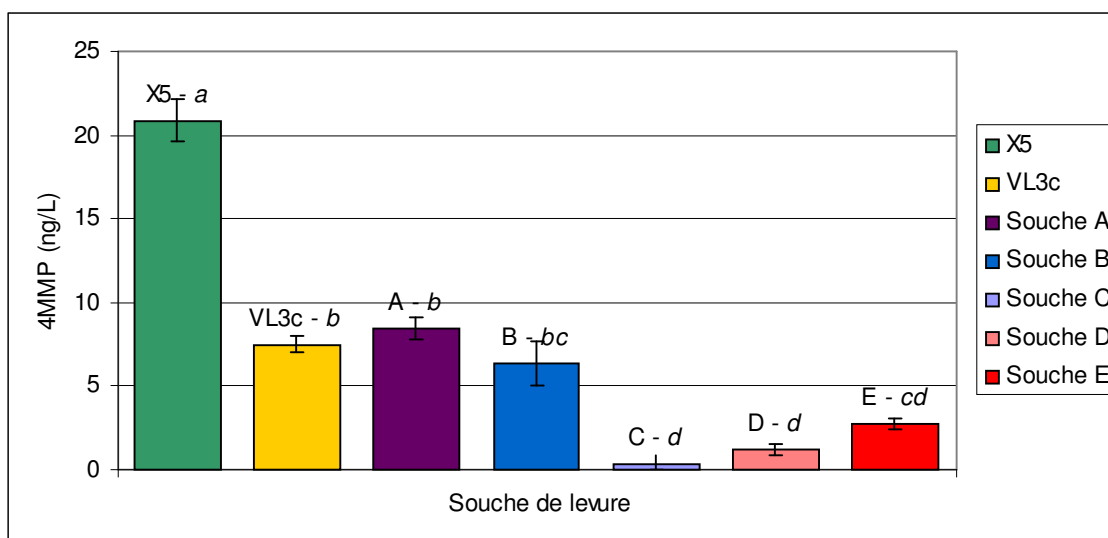
Los contenidos de 4MMP de los vinos son estadística y significativamente diferentes (Figura 2 y Tabla 3).

Tabla 3 : Contenido de Tioles Volátiles e Índice aromático * de los vinos

Ensayo 2005	4MMP (ng/L) (IA)	3MH (ng/L) (IA)	A3MH (ng/L) (IA)
Z	20,9 (26,1) ^a	274 (4,6) ^a	58 (14,5) ^a
Y	7,5 (9,4) ^b	303 (5,0) ^a	56 (13,9) ^a
Cepa A	8,5 (10,6) ^b	285 (4,7) ^a	53 (13,2) ^a
Cepa B	6,3 (7,9) ^{bc}	220 (3,7) ^a	41 (10,1) ^a
Cepa C	0,4 (0,5) ^d	202 (3,4) ^a	47 (11,7) ^a
Cepa D	1,2 (1,5) ^d	188 (3,1) ^a	27 (6,6) ^a
Cepa E	2,8 (3,4) ^{cd}	212 (3,5) ^a	43 (10,8) ^a

Los valores presentados son la media de las dos modalidades. Las letras ^{a, b, c, d} indican los valores estadística y significativamente diferentes (test de Scheffer).

*El Índice Aromático (IA) permite evaluar el impacto aromático de un compuesto: es la relación entre la concentración del compuesto y el umbral de percepción específico de ese compuesto. Un índice aromático mayor que 1 significa la participación de ese compuesto al aroma del vino.



Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar para cada duplicado y las letras a, b, c, d indican los valores estadística y significativamente diferentes (test de Scheffer).

Figura 2 : Contenido de 4MMP (ng/L) de los vinos obtenidos con las diferentes cepas de levadura

Las estadísticas realizadas considerando los duplicados de cada una de las modalidades permiten evidenciar que la cepa Z libera una concentración significativamente mayor de 4MMP respecto a todas las demás cepas de levadura estudiadas (Figura 2). Es interesante observar que esta cepa, que resulta del **breeding**, libera mejor la 4MMP respecto a las cepas seleccionadas hasta el momento con este fin.

Las cepas A, Y e B respectivamente presentan una menor capacidad, en orden decreciente, para liberar esta molécula.

Por lo que respecta la liberación del 3MH y su transformación en acetato, se han podido evidenciar algunas diferencias significativas entre las cepas estudiadas (Tabla 3). Los contenidos de estos dos compuestos en los vinos de esta campaña son por otra parte bastante bajos. Se puede observar de todas formas que los vinos que han resultado de las cepas Z, Y e A respectivamente son los que presentan concentraciones más elevadas de A3MH (fruta de la pasión).

Contenido de aromas fermentativos

En las condiciones consideradas en este ensayo, no se observan diferencias entre los contenidos de AI, APE y PE de los vinos obtenidos a partir de las cepas estudiadas (ver Tabla 4). Son totalmente comparables por lo que se refiere a la producción de ésteres.

Hay que apuntar que, en general, la fuerte producción de ésteres no es un carácter necesariamente buscado entre los objetivos de un vino Sauvignon blanc afrutado y típico. Una producción moderada (como en el caso de este ensayo) puede, por el contrario, aportar una cierta complejidad.

Tabla 4 : Contenido de Ésteres fermentativos y de Alcohol 2-FenilEtilico, e Índice Aromático de los vinos

Ensayo 2005	AI (mg/L) (IA)	APE (mg/L) (IA)	PE (mg/L) (IA)
Z	1,1 (5,3) ^{bc}	0,8 (2,5) ^{bc}	37 (74,2) ^a
Y	0,9 (4,3) ^{bc}	0,7 (2,4) ^{bc}	43 (66,7) ^a
Cepa A	1,1 (5,5) ^{ab}	0,8 (2,6) ^{ab}	42 (84,7) ^a
Cepa B	0,8 (3,9) ^c	0,7 (2,4) ^{bc}	50 (100,2) ^a
Cepa C	0,9 (4,3) ^{bc}	0,7 (2,4) ^{bc}	37 (74,1) ^a
Cepa D	0,8 (3,9) ^{bc}	0,6 (1,9) ^{bc}	38 (75,0) ^a
Cepa E	0,8 (3,8) ^c	0,5 (1,8) ^c	46 (92,0) ^a

Los valores mostrados son la media de las dos modalidades, las letras ^{a, b, c} indican los valores estadística y significativamente diferentes (test de Scheffer).

Análisis sensorial

El test de preferencia de las 6 muestras es significativo al nivel de 0,1 % (test de Friedmann). Resultando que el vino obtenido a partir de la cepa Z es claramente preferido (significatividad del 1%, test de Kramer). A continuación son preferidos en este test los vinos fermentados con las cepas A e Y, muy próximos entre ellos. Últimos se encuentran los vinos fermentados con las cepas B, C, D y E. Esta clasificación de los vinos presenta una elevada reproducibilidad: los catadores a menudo han puntuado los vinos siguiendo el mismo orden que la clasificación general. Por ejemplo, el vino obtenido con la cepa Z se ha clasificado primero 10 veces sobre 15, y el vino de la cepa C se ha clasificado 11 veces en la quinta posición, que corresponde a su clasificación final.

Existe además una correlación estadísticamente significativa entre la suma de los índices aromáticos de la 4MMP y del A3MH y la posición alcanzada en la cata ($R^2 = 0,7673$ significatividad del 2 %, ver Figura 3).

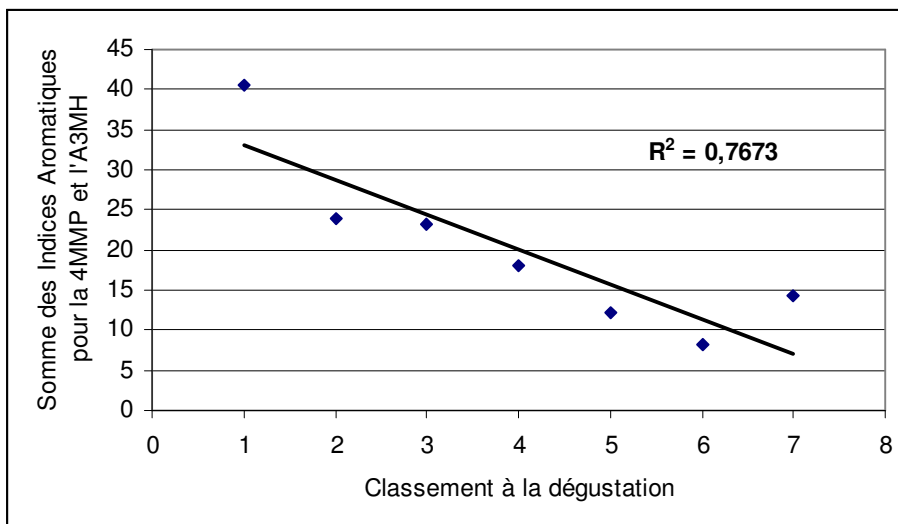
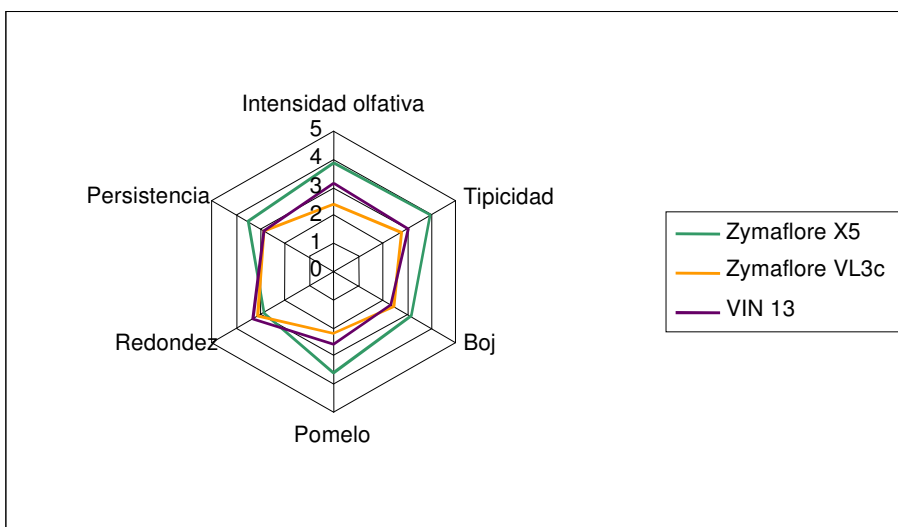


Figura 3 : Relación entre la suma de los índices aromáticos de la 4MMP y del A3MH de los vinos y la clasificación de los vinos durante la cata. Correlación significativa del 2%.

El test descriptivo fue realizado con los tres vinos que presentaban los contenidos de 4MMP y de A3MH más elevados; se trata de los vinos obtenidos con las cepas Z e Y y con la cepa A. Se observa también que estos vinos son los que se han clasificado mejor en el test de preferencia. La figura 4 muestra los resultados de este análisis descriptivo. El vino fermentado con la cepa Z se ha clasificado como el más típico y olfativamente el más intenso, con unas notas muy marcadas de boj y de pomelo. Los vinos obtenidos con las cepas A e Y se muestran muy próximos en el análisis descriptivo, sin embargo la clasificación de este test triangular es neta (significatividad del 1%, test de Kramer): el vino obtenido con la cepa Y es preferido respecto al vino obtenido con la cepa A. Los comentarios sobre las sensaciones en boca a menudo mencionan el afrutado y la elegancia del vino obtenido con la cepa Y, así como de la redondez del vino producido con la cepa A. El vino obtenido con la cepa Z se vuelve a clasificar en primer lugar, y viene descrito como bien equilibrado, vivo y largo de boca.



La clasificación de este test triangular ha sido : 1° : vino obtenido con la X5 ; 2° : vino obtenido con la VL3c ; 3° : vino obtenido con la cepa A (significatividad del 1%, test de Kramer).

Figura 4 : Análisis sensorial descriptivo de los tres vinos con mayores concentraciones de 4MMP (15 catadores)

Conclusión

Al final de este ensayo comparativo, se observa que, a pesar de que todas las cepas han demostrado un comportamiento fermentativo satisfactorio (fermentaciones acabadas, acidez volátil limitada, vinos sin defectos), no son equivalentes desde el punto de vista de las características organolépticas de los vinos obtenidos. La cata ha tenido en cuenta no sólo el criterio aromático sino también la sensación y la persistencia en boca. La cuantificación y la apreciación diferente de estos vinos obtenidos a partir del mismo mosto han evidenciado, una vez más, el papel de la cepa de levadura en la liberación de los tioles volátiles.

La cepa Z destaca netamente durante las catas y los análisis de los vinos (tipicidad, complejidad, persistencia y vivacidad). Esta cepa permite obtener unos vinos con unos contenidos importantes de 4MMP y de A3MH, compuestos bien correlacionados con la apreciación del vino durante la cata. Esta capacidad para liberar la 4MMP confirma los resultados de los ensayos realizados en 2004 en el centro experimental, que no han sido presentados al carecer de análisis estadístico, pero en los que la cepa Z ya se desmarcaba. Por otra parte, el vino que ha resultado de la cepa Y ha sido también apreciado y destacado durante la cata (afrutado y elegante); del mismo modo que el vino de la cepa A, en menor medida (redondez y persistencia). Estas cepas presentan también una buena capacidad para liberar tioles volátiles, con una mayor producción de ésteres sin embargo por parte de la cepa A. Se observa que las diferencias en la tipicidad de los vinos obtenidos con cada una de las levaduras pueden ser valorizadas durante el assemblage.

El **breeding**, aplicada como novedosa técnica de selección de levaduras, ha demostrado en este caso su interés: la cepa Z es ya muy apreciada por numerosos enólogos para la fermentación de mostos Sauvignon blanc, los ensayos que hemos descrito aportan algunos elementos que ayudan a explicar el porque. El **breeding** es también el origen de la selección de una nueva cepa para la elaboración de vinos tintos afrutados. Sus resultados serán objeto de una próxima publicación.

Bibliografía

- Bertrand A., Marly-Brugerolle C., Sarre C., 1978. Influence du débouillage des moûts et du sulfitage sur les teneurs en substances volatiles des vins et eaux-de-vie. Com. Vigne Vin, **12**, 35-48.
- Cacho J., 2004. Relation entre l'analyse physicochimique et sensorielle des vins rosés. Rencontres Internationales du Vin Rosé, 12-13.
- Cotrell T.H.E. MC and Lellan M.R., 1986. The effect of fermentation temperature on chemical and sensory characteristics of wines from seven white grape cultivars grown in New York State. Am. J. Enol. Vitic. **37**, 3, 190-194.
- Howell K.S., Swiegers J.H., Eelsey G.M., Siebert T.E., Bartowsky E.J., Flette G.H., Pretorius I.S., De Barros Lopes M.A., 2004. Variation in 4-mercapto-4-methylpentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. FEMS Microbiol. Letters. **240**, 125-129.
- Killiam E. and Ough C.S., 1979. Fermentation esters- formation and retention as affected by fermentation temperature. Am. J. Enol. Vitic. **30**, 4, 301-305.
- Murat M.L., Tominaga T., Dubourdieu D., 2001a. Mise en évidence de composés clés dans l'arôme des vins rosés et clarets de Bordeaux. J. Int. Sci. Vigne Vin. **35**, n°2, 99-105.
- Murat M.L., Tominaga T., Dubourdieu D., 2001b. Assessing the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce rosé wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. J. Agric. Food Chem. **49**, 11, 5412-5417.
- Murat M.L., Masneuf I., Darriet P., Lavigne V., Tominaga T., Dubourdieu D., 2001c. Effect of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon blanc wines. Am. J. Enol. Vitic. Vol. **53**, n°2, 136-139.
- Murat M.L., 2005. Acquisitions récentes sur l'arôme des vins rosés. Partie 1 : Caractérisation de l'arôme, étude du potentiel aromatique des raisins et des moûts. Revue des Œnologues, n°**117**, 27-30.
- Rankine B.C., 1967. Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste and thresholds. J. Sci. Food Agric. **18**, 181-198.
- Suomalainen H., 1971. Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. J. Inst. Brew. **77**, 164-177.
- Tominaga T., Masneuf I., Dubourdieu D., 1995. A S-cysteine conjugate, precursor of aroma of white sauvignon. J. Int. Sci. Vigne Vin. **29**, 227-232.
- Tominaga T., Peyrot des Gachon C., Dubourdieu D., 1998a. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. J. Agric. Food Chem. **46**, 5215-5219.

- Tominaga T., Murat M.L., Dubourdieu D., 1998b. Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. J. Agric. Food Chem., **46**, 1044-1048.
- Tominaga T., Baltenweck-Guyot R., Peyrot des Gachon C., Dubourdieu D., 2000a. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. Am. J. Enol. Vitic. **51**, n°2, 178-181.
- Tominaga T., Blanchard L., Darriet P., Dubourdieu D., 2000b. A powerful aromatic volatile thiols, 2-furanmethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. J. Agric. Food Chem., **48**, 1799-1802.
- Torija M.J., Beltran G., Novo M., Poblet M., Guillamon J.M., Mas A., Rozès N., 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. Int. J. Food Microbiol. **85**, 127-136.
- Usseglio, Tomasset L., 1967. L'alcol b-feniletílico nei vini. Riv. Viticol. Enol. **20**, 10-35.