

Estrategias fermentativas

# Experiencias prácticas en bioacidificación con *Lachancea thermotolerans* de mostos tintos

POR VICTOR PUENTE<sup>1</sup>, JUDITH LEÓN<sup>2</sup>, MAITE PÉREZ<sup>2</sup>, SIMÓN ARINA<sup>2</sup> Y ANA HRANILOVIC<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laffort España

<sup>2</sup>Bodegas Baigorri. Rioja

<sup>3</sup>Laffort France

Aunque *Saccharomyces cerevisiae* es el principal microorganismo implicado en la elaboración de un vino, ésta puede compartir el nicho ecológico con otras levaduras, géneros comúnmente denominados no-*Saccharomyces*, que se encuentran en el mosto de uva y que contribuyen durante las primeras etapas de fermentación a las características organolépticas del vino final

Consideradas inicialmente como organismos de contaminación, las levaduras no-*Saccharomyces* son reconocidas actualmente como poderosas herramientas biotecnológicas para objetivos específicos de elaboración del vino, tales como potenciadores de la complejidad aromática y de las sensaciones en boca, o más recientemente, como bioprotección (Jolly *et al.*, 2014, Windholtz *et al.*, 2023). Otra aplicación cada vez más importante de las levaduras no-*Saccharomyces* en el contexto del cambio climático es la acidificación biológica o bioacidificación. *Lachancea thermotolerans*, anteriormente conocida como *Kluyveromyces thermotolerans*, es una levadura con un notable potencial bioacidificante. Puede convertir una proporción de azúcares de uva en ácido L-láctico en lugar de etanol durante la fermentación alcohólica, lo que resulta en descensos del pH y aumentos de la acidez total acompañados de una reducción de etanol (Jolly *et al.*, 2014, Porter *et al.*, 2019).

Las cepas de *L. thermotolerans*, sin embargo, varían mucho en su capacidad de producción de ácido láctico (y por tanto de bioacidificación) así como en el impacto general sobre el

perfil sensorial del vino. Para seleccionar la mejor cepa para la elaboración, se adquirió una gran colección de cepas de *L. thermotolerans* (~200) de todo el mundo y se caracterizó a nivel genético y fenotípico (Hranilovic *et al.*, 2018). A continuación, un subconjunto de cepas fue testado en fermentaciones de cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* inoculadas simultáneamente (coinoculación) o secuencialmente, acción requerida para completar la fermentación.

En condiciones óptimas, Zymaflore® Omega pudo producir más de 10 g/l de ácido láctico, disminuyendo el pH del vino en 0,5 unidades y reduciendo el etanol en un 0,9% vol. en comparación con los monocultivos de *S. cerevisiae* (Hranilovic *et al.*, 2021). La producción de ácido láctico por *Z. Omega* se ve afectada por varios factores; al igual que otras cepas de *L. thermotolerans*, es más sensible al SO<sub>2</sub> que *S. cerevisiae* (SO<sub>2</sub> molecular ≤ 0,3 mg/L) y se inhibe con temperaturas más bajas (< 18°C). Además, es inhibido por la presencia de *S. cerevisiae*, por lo que alcanza niveles más altos de ácido láctico en inoculaciones secuenciales en comparación con las coinoculaciones. (Hranilovic *et al.*, 2022).

Más allá de los beneficios de la bioacidificación, *Z. Omega* también fue seleccionada por su impacto positivo en el sabor del vino, en términos de producción de compuestos aromáticos específicos (por ejemplo, ciertos ésteres y tioles) que pueden mejorar los perfiles de la fruta (Hranilovic *et al.*, 2021, 2022) observando igualmente su compatibilidad con determinadas *S. cerevisiae* recientemente desarrolladas capaces de producir ácido málico a partir de azúcares durante la fermentación (Vion *et al.*, 2023), como Zymaflore® Klima, itinerarios enológicos destinados a favorecer aún más la frescura.

A través de este artículo mostraremos como Zymaflore® Omega trabaja y cómo es posible su manejo en distintos ámbitos de vinificación.

### Materiales y métodos.

Todos los ensayos fueron realizados en Bodegas Baigorri, (Rioja alavesa) sobre depósitos de 500 litros por duplicado, sobre uva variedad tempranillo recogida manualmente y almacenada previamente en cámara <10°C.

**Elaboración 2020-2021.** Se realizó frente a una elaboración clásica de *Saccharomyces cerevisiae* fermentada con 20 g/hl Zymaflore® Rx60 y rehidratada con 20 g/hl de Superstart Rouge. Las modalidades con Zymaflore® Omega (*Lachancea thermotolerans*) fueron rehidratadas en agua a 37°C sembradas a 20 g/hl 48 horas después. El inóculo se realizó sobre uva

tempranillo, con aplicación de sulfuroso en entrada de tolva inferior a 3 g/100 kg. En la modalidad Zymaflore® Omega, se emplearon dos aportes diferentes de nutrición, 15 o 30 g/hl tanto con Nutristart®, nutriente mixto (orgánico-inorgánico) como con un nutriente 100% inorgánico, Thiazote® pH. Temperatura de fermentación 20-25°C (Esquema 1).

Tras final de FA, se sembró la bacteria *Lactobacillus* B7 para la realización de la fermentación maloláctica. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

**Elaboración 2021-2022.** El ensayo fue realizado frente a la misma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, Zymaflore® Rx60 a 20 g/hl rehidratada en las mismas condiciones. En esta añada, Zymaflore® Omega fue nuevamente rehidratada en agua a 37°C y sembrada a 20

**Esquema 1. Elaboración 2020-2021**

	Control	Z. Omega alta nutrición	Z. Omega baja nutrición
Encubado	Z. Rx60 20 g/hl	Z. Omega 20 g/hl	Z. Omega 20 g/hl
	S. Rouge 20 g/hl	X	X
a 48 h	X	Z. Rx60 20 g/hl	Z. Rx60 20 g/hl
	X	S. Rouge 20 g/hl	S. Rouge 20 g/hl
	Nutristart 30 g/hl	Nutristart 30 g/hl	Nutristart 15 g/hl
d 1040-1030	Thiazote ph 30 g/hl	Thiazote ph 30 g/hl	Thiazote ph 15 g/hl

**Esquema 2. Elaboración 2021-2022**

	Control	Z. Omega seq. Corta	Z. Omega seq. Larga
Encubado	Z. Rx60 20 g/hl	Z. Omega 20 g/hl	Z. Omega 20 g/hl
	S. Rouge 20 g/hl	X	X
a 72 h	X	Z. Rx60 20 g/hl	X
	X	S. Rouge 20 g/hl	X
a 120 h	X	X	Z. Rx60 20 g/hl
	X	X	S. Rouge 20 g/hl
	Nutristart 30 g/hl	Nutristart 30 g/hl	Nutristart 30 g/hl
d 1040-1030	Thiazote ph 30 g/hl	Thiazote ph 30 g/hl	Thiazote ph 30 g/hl

**Esquema 3. Elaboración 2022-2023**

	Control	Z. Omega (ac. Biológica)	Ac. Tartárico L(+) (ac. Química)
Encubado	Z. Rx60 20 g/hl	Z. Omega 20 g/hl	Z. Rx60 20 g/hl
	S. Rouge 20 g/hl	X	S. Rouge 20 g/hl
	X	X	Ac tartárico L(+) 2g/l
a 48 h	X	Z. Rx60 20 g/hl	X
	X	S. Rouge 20 g/hl	X
	Nutristart 30 g/hl	Nutristart 30 g/hl	Nutristart 30 g/hl
d 1040-1030	Thiazote ph 30 g/hl	Thiazote ph 30 g/hl	Thiazote ph 30 g/hl

g/hl, aunque esta se retrasó a 72 h y a 120 h, dejando más tiempo para actuar a *Lachancea thermotolerans*. La aplicación de sulfuroso fue la misma en entrada en tolva, inferior a 3 g/100 kg, empleando en todos los casos el mismo aporte nutricional 30 g/hl de Nutristart®, nutriente mixto (orgánico-inorgánico) y un nutriente 100% inorgánico, Thiazote® pH. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Temperatura de fermentación 20-25°C (Esquema 2).

Tras final de FA, se sembró la bacteria Lactoenos® B7 para la realización de la fermentación maloláctica. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

**Elaboración 2022-2023.** El ensayo nuevamente fue realizado frente a una elaboración clásica de *Saccharomyces cerevisiae* fermentada con 20 g/hl Z. Rx60 y rehidratada de igual manera con Superstart® Rouge a 20 g/hl frente a Zymaflore® Omega rehidratada en agua a 37°C a 48 horas antes de la siembra de *Saccharomyces*. Las uvas fueron tratadas de igual manera con sulfuroso inferior a 3 g/100 kg en entrada de tolva. En esta ocasión, se realizó la comparativa con una acidificación química empleando 2 g/l de ácido tartárico natural L(+) en entrada de uva a la tolva, empleando en todos los casos el mismo aporte nutricional 30 g/hl de Nutristart®, nutriente mixto (orgánico-inorgánico) y un nutriente 100% inorgánico, Thiazote® pH. Todos los ensayos fueron realizados por

duplicado. Temperatura de fermentación 20-25°C (Esquema 3).

Tras final de FA, se sembró la bacteria Lactoenos® B7 para la realización de la fermentación maloláctica. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

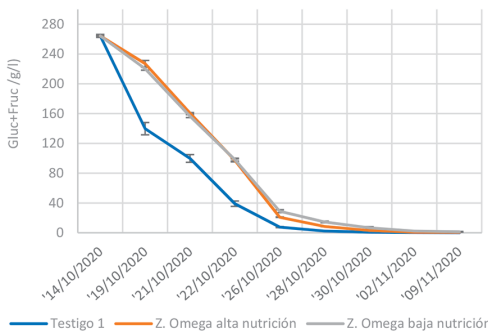
*Análisis químicos:*

El seguimiento fermentativo se realizó a través del seguimiento de la concentración de glucosa y fructosa a través del multianalizador FOSS (FTIR Infrarrojo Transformado de Fourier), de igual manera que el seguimiento de la evolución de la acidez total en el ensayo 2021-2022. Los análisis tras finalización de la fase alcohólica y/o maloláctica del grado alcohólico (infrarrojo cercano), pH (potenciometría), ac. málico y láctico (método enzimático) y acidez total (titrimétrico) fueron realizados a través de Laboratorios Excell Ibérica (Logroño-Rioja).

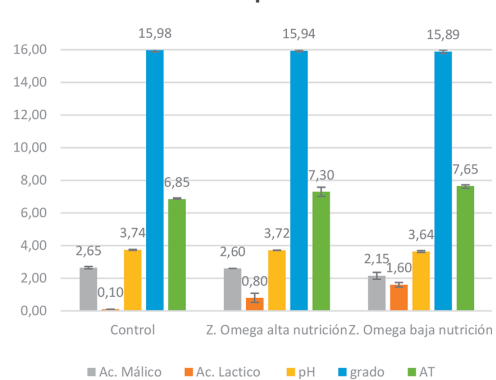
**Resultados y discusión**

**Elaboración 2020-2021.** Las dos elaboraciones desarrolladas en inoculación secuencial con Z. Omega tardaron un mayor tiempo en finalizar la FA (Fig. 1). Este hecho suele ser algo habitual cuando dos especies compiten por los mismos recursos del mosto. La cantidad media de ácido láctico producido por Zymaflore® Omega durante la fermentación alcohólica en las condiciones ensayadas fueron de 0,80 g/l y 1,60 g/l para el protocolo de alta nutrición y baja nutrición.

**Evolución de los azúcares reductores durante FA (g/l)**



**Parametros fisico-químicos tras fin FA**



**Figura 1 y 2.** Evolución consumo de azúcares durante la FA y parámetros físico-químicos tras final de FA (vendimia 2020-2021).

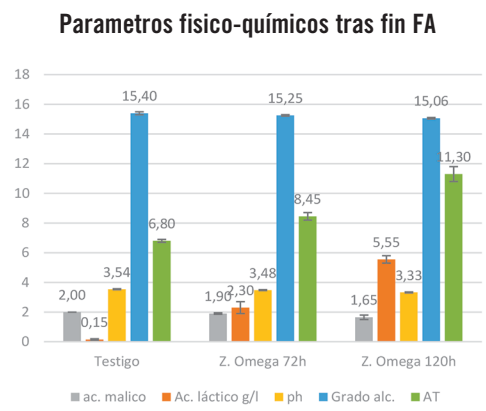
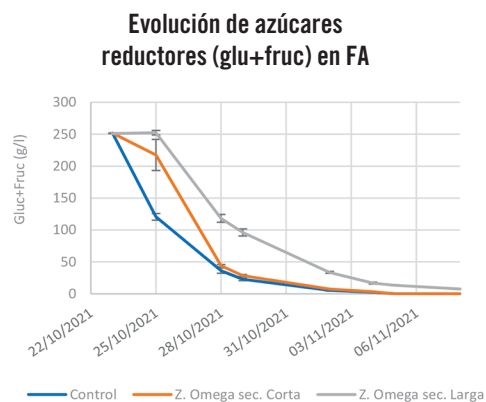


Figura 3 y 4. Evolución consumo de azúcares durante la FA y parámetros físico-químicos tras final de FA (vendimia 2021-2022).

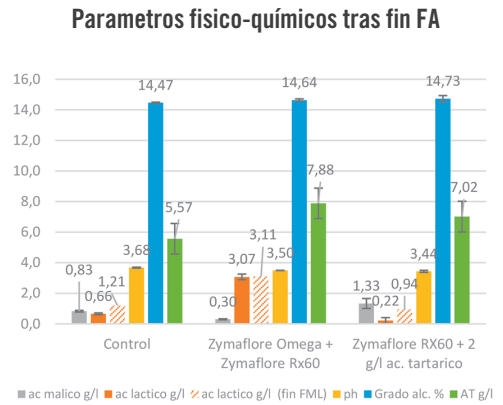
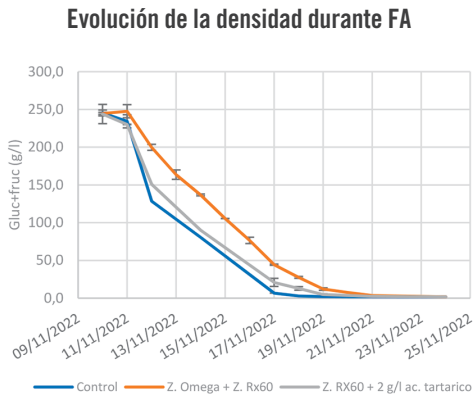
Una de las hipótesis posibles a esta incidencia vinculada a la nutrición podría ser a que *Lachancea thermotolerans* es una gran consumidora de nitrógeno. En un ecosistema donde esta haya consumido el nitrógeno, y exista una limitación en el aporte nutricional como en la tercera modalidad ensayada, *S. cerevisiae* tendría su metabolismo metabólico fermentativo limitado, provocando que Zymaflore® Omega estuviera metabólicamente activa durante más tiempo, por tanto produciendo más cantidad de ácido láctico. El nivel de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) analizado sobre el mosto inicial fue de 140 mg/l. En la modalidad alta nutrición, el NFA aportado por el Nutristart® y el Thiazote pH supuso un suplemento de +103 mg/l mientras que en el caso de baja nutrición el suplemento de +51,5 mg/l. Esta última cantidad (140+51,5 mg/l) es considerada escasa según algunos autores para un mosto del grado alcohólico de estos ensayos, reforzando la hipótesis de déficit nutricional para el desarrollo correcto de *Saccharomyces cerevisiae*.

El hecho de la que la modalidad “baja nutrición” haya tenido una ralentización en el final de FA y haya tardado 9 días más en finalizar (fin FA = glu+fruc <2) frente al depósito testigo, apoyaría la idea del déficit nutricional de *Saccharomyces* y su baja actividad fermentativa con un mayor tiempo para imponerse a *Lachancea*. La modalidad “alta nutrición” tan sólo tardó 3 días más en finalizar considerando que no existe diferencia con el testigo (fue sembrada 48 h más tarde).

Es interesante observar como la Acidez Total en g/l de tartárico subió 0,45 y 0,85 g/l respectivamente tras el uso de Zymaflore® Omega tras la finalización de la FA. En los 3 casos (datos no mostrados) la FML, tras la siembra con Lactoenos® B7 se desarrolló con total normalidad.

**Elaboración 2021-2022.** En esta segunda elaboración con Zymaflore® Omega, el objetivo del ensayo era el de alcanzar los niveles máximos de ácido láctico producido por *Lachancea thermotolerans*. Ante tal hecho, se redireccionó el experimento hacia el tener durante más tiempo activa metabólicamente a Zymaflore® Omega, espaciando su siembra 72 h (3 días) o 120 h (5 días) del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, Zymaflore RX60. El nitrógeno (NFA) inicial del mosto de partida fue 149,6 mg/l. muy similar a la añada anterior, suplementado en ambos casos por Nutristart® y Thiazote® pH en suplemento de +103 mg/l

En la Fig.3 se observa cómo el aumento a 120 h entre ambas especies derivó nuevamente en un proceso de fermentación alcohólica mucho más larga y lenta en el tiempo, y aunque en este ensayo los niveles nutritivos estaban en niveles considerados óptimos para estos grados alcohólicos, la competitividad entre especies sembradas con un gran espacio de tiempo ralentizó el desarrollo y la correcta implantación de *Saccharomyces cerevisiae*, un efecto “similar” a un déficit nutricional. Sin embargo, esta permanencia de “soledad” de *Lachancea thermotolerans* en el mosto, le permitió actuar metabólicamente durante un



**Figura 5 y 6.** Evolución consumo de azúcares durante la FA y parámetros físico-químicos tras final de FA y (FML para el ác. láctico, vendimia 2022-2023).

mayor tiempo y por tanto aumentar los niveles de ácido láctico de media hasta 5,55 g/l. El aumento a 72 h. también supuso un incremento de producción de ácido láctico respecto a los datos de la añada anterior, de media hasta 2,30 g/l (Fig. 4). En este ensayo, el incremento de acidez total expresado en ac. tartárico fue mucho más elevado (1,65 y 4,50 g/l respectivamente)

Es interesante observar también cómo en la siembra espaciada 120 h., se produce un leve consumo de ac. málico y una ligera reducción del grado alcohólico, aspectos ya descritos en bibliografía vinculados al metabolismo de *Lachancea thermotolerans*. En este ensayo, las modalidades testigo y 72 h. fueron ambas capaces de desarrollar la FML tras la siembra del inóculo maloláctico Lactoenos® B7, a diferencia de la modalidad sembrada a 120 h, que fue incapaz de desarrollar el proceso maloláctico. Distintos autores han puesto de manifiesto la dificultad del desarrollo de FML en los casos en que los niveles de ácido láctico durante la FA sobrepasan los 3 g/l.

**Elaboración 2022-2023.** En este caso se ideó un ensayo para poder comparar dos metodologías de acidificación diferentes durante el proceso fermentativo, a través de una acidificación biológica mediante el empleo de Zymaflore® Omega, o bien comparado frente a una acidificación química con 2 g/l de ácido tartárico natural (L+). Nuevamente se observa (Fig. 5) en la modalidad de

bioacidificación un cierto retraso en la finalización de la FA. En este caso, se observó un arranque espontáneo de la FML antes de finalizar la FA, tanto en el caso de los depósitos testigos como de los depósitos con *Lachancea thermotolerans*, posiblemente una contaminación durante el proceso de fermentación alcohólica. Es por ello que representamos los datos de ácido láctico también tras la finalización de la FML para poder comparar correctamente los resultados entre los 3 ensayos. De esta manera podemos observar como la siembra de Z. Omega tuvo un incremento de ac. láctico tras FML frente a la modalidad testigo de 1,9 g/l.

En el seguimiento hasta el final del proceso maloláctico de las 3 modalidades se observó en este ensayo como al final de la FML la bioacidificación biológica aumentó la acidez total en 2,56 g/l (g/l ac. tartárico) frente a un incremento tan solo 1,53 g/l de la acidificación química, mostrándose Zymaflore® Omega como una herramienta eficaz y más estable de acidificación en el tiempo. Este hecho puso de manifiesto la fragilidad de la acidificación química con ac. tartárico con una pérdida parcial a lo largo del tiempo, mostrando la importancia de obtener un buen buffer de ácidos antes de FML que mitigue la posible caída de la acidez en el tiempo (Fig.7). Las 3 modalidades finalizaron la FML, aunque el ensayo de acidificación química se retrasó debido probablemente a ese

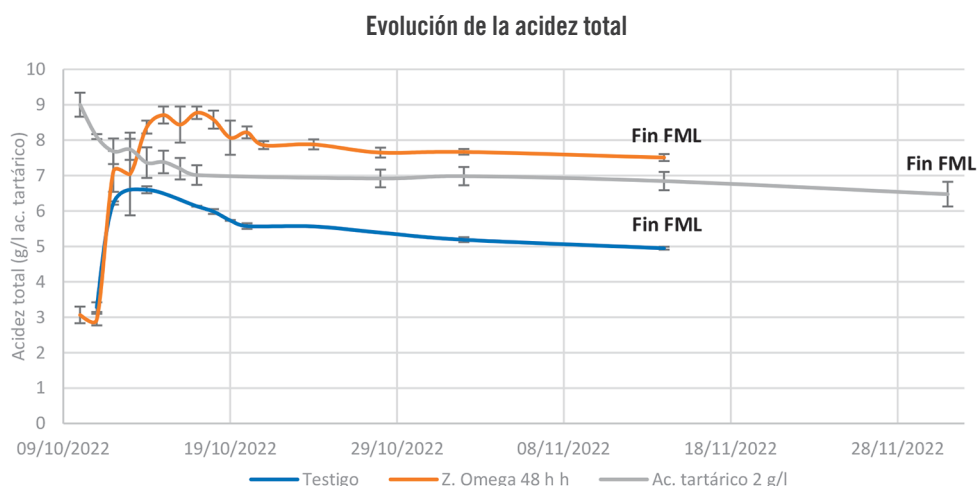


Figura 7. Evolución consumo de la acidez total (g/l. ac. tartárico) durante el proceso fermentativo (FA+FML).

inicio espontáneo de la FML en las otras dos modalidades.

### Conclusiones

A través de los distintos trabajos desarrolladas en añadas diferentes sobre Zymaflore Omega, podemos ya extraer conclusiones interesantes ya no sólo de su empleo de bodega, sino de condiciones tecnológicas que nos proporcionan maneras de guiar y controlar fácilmente la acidez total y el pH de los vinos a través simplemente del control del proceso metabólico de *Lachancea thermotolerans*. Zymaflore® Omega se ha posicionado como una herramienta útil de generación de ácido láctico, y por tanto de incremento de acidez total en los vinos de este ensayo.

- En nuestro estudio, con una siembra de 20 g/hl y un retraso de *Saccharomyces cerevisiae* de 48 h, los resultados obtenidos de producción de ácido láctico se movieron entre 0,8 y 1,9 g/l. Al aumentar a 72 h el retraso en la siembra, alcanzó niveles de 2,3 g/l de ácido láctico, desarrollándose en los 3 casos la FML sin ningún contratiempo tras la siembra de Lactoenos® B7.
- La competitividad nutricional entre *Lachancea thermotolerans* y *Saccharomyces cerevisiae* se ha puesto de manifiesto y se observado como en situaciones de déficit, el desarrollo del final de la fermentación alcohólica por

esta última puede verse afectado si no se aplica un correcto plan de nutrición desde el inicio del proceso.

- Al aumentar el espaciado de tiempo de siembra a 120 h (5 días), los niveles de ácido láctico alcanzaron 5,55 g/l y una acidez total expresada en g/l de ac. tartárico de 11,30 g/l. En este caso ya no se desarrolló la FML.
- Se ha puesto de manifiesto la robustez de la acidificación biológica frente a la química con ácido tartárico, vislumbrando como, aunque en los primeros momentos ambos conllevan prácticamente la misma acidez total, buena parte del ácido tartárico tiende a precipitar a medida que las interacciones iónicas y equilibrios tartáricos se producen durante la evolución del vino.

Los cambios observados en la climatología de los últimos años nos llevan a la necesidad de combinar estrategias enológicas y de viticultura que mitiguen la disminución progresiva de la acidez de los mostos, y aunque los aportes de ácidos como el tartárico, málico o láctico sean hasta ahora las vías enológicas de compensación más usadas, su falta de estabilidad química y/o microbiológica en el tiempo conlleva a que nuevas alternativas como la bioacidificación con Zymaflore® Omega se convierta a día de hoy en una alternativa real para la industria vitivinícola.

## Bibliografía

HRANILOVIC, A., GAMBETTA, J.M., SCHMIDTKE, L., BOSS, P.K., GRBIN, P.R., MASNEUF-POMAREDE, I., BELY, M., ALBERTIN, W. AND JIRANEK, V., 2018. Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation. *Scientific Reports*, 8(1), p.14812.

HRANILOVIC, A., ALBERTIN, W., CAPO-NE, D.L., GALLO, A., GRBIN, P.R., DANNER, L., BASTIAN, S.E., MASNEUF-POMAREDE, I., COULON, J., BELY, M. AND JIRANEK, V., 2021. Impact of *Lachancea thermotolerans* on chemical composition and sensory profiles of Merlot wines. *Food chemistry*, 349, p.129015.

HRANILOVIC, A., ALBERTIN, W., CAPONE, D.L., GALLO, A., GRBIN, P.R., DANNER, L., BASTIAN, S.E., MASNEUF-POMAREDE, I., COULON, J., BELY, M. AND JIRANEK, V., 2022. Impact of *Lachancea thermotolerans* on chemical composition and sensory profiles of viognier wines. *Journal of Fungi*, 8(5), p.474.

JOLLY, N.P., VARELA, C. AND PRETORIUS, I.S., 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS yeast research*, 14(2), pp.215-237.

PORTER, T.J., DIVOL, B. AND SETATI, M.E., 2019. *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Research International*, 119, pp.378-389.

VION, C., MURO, M., BERNARD, M., RICHARD, B., VALENTINE, F., YERAMIAN, N., MASNEUF-POMARÈDE, I., TEMPÈRE, S. AND MARULLO, P., 2023. New malic acid producer strains of *Saccharomyces cerevisiae* for preserving wine acidity during alcoholic fermentation. *Food Microbiology*, 112, p.104209.

WINDHOLTZ, S., NIOI, C., THIBON, C., BÉCQUET, S., VINSONNEAU, E., COULON, J. AND MASNEUF-POMARÈDE, I., 2023. Bio-protection as an alternative to SO<sub>2</sub> in the pre-fermentation phase. *IVES Technical Reviews, vine and wine*.