

MAXAFERM®

Hacia un mejor dominio de la fermentación alcohólica por adición al mosto de un biorregulador específico: Impacto sobre la velocidad de fermentación y sobre las características del vino.

Las lánguidas fermentaciones y las paradas constituyen un problema mayor para los vinificadores debido a su carácter poco previsible.

Se producen con mayor probabilidad con mostos pobres en nitrógeno asimilable, teniendo una fuerte concentración de azúcar, o provenientes de variedades tales como el Chardonnay. Algunas parcelas vitícolas están identificadas por conducir a problemas frecuentes sin que la causa de las dificultades de fermentación siempre pueda ser bien identificada.

En todo caso, las dificultades de fermentación se deben a una disminución progresiva de la viabilidad de las levaduras, que es la consecuencia del efecto combinado de varios factores: la pérdida de permeabilidad de la membrana citoplásmica de la levadura debido a una síntesis de esteroides insuficiente, la adsorción de ácidos grasos tóxicos, un aumento de la concentración de alcohol etílico, una disminución de la cantidad de nitrógeno asimilable o una fuerte concentración de CO₂.

La multiplicidad de estas causas tiene dos consecuencias: por un lado, confiere un carácter difícilmente previsible para las dificultades de fermentación que ningún análisis previo del mosto permite prevenir de modo seguro; por otro, explica por qué la adición de sales de amonio no constituye una panacea ya que ésta sólo trata el caso relativamente sencillo de las carencias de nitrógeno asimilable.

El objetivo de este estudio era de elaborar un activador de fermentación específica que pueda ser añadido al mosto de fermentación con el fin de prevenir (o tratar) la mayoría de los casos de parada de la fermentación. La fórmula elaborada se compone de sales de amonio, de tiamina y de levaduras inactivadas térmicamente.

*La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada fue seleccionada por su alto contenido en ergosteroles y en zimosteroles.*

► Las principales causas de los problemas de fermentación

Varias causas de pérdida de velocidad o de parada de la fermentación fueron indicadas (Cuadro 1) y se pueden clasificar en tres categorías:

- Aquellas debidas a la composición inicial del mosto: deficiencias en nitrógeno asimilable y en vitaminas tales como la tiamina (Bataillon y al. 1996), concentraciones elevadas de azúcares susceptibles a fermentación, valores bajos de pH,
- Un dominio insuficiente de los procedimientos de vinificación durante las etapas de clarificación, de levadurado (elección inadecuada de la cepa, mala rehidratación y aclimatado al mosto), de oxigenación y de control de la temperatura (Ribereau-Gayon y al. 1998; Sablayrolles, 1998),
- La producción por las levaduras de inhibidores tales como el etanol, el gas carbónico y los ácidos grasos saturados en C8 y C10 (Lafon-Lafourcade y al. 1984).

Los problemas de fermentación se deben raramente a una causa única sino más bien a la combinación de varios factores que producen una pérdida de viabilidad importante de las levaduras.

Sin embargo, fue demostrado que ciertas causas aparecen con más frecuencia que otras (Sablayrolles y al. 1996). El nitrógeno disponible es, esencialmente, para favorecer el desarrollo exponencial inicial de la levadura y también para permitir la renovación continua del « grupo » de proteínas enzimáticas y de transportadores transmembranarios. El aumento del contenido en etanol de los mostos en fermentación tiene un efecto sobre la permeabilidad de la membrana citoplásmica de las levaduras y por consiguiente sobre la actividad de los transportadores transmembranarios de azúcar (Salmon, 1989). Los azúcares residuales, dominados por la fructosa, no pueden así ser metabolizados por la levadura ni fermentados.

De hecho, las levaduras deben adaptar la composición de su membrana plásmica por la síntesis continua de esteroides y ácidos grasos insaturados. Esta síntesis se produce en presencia de una concentración mínima de oxígeno disuelto.



► Elaboración de un biorregulador específico de fermentación

Composición

El objetivo del presente estudio fue el de elaborar un biorregulador de fermentación complejo con el fin de procurar una solución a la mayoría de las causas de los problemas de fermentación encontrados por los vinificadores. La composición de este activador (Maxaferm®) y la importancia de cada uno de sus componentes están indicadas en el Cuadro 2. La optimización de la composición estuvo basada esencialmente en la elección de la cepa de *S. cerevisiae* retenida para la formulación del producto.

Con este fin, examinamos detenidamente el conjunto de cepas de levadura producidas por el grupo DSM con el objeto de determinar sus contenidos respectivos en ergosteroles, zimosteroles, trehalosa y glutatión. El departamento de investigación de DSM identificó las cepas de levaduras que tenían los contenidos de esteroides más elevados y retuvo la más eficaz para la formulación final del activador de fermentación. En el transcurso de esta fase de optimización, la eficacia de los productos fue probada, así como la reducción del tiempo de fermentación de un mosto de Chardonnay que presentaba, en condiciones normales, una aminoración de fermentación.

La fórmula de Maxaferm® permite a la vez evitar y tratar las aminoraciones y las paradas de fermentación. La presencia de levaduras inactivadas permite la evacuación del CO₂ y la adsorción de los metabolitos tóxicos de levadura (ácidos grasos saturados de cadenas cortas) así como el aporte de esteroides, de fosfolípidos, de aminoácidos y de otros micro-nutrientes para las levaduras de fermentación. Maxaferm® comprende igualmente tiamina y sales de amonio que favorecen el crecimiento y el continuo renuevo de las enzimas del metabolismo, permitiendo así mejorar la viabilidad de las levaduras.

► Prueba en vinificaciones modelos para la prevención de fermentaciones lánguidas

El impacto de Maxaferm® en la velocidad de fermentación fue probado realizando micro-vinificaciones de mosto de Chardonnay que presentaban una fermentación lánguida en condiciones estándares, la temperatura de fermentación fue fijada a 24 °C.

La velocidad de fermentación fue seguida midiendo la producción de gas carbónico (Sablayrolles y al. 1987).

Los mostos utilizados condujeron todos a fermentaciones lentas, de duraciones superiores a 300 horas, todo ello independientemente de la cepa de levadura añadida. Las diferentes levaduras secas activas fueron añadidas a 20 g/hl.

► Importancia de las condiciones de aporte sobre el tiempo total de fermentación

Hemos comparado la eficacia del activador de fermentación en función del momento y de las condiciones de aporte al mosto.

Cuando el activador de fermentación fue añadido en el encubado, en dosis de 300 mg/l, el efecto principal observado fue una reducción de la fase latente y un inicio rápido de la fase de crecimiento exponencial de las levaduras (Figura 1). Este aporte precoz de activador no tuvo sin embargo efecto revelador sobre el tiempo total de fermentación, el porcentaje de viabilidad de las levaduras y los contenidos en azúcares residuales después 200 h de fermentación. Al contrario, una adición a media fermentación tuvo un efecto inmediato de reactivación de la fermentación alcohólica que se acabó en menos de 200 horas.

Una adición fraccionada de 2 x 150 mg/l, añadidos respectivamente al principio y a media fermentación, tuvo también un impacto muy positivo sobre la velocidad de fermentación (no representado).

► Impacto de diferentes tipos de activadores sobre la velocidad de fermentación y la viabilidad de las levaduras

El efecto de la adición de Maxaferm® fue comparado al del fosfato di-amónico dosificado a 20 g/hl, solo o combinado a una oxigenación moderada (7 mg/l).

Estas pruebas mostraron que el tratamiento más eficaz para la prevención de fermentación lánguida es la adición simultánea de 300 mg/l de Maxaferm® y de oxígeno a media fermentación (Figura 2).

En esta prueba, la fermentación se acabó al cabo de 150 horas cuando el mosto testigo contenía más de 10 g de azúcares residuales al cabo de 300 horas. Estos resultados sobre el tiempo total de fermentación estaban en perfecta correlación con los valores de viabilidad de las levaduras en final de fermentación (Figura 3). Las otras modalidades probadas (fosfato diamónico y oxígeno, añadidos solos o combinados) dieron resultados intermedios en estos dos criterios. En las muestras tratadas con Maxaferm®, solo o combinado con oxígeno, las levaduras viables representaban en final de fermentación más del 50 % de las células totales, mientras que la viabilidad al final del procedimiento con los demás tratamientos probados era del orden del 40-45 %.

► Pruebas de vinificación y consecuencias sobre las características del vino

Influencia sobre el tiempo total de fermentación

Las pruebas de vinificaciones modelos fueron realizadas durante las vendimias de 1999 en colaboración con el Centro Técnico Interprofesional de la Viña y del Vino (ITV-France, Tours).

El mosto utilizado fue obtenido a partir de Sauvignon blanco, sulfatado a 5 g/hl, y clarificado después de la adición de enzima pectolítica (Rapidase® CB) a 2 g/hl. La concentración inicial de azúcares reductores era cercana a 200 g/l. Después del levadurado (Collection Cépage Sauvignon LW07) a 20 g/hl, la fermentación alcohólica del mosto testigo se acabó después de 17 días a una temperatura comprendida entre 19 y 20 °C. Se puede concluir pues, que el mosto testigo utilizado para las pruebas no presentaba problema específico que condujera a una parada de la fermentación.

El aporte de Maxaferm® a 30 g/hl, después de una disminución de 0,035 de la densidad (4° día de fermentación) permitió una reducción a 13 días el tiempo total de fermentación.

La utilización de este activador constituye así un medio eficaz de reducción de los tiempos de fermentación y optimización de la gestión del encubado en los establecimientos vinícolas.

Impacto sobre las características de los vinos obtenidos

Las diferentes muestras de Sauvignon blanco fermentadas sin (testigo) y con adición de 30 g/hl de Maxaferm® fueron sometidas a análisis enológicos (Cuadro 3) y a una evaluación sensorial. La comparación de los perfiles analíticos de los vinos (Cuadro 3) muestra que la utilización del activador de fermentación tuvo un efecto positivo sobre varios parámetros importantes como:

- la concentración final en azúcares reductores es más baja,
- la acidez volátil fue reducida de 0.17 g/l, (o sea una reducción del 30 % en relación al vino testigo),
- el contenido en glicerol fue aumentado en un 10 %.

Otros parámetros como el volumen del grado alcohólico, la acidez total, o la absorbencia a 420 nm no fueron modificados.

Estos vinos mismos fueron sometidos a una evaluación sensorial por el jurado del ITV-France expertos de la zona del Valle del Loira. El jurado evaluó los parámetros sensoriales tales como el olor, la intensidad y la calidad, el gusto, el aspecto visual, el equilibrio, la suavidad, la amargura, la acidez, ... y los resultados fueron sometidos a una interpretación estadística.

Los dos vinos fueron juzgados idénticos en cada parámetro evaluado.

La adición de Maxaferm® durante la fermentación no produjo ninguna modificación sensorial del vino.

Pruebas de vinificación: efecto-dosis y tiempo total de fermentación

Las pruebas de vinificación modelo fueron realizadas durante las últimas vendimias en colaboración con el CIVAM de la región de Córcega. El mosto utilizado fue obtenido por prensado directo de Vermentino blanco, sulfatado a 4 g/hl, y clarificado por deslío estático después de la adición de enzima pectolítica (Rapidase CB®) a 2 g/hl. La turbidez inicial fue ajustada a 100 NTU antes del levadurado a 20 g/hl con la cepa Equinox B1. La vendimia retenida para este estudio provenía de una parcela identificada por dar mostos con fermentaciones lánguidas. La fermentación del mosto obtenido (TAP de 13,5 % de vol.) duró así 31 días a una temperatura de 18-19 °C.

El aporte de Maxaferm® fue realizado en el 2° día de fermentación y un efecto dependiente de la dosis pudo ser observado. Un aporte de 10 g/hl permitió reducir el tiempo total de fermentación a 21 días, una dosis de 30 g/hl tuvo un efecto espectacular ya que la fermentación se acabó en 13 días, o sea una reducción de cerca del 60 % con respecto al testigo. Las características analítica y sensoriales (evaluación del jurado del CIVAM de Córcega) de los vinos obtenidos no representaban ninguna diferencia significativa. Esta nueva prueba confirma pues el interés de este biorregulador de fermentación como una herramienta en la gestión del encubado en los establecimientos vinícolas, sin que la calidad de los vinos sea modificada.

Conclusión

El activador de fermentación elaborado por el departamento de investigaciones de DSM y probado en el presente estudio se reveló un medio muy eficaz para reducir el tiempo de fermentación alcohólica y evitar las principales causas de los problemas de fermentación. La adición de Maxaferm® a media fermentación permite una reducción importante de la frecuencia y la intensidad de las dificultades de fermentación (reducción o parada). Además, algunos parámetros analíticos pueden ser mejorados sin engendrar la menor modificación sensorial de los vinos.

Este producto puede también ser utilizado en el tratamiento de la parada de la fermentación, en paralelo con la inoculación de cepas como la Fermichamp® (cepa 67J INRA Narbona).

Cuadro 1:
Principales causas de los problemas de fermentación.

COMPOSICIÓN DEL MOSTO		
Factor	Consecuencia	Comentarios
Carencia de nitrógeno.	Crecimiento exponencial de las levaduras y velocidad de fermentación bajos.	El contenido del mosto depende: ■ de la tierra y del modo de llevar la viña (empradizado,...), ■ de la variedad, ■ de la madurez de la uva.
Concentración elevada de azúcares reductores.	Mortalidad inicial de las levaduras y contenidos finales de alcohol elevados	La selección de cepas de levaduras resistentes a las presiones osmóticas así como a los altos contenidos de alcohol permite liberarse de este problema.
Carencia de tiamina	Limitación de la multiplicación de las levaduras.	La tiamina debe ser añadida muy pronto, antes de la fermentación, para favorecer el desarrollo de las levaduras.

PROCESO DE VINIFICACIÓN		
Factor	Consecuencia	Comentarios
Exceso de SO ₂ .	Inhibición de las levaduras. fuerte concentración de etanol.	La toxicidad aumenta con un pH bajo y una clarificación excesiva.
Mosto empobrecido en ciertos elementos nutritivos.		Los fangos: ■ contienen lípidos (ácidos grasos insaturados), ■ permiten la nucleación del CO ₂ y luego su eliminación. La turbidez del mosto debe ser mantenida de 80 a 200 NTU según el estado sanitario de la vendimia y la cepa de levadura utilizada.
Carencia de oxígeno.	Toxicidad aumentada del alcohol que produce pérdida de viabilidad de las levaduras.	El efecto de las carencias de oxígeno está agravado por una clarificación y por medidas de protección excesivas contra la oxidación. Añadiendo oxígeno en mitad de la fermentación, el riesgo de oxidación es prácticamente despreciable.
Temperaturas extremas.	Una temperatura superior a 32 °C favorece la mortalidad de las levaduras.	Las fuertes diferencias de tolerancia a las temperaturas extremas existen entre las diferentes cepas de levaduras.
	Una temperatura inferior a 15 °C disminuye su actividad.	El calor amplifica el efecto del alcohol en la membrana de la levadura. Evite todo choque térmico superior a 10 °C en el momento de de la inoculación (pérdida de viabilidad de la población inicial de levaduras)

METABOLITOS AUTO-TÓXICOS DE LA LEVADURA		
Factor	Consecuencia	Comentarios
Etanol.	El etanol, en sinergia con otros inhibidores, provoca la mortalidad de las levaduras.	El poder alcohólico de las levaduras seleccionadas es superior al de las flores de levaduras indígenas.
Exceso de CO ₂ .	Mortalité des levures.	Algunas cepas de levaduras toleran un nivel elevado de CO ₂ .
Ácidos grasos C8 C10. de fermentación.	Tóxico para las levaduras	La pared celular de las levaduras adsorbe estos inhibidores.

Cuadro 2:
Composición del activador de fermentación elaborado.

Compuesto	Comentarios
Levaduras inactivadas	Eliminación del gas carbónico. Adsorción de los ácidos grasos tóxicos. Fuente de esteroides, glutatión, aminoácidos y oligoelementos.
Amonio sulfatado, Fosfato diamónico.	Favorecen la multiplicación y la viabilidad a largo plazo de las levaduras.
Tiamina.	Favorece el crecimiento exponencial de las levaduras.

Cuadro 3:
Análisis comparado de los vinos blancos Sauvignon fermentados sin (testigo) y con aporte de 30 g/hl de Maxaferm® después de 4 días de fermentación. Datos: ITV-France (Tours).

Parámetro	Testigo	Vino obtenido con Maxaferm®
Azúcares reductores (g/l)	1,3	0,9
Acidez volátil (g/l-H ₂ SO ₄)	0,46	0,29
Grado alcohólico (% vol.)	12,3	12,4
pH	3,08	3,03
Acidez total (g/l-H ₂ SO ₄)	5,25	5,5
Glicerol (g/l)	5,9	6,5
Potasio (g/l)	0,52	0,54
Absorbencia a 420 nm/1 cm	0,035	0,034

Figura 1:
Velocidad de fermentación alcohólica de un mosto de Chardonnay que ha dado una aminoración de la fermentación: Testigo (curva azul), después del aporte de 300 mg/l de Maxaferm® al principio (curva verde) y a media fermentación (curva roja).
Datos: UMR Sciences pour l'Oenologie (INRA-Montpellier, France).

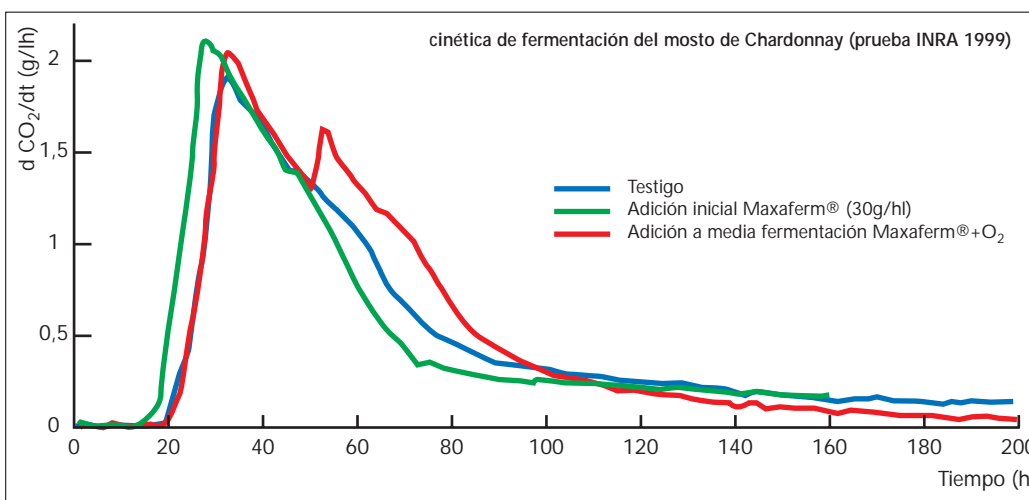


Figura 2:

Acabado de la fermentación obtenida a través de diferentes tratamientos de un mosto de Chardonnay: adición de fosfato diamónico (200 mg/l) y de Maxaferm® (300 mg/l), solos o combinados con oxígeno (7 mg/l), aportes realizados cuando la densidad del mosto alcanza 1040.

Datos: UMR Sciences pour l'Oenologie (INRA-Montpellier, France).

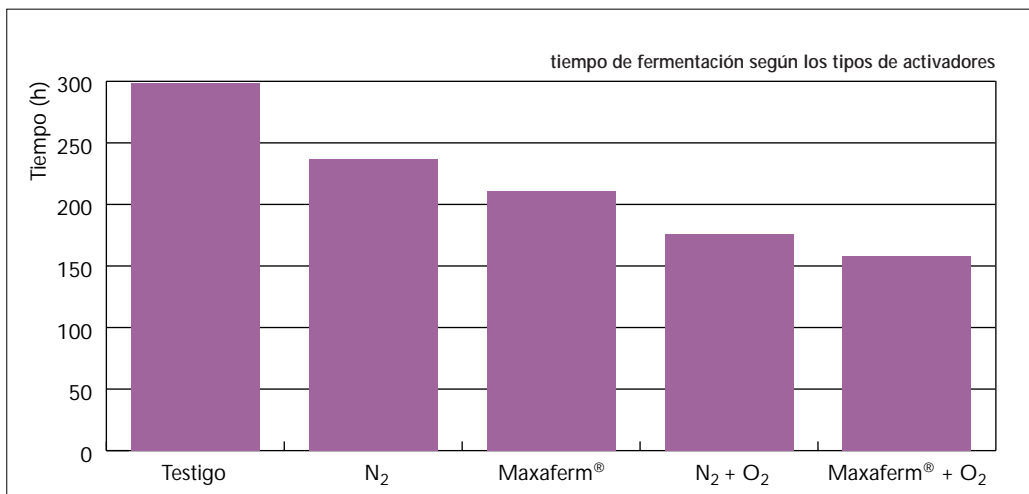
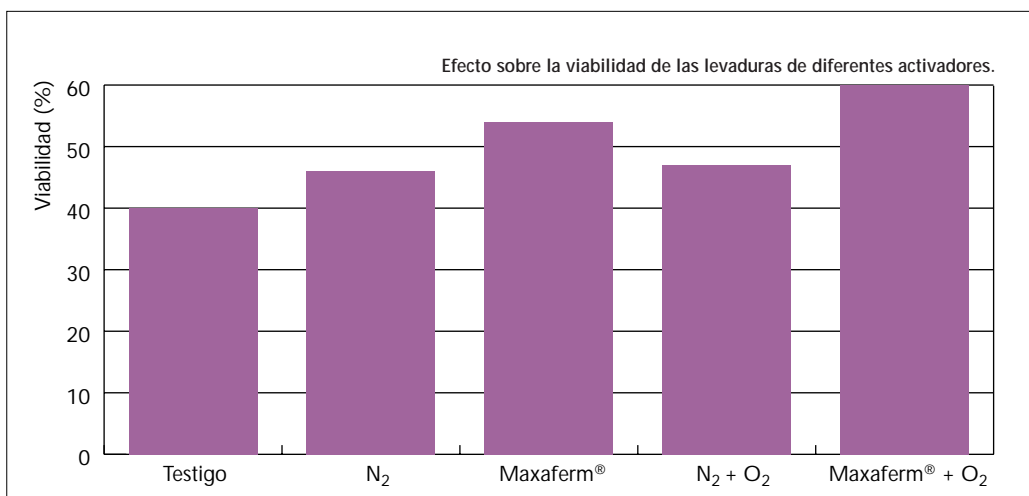


Figura 3:

Viabilidad de las células de levadura (en %) al final de la fermentación alcohólica de un mosto de Chardonnay sometido a diferentes tratamientos: adición de fosfato diamónico (200 mg/l) y de Maxaferm® (300 mg/l), solos o combinados con oxígeno (7 mg/l), cuando la densidad del mosto alcanza 1040.

Datos: UMR Sciences pour l'Oenologie (INRA-Montpellier, France).



Patrice Pellerin
 Research Application Manager
 DSM Food Specialties Oenology

■ Agradecimientos:

Los autores desean agradecer a la Sra Nathalie Uscidda del CIVAM de la región Córcega por la realización de las pruebas de vinificación de Vermentino blanco, al Sr Christian Picou y al Dr. Jean-Marie Sablayrolles de la Unidad Mixta de Investigación de Ciencias para la Enología (INRA-Montpellier) por la realización de las pruebas de micro-vinificación.

■ Referencias:

Bataillon M., Rico A., Sablayrolles J.M., Salmon J.M., Barre P. (1996) Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: impact on alcoholic fermentation kinetics. *J. Ferm. Bioeng.* 82: 101-106.

Lafon-Lafourcade S., Geneix C., Ribereau-Gayon P. (1984) Inhibition of alcoholic fermentation of grape musts by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1246-1249.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. (1998) *Traité d'Œnologie. Vol 1. Microbiologie du Vin, Vinifications.* Dunod, Paris.

Sablayrolles J.M. (1998) *Conduite de la fermentation alcoolique.* In : *Œnologie. Fondements Scientifiques et Technologiques.* Flanzy (ed.) Lavoisier Tec&Doc, Paris: 415-444.

Sablayrolles J.M., Barre P., Grenier P. (1987) Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotech. Techniques.* 1: 181-184.

Sablayrolles J.M., Dubois C., Manginot C., Roustan J.L., Barre P. (1996) Effectiveness of ammoniacal nitrogen and oxygen combined additions during sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferm. Bioeng.* 82: 145-150.

Salmon J.M. (1989) Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 953-958.