

# ADICIONES EN EL DEPÓSITO. INOCULACIÓN DE LEVADURAS



**IES Duques de Nájera**

# Objetivos en la FOH

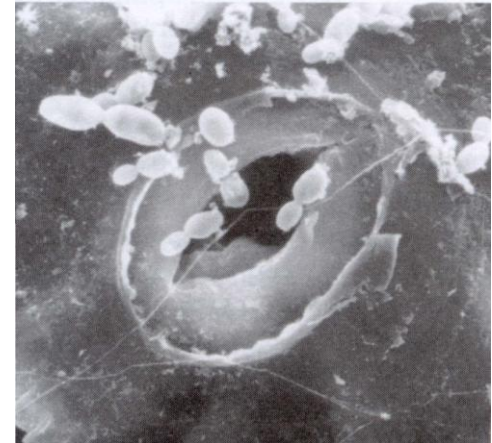


- ⌘ Asegurar fermentación completa y rápida de los azúcares
- ⌘ Evitar la producción de compuestos indeseables: acidez volátil, compuestos azufrados
- ⌘ Favorecer la formación, extracción y estabilización de compuestos deseables

# Agentes de la FOH

## ⌘ Levaduras Espontáneas

- ☑ En la uva
- ☑ En el material de transporte
- ☑ En el material de bodega



## ⌘ Levaduras Secas Activas

# Inoculación de L.S.A.



## **A FAVOR**

- ❑ Seguridad y Rapidez
- ❑ Elección Levadura
- ❑ Economía Instalaciones

## **EN CONTRA**

- ❑ Pérdida Tipicidad
- ❑ Pérdida Complejidad
- ❑ Coste Producto

# Desventajas



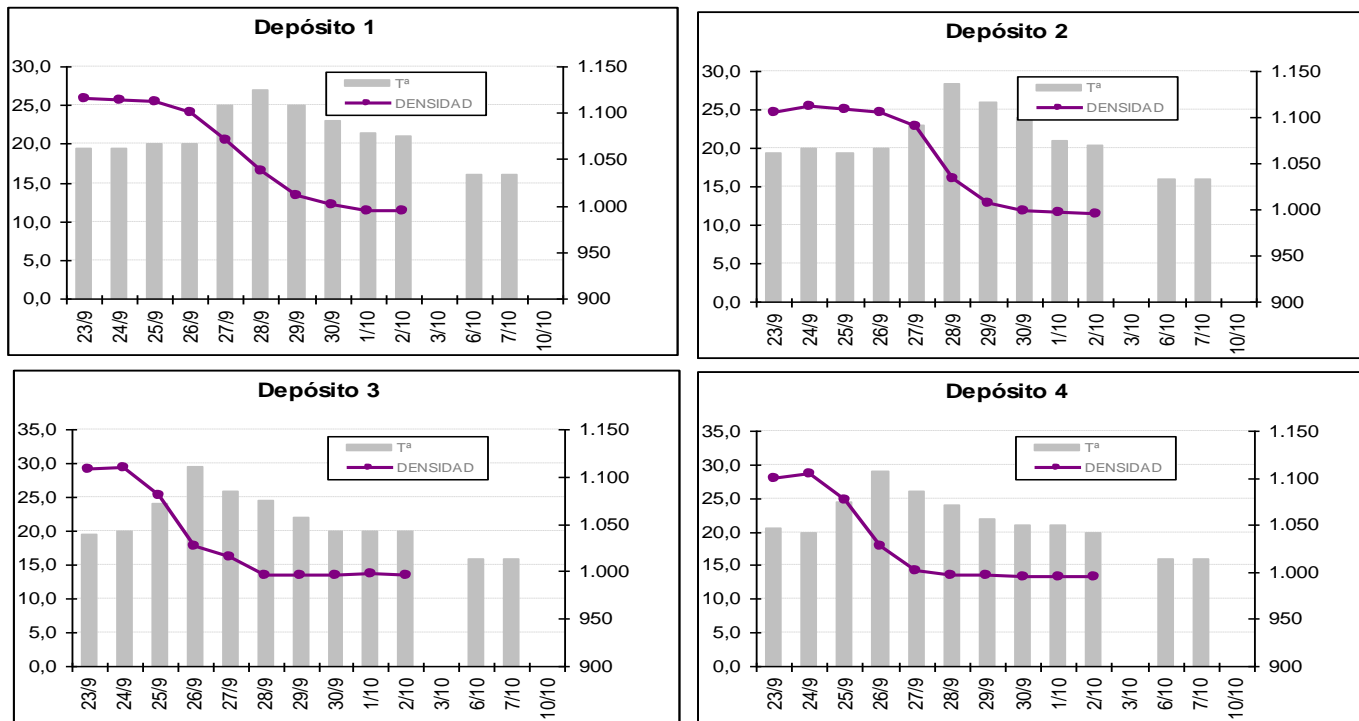
## **Pérdida de Tipicidad**

- ☒ Mercado en manos de empresas multinacionales
- ☒ Uso de levaduras iguales en zonas distintas.
- ☒ Levadura inoculada permanece en la bodega, modificando su ecosistema microbiológico.

## **Pérdida de Complejidad**

- ☒ Una sola especie de levadura
- ☒ Un solo clon
- ☒ En FOH espontánea participan muchas levaduras

# Seguridad y Rapidez en FOH

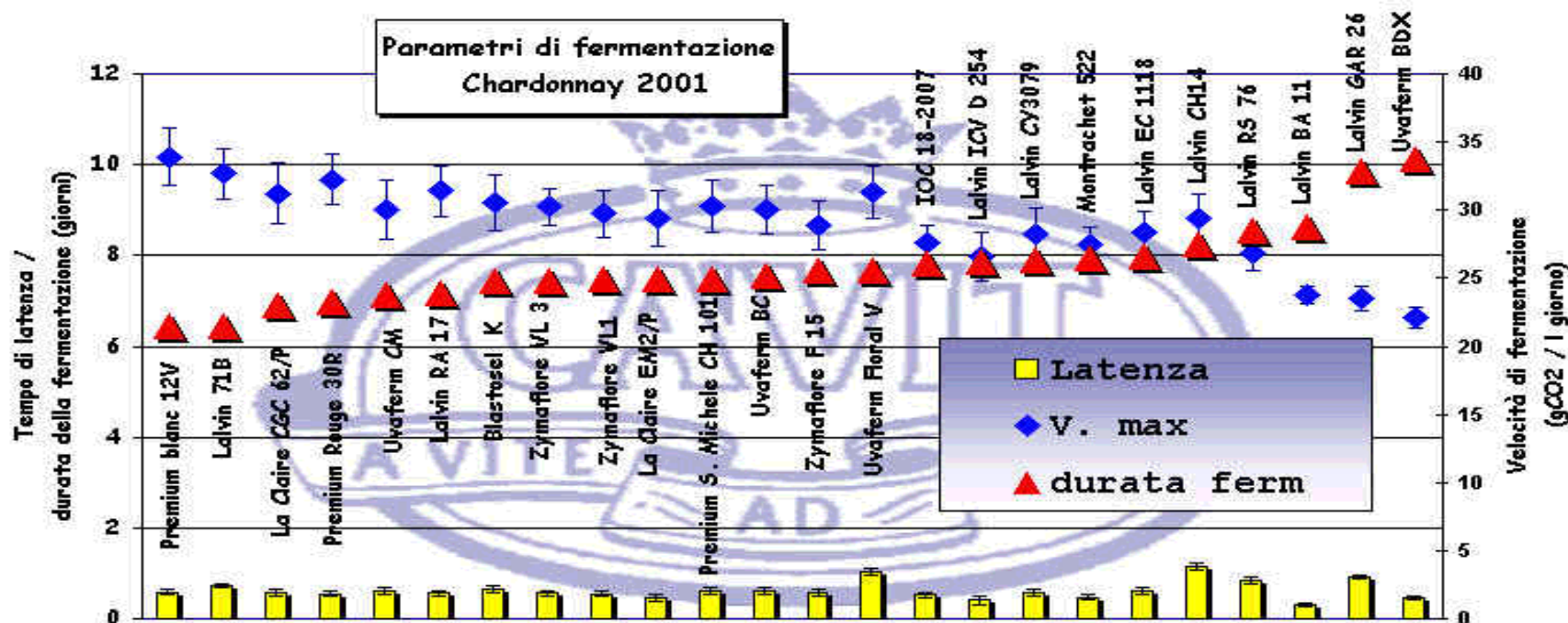


## Tempranillo Rioja Media, campaña 2003

- **Depósito 1 : Inoculación L.S.A. Uvaferm BC 25 g/Hl, día 3**
- **Depósito 2 : Levaduras Indígenas**
- **Depósitos 3 y 4 : Inoculación L.S.A. Uvaferm BC 25 g/Hl, encubado**

# Seguridad y Rapidez en FOH

## Fase de Latencia, Velocidad y Duración de FOH



# Seguridad y Rapidez en FOH

## Azúcares Residuales

Figura n°4a. Población de levaduras indígenas de las bodegas mediterráneas: sus potencialidades enológicas

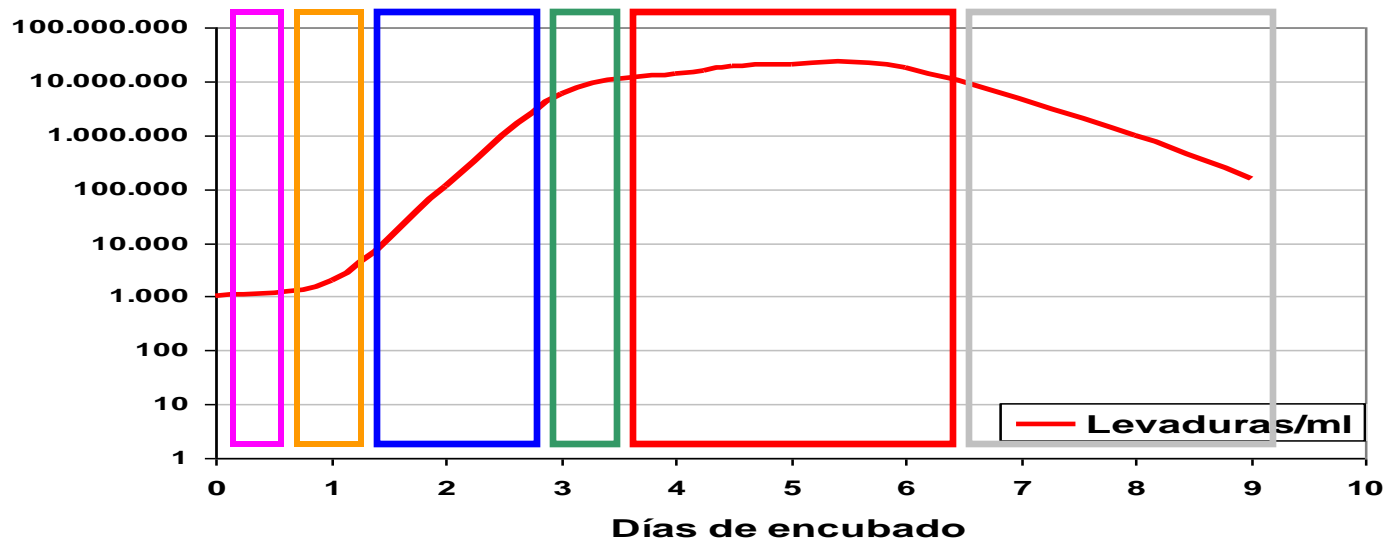




# Ciclo de Crecimiento

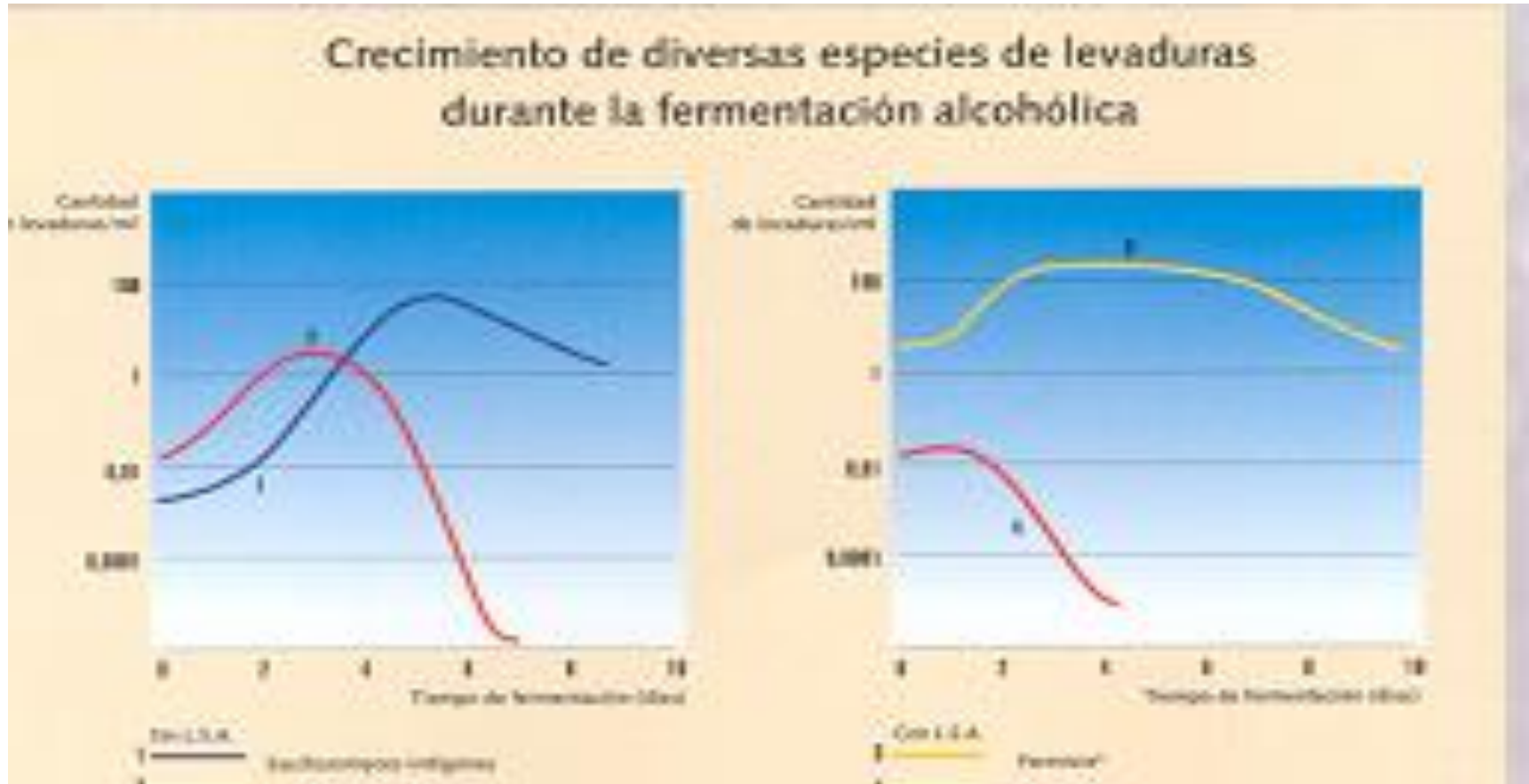
A thick, horizontal yellow brushstroke with a textured, painterly appearance, extending across the width of the slide below the title.

# Ciclo de Crecimiento de Levaduras



- **LATENCIA:** Adaptación de las levaduras al medio
- **ACELERACIÓN:** Comienzo de multiplicación celular
- **CRECIMIENTO EXPONENCIAL:** Desprendimiento de CO<sub>2</sub> visible
- **RALENTIZACIÓN DEL CRECIMIENTO:** Factores limitantes, crecimiento lento
- **ESTACIONARIA:** Población estable, activa
- **DECLIVE:** Pocas levaduras tienen que acabar con restos de azúcar

# Efecto de inoculación en levaduras no *Saccharomyces*

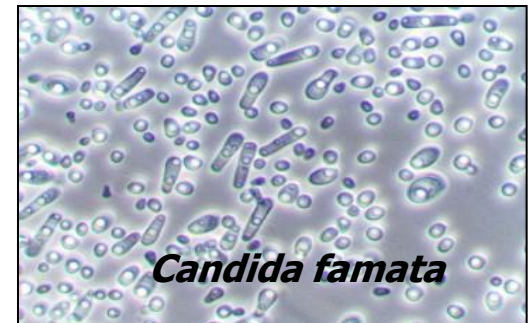


# Levaduras Espontáneas

***Kloeckera apiculata* y *Hanseniospora uvarum*:**

- Dominantes en las uvas del viñedo.
- Poblaciones  $> 10^6$  ufc/ml en los primeros días de fermentación.

Otras: ***Candida*, *Pichia*, *Hansenula***



# Origen de Levaduras Espontáneas

Figura n°1. Dinámica de las poblaciones de levaduras indígenas en las uvas mediterráneas, en el viñedo.

Cosecha: 1984. Prensado estéril de las uvas. Observación microscópica luego de 4 días de incubación a 28°C

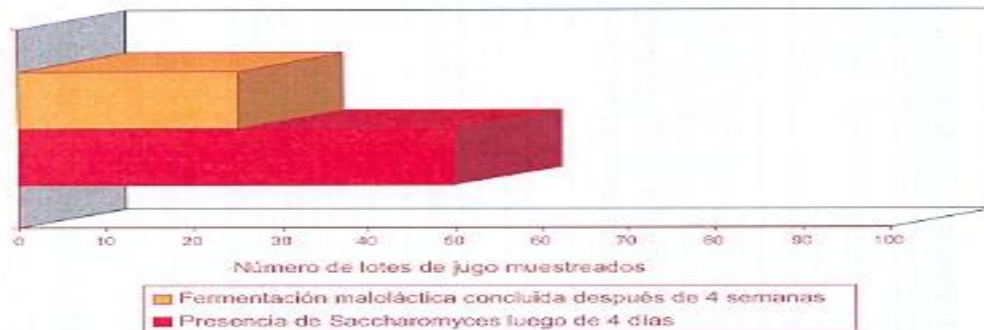
## VIÑEDO



Figura n°2. Dinámica de las poblaciones de levaduras indígenas en las uvas mediterráneas que llegan a la bodega

Cosecha: 1984. Prensado estéril de las uvas. Observaciones microscópicas luego de 4 días de incubación a 28°C y de 4 semanas a 28°C.

## MATERIAL TRANSPORTE



# Levaduras "Apiculadas"

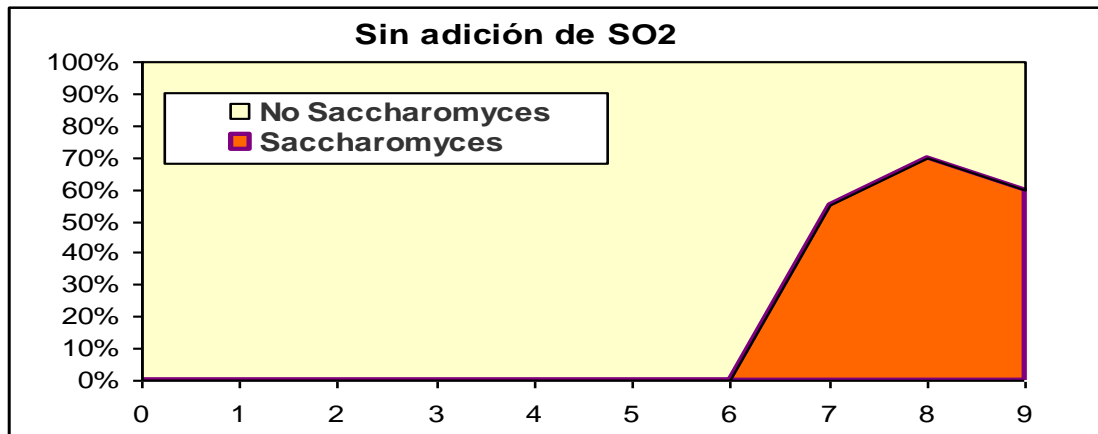
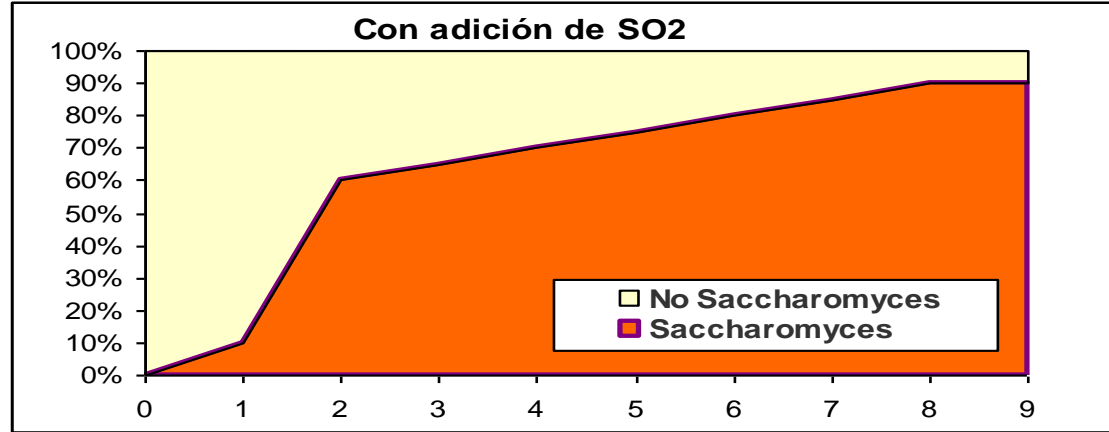
- **OXIDATIVAS**
- **ALTA PRODUCCIÓN DE ACIDEZ VOLÁTIL**
- **RENDIMIENTO ALCOHÓLICO 4-5 % Vol**
- **CAPTAN RÁPIDO NUTRIENTES**



**dificultan implantación  
de *S. cerevisiae***

- **SENSIBLES A:**
  - **SO<sub>2</sub>**
  - **ANAEROBIOSIS (AUSENCIA DE O<sub>2</sub>)**
  - **ETANOL**
  - **ALTAS TEMPERATURAS (> 25 °C)**

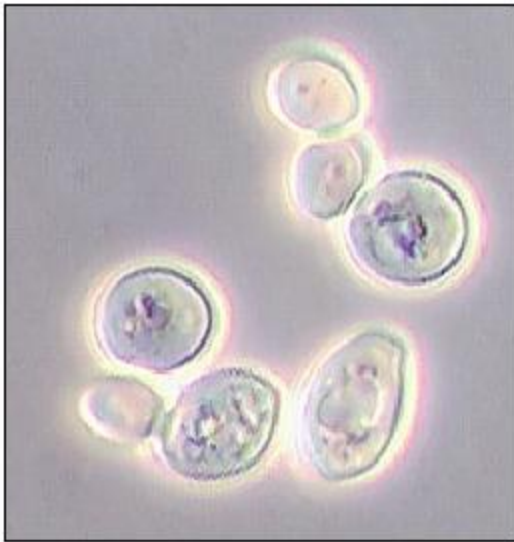
# Efecto del SO2 en las levaduras



**Dinámica de Poblaciones en fermentación de Garnacha según adición de sulfuroso.**

Albert Mas, SEVI, Núm 2.750, 24-4-99

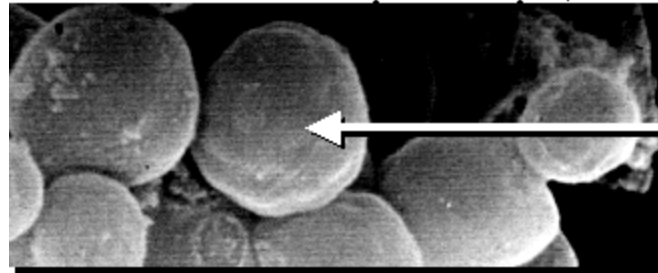
# Saccharomyces cerevisiae



## *Saccharomyces cerevisiae*

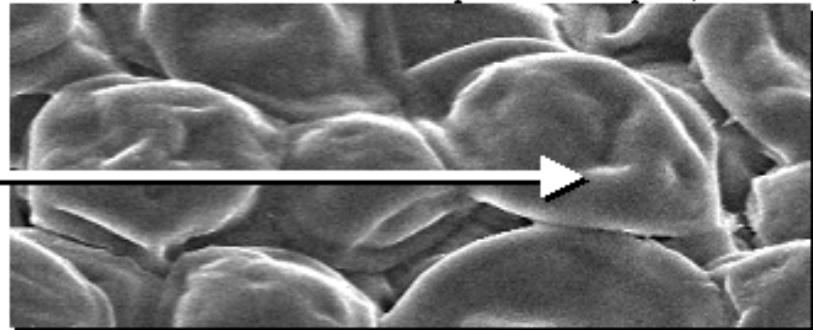
Bastante variables en su morfología celular y colonial.  
Generalmente esféricas, de gemación multilateral.  
Algunas cepas presentan marcas o cicatrices.

Crédit photo : INRA Montpellier, UMR SPO



Levures vivantes en bon état  
physiologique : les cellules sont  
turgescents avec un aspect de surface  
lisse

Crédit photo : INRA Montpellier, UMR SPO



Levures mortes après un stress violent :  
les cellules ont perdu leur contenu et  
ont un aspect ridé



# Levaduras Contaminantes

## Brettanomyces



- ▣ Fermenta azúcares residuales
- ▣ Adaptada a condiciones adversas
  - ▣ alcohol
  - ▣ pH ácido
  - ▣ falta de O<sub>2</sub>
- ⑩ Crecimiento lento
- ⑩ Metabolismo complejo
- ⑩ Desarrollo Impredecible

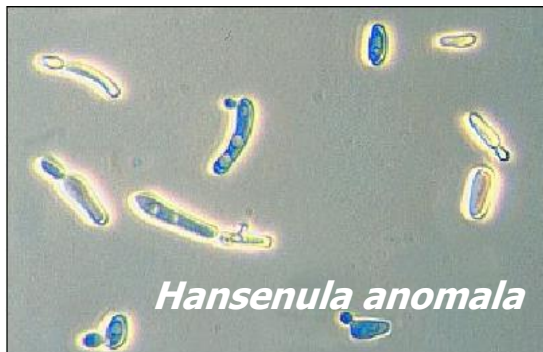
## ALTERACIÓN DEL VINO

- ▣ Ácido acético y acetato de etilo
- ▣ Polifenoles -> Fenoles Volátiles: Medicina, Cuero, Animal, Cuadra
- ▣ Metabolismo de Lisina : Gusto a Ratón
- ▣ ¿ Complejidad?
- ▣ **Control: HIGIENE y SO<sub>2</sub>**

# Levaduras Contaminantes

## LEVADURAS FORMADORAS DE VELO. "FLORES DEL VINO"

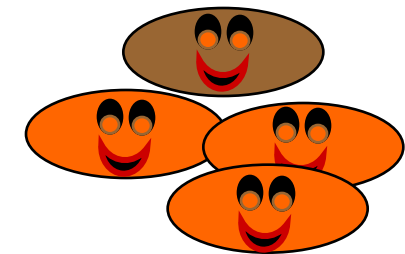
- ▣ **Velo blanquecino en la superficie del vino**
  - ▣ SO<sub>2</sub> Bajo
  - ▣ Presencia de Aire
  - ▣ Falta de Higiene
- ▣ **Etanol -> ácido acético -> acetato de etilo**
- ▣ **Control: Mantener Depósito lleno, SO<sub>2</sub>, Retirarlas**



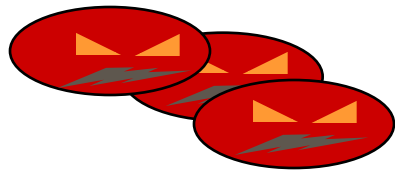
# Elección de Levaduras



# ¿Todas las levaduras son iguales?



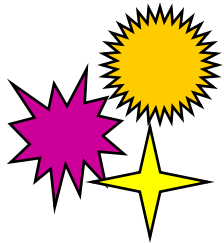
Buenas cepas *Saccharomyces*



Cepas malas *Saccharomyces*



Cepas no *Saccharomyces*



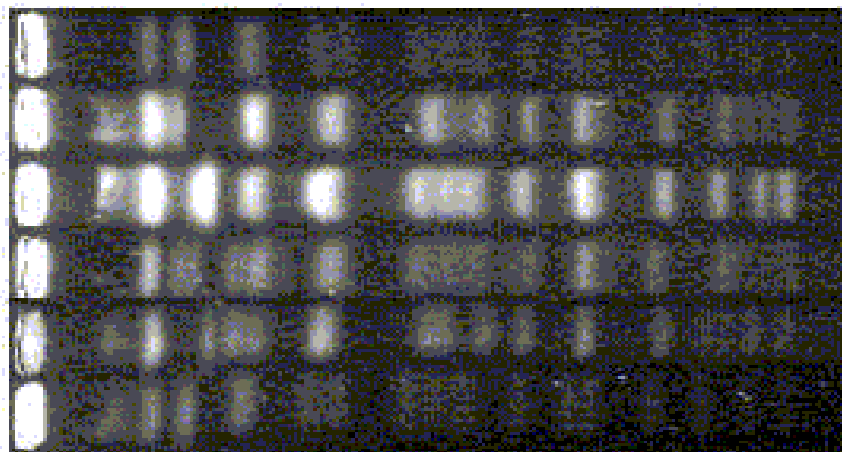
- Producción controlada y razonable de AV y  $H_2S$
- Posibilidad de controlar los niveles de producción de ésteres y alcoholes superiores
- Revelación de aromas varietales
- Enzimas de maceración
- Polisacáridos
- Manoproteínas
- ...

# Análisis de ADN



ISTITUTO AGRARIO  
DI SAN MICHELE ALL'ADIGE

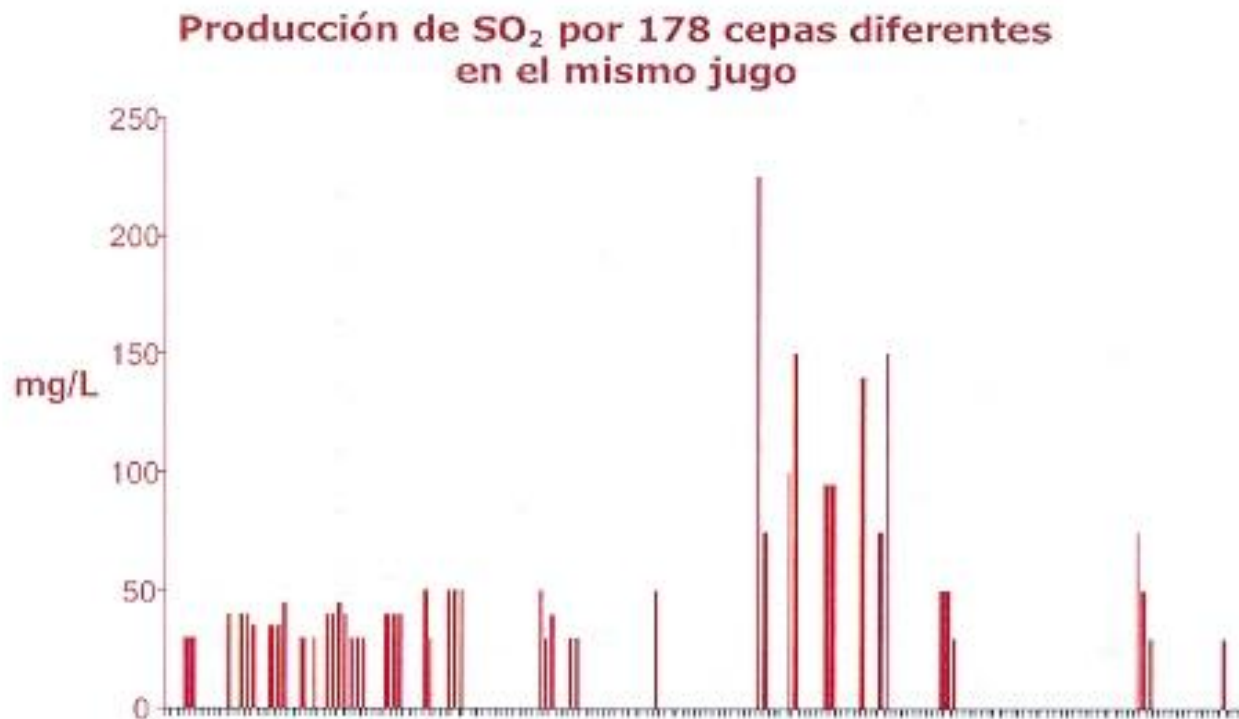
Marker  
IOC 18-2007  
Uvaferm BDX  
Floral V  
Uvaferm CM  
Marker



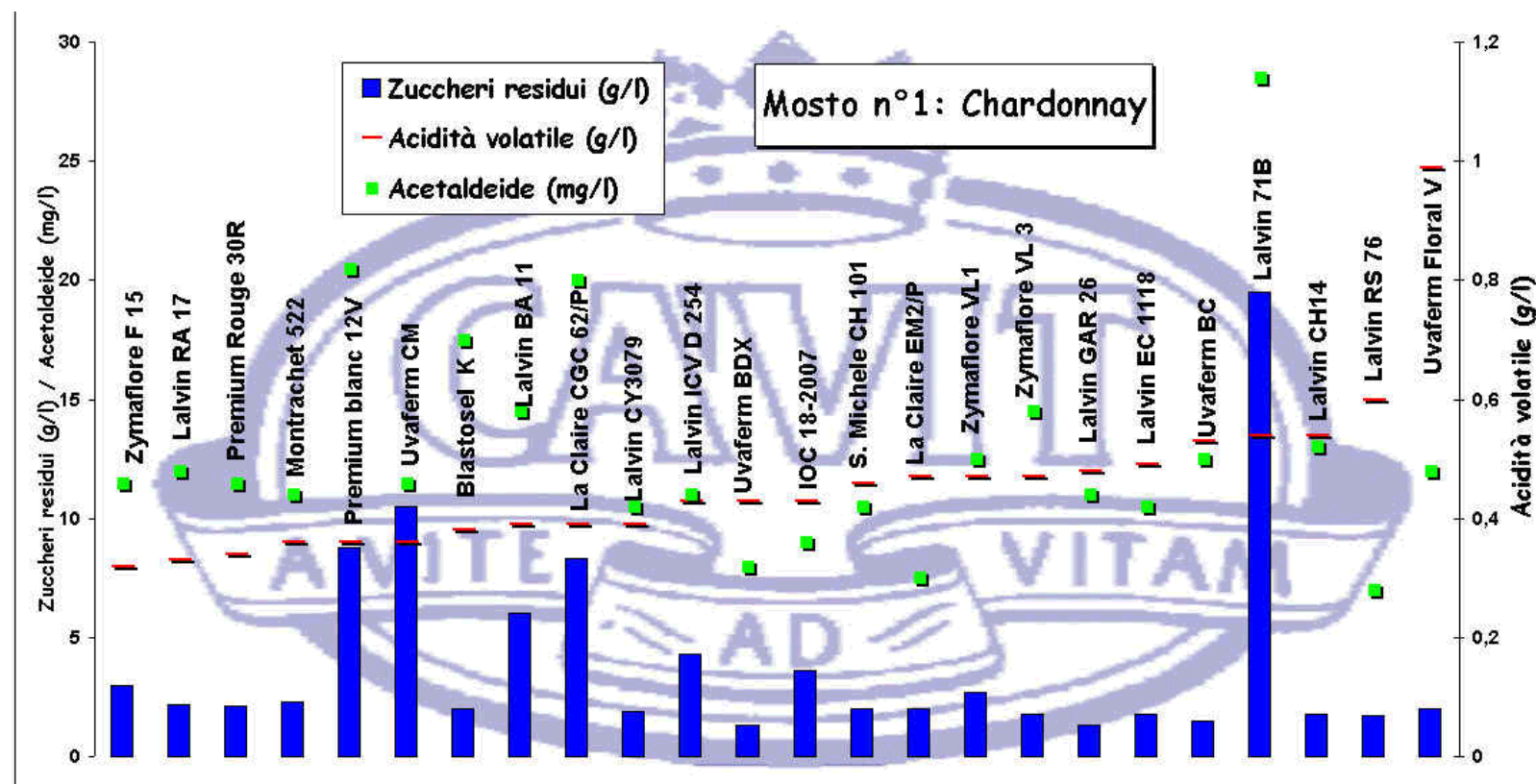
Marker  
IOC 18-2007  
Uvaferm BDX  
Floral V  
Uvaferm CM  
Marker

# Producción de Sulfuroso

**Figura n°4b. Población de levaduras indígenas de las bodegas mediterráneas: sus potencialidades enológicas**



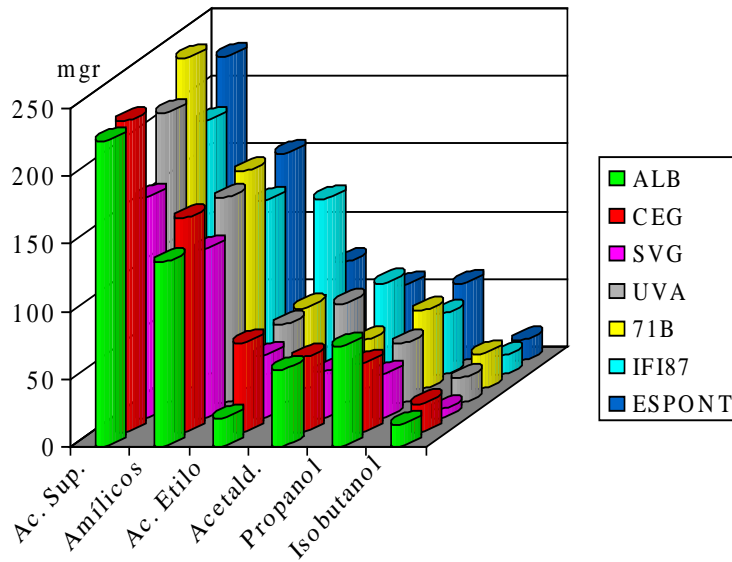
# Azúcares Residuales, Acidez Volátil



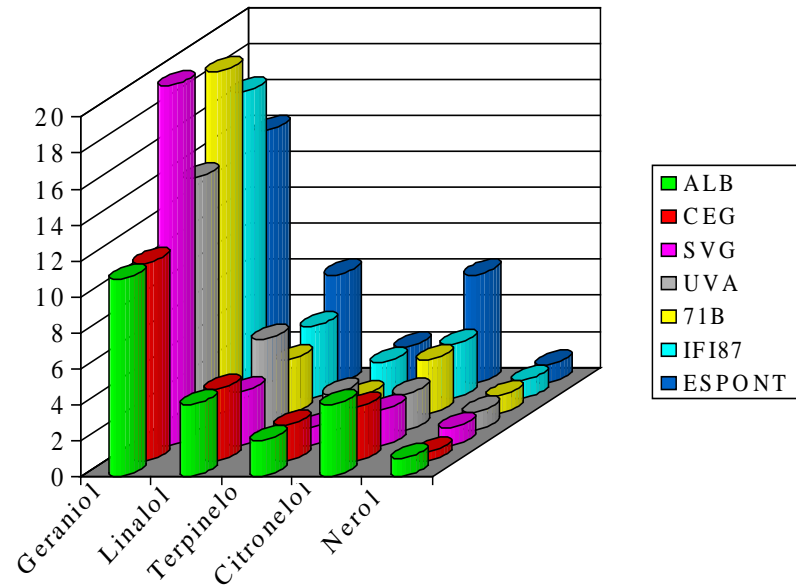
# ¿Todas las levaduras son iguales?

## Producción de Aromas

### De fermentación

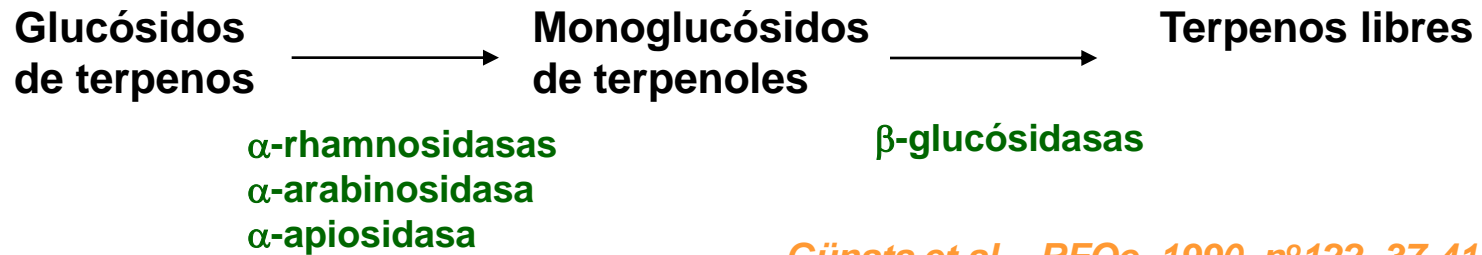


### Varietales



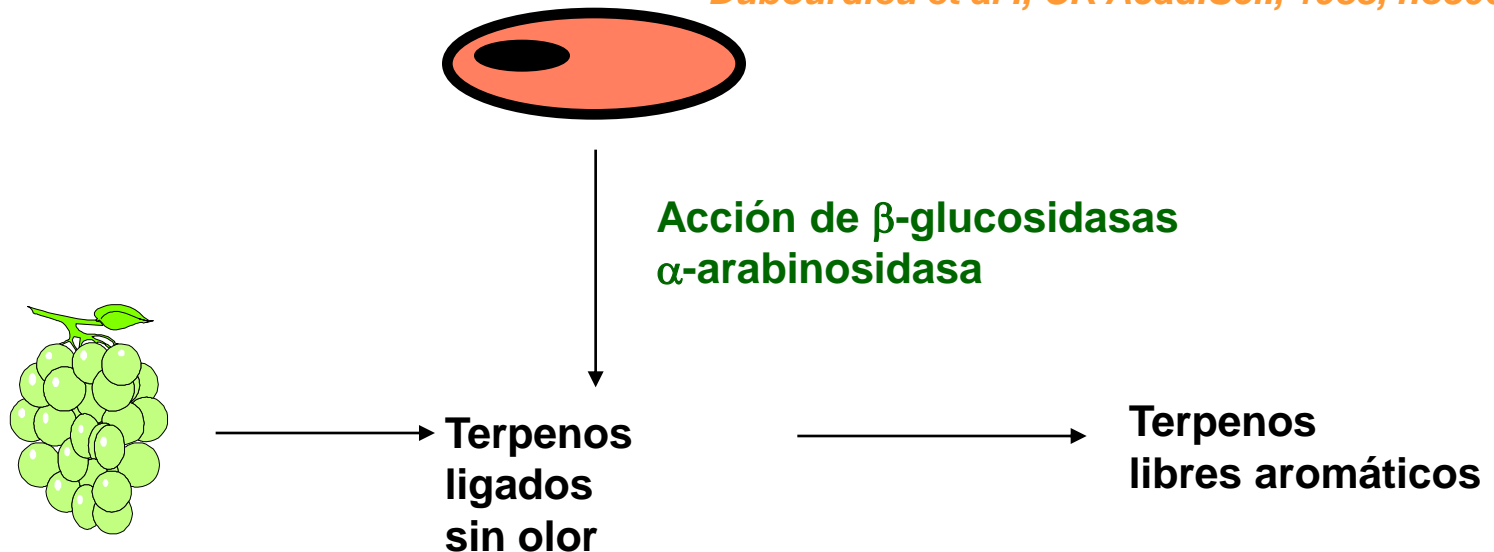


# Impacto de levaduras en Terpenos



*Günata et al ., RFOe, 1990, nº122, 37-41*

*Dubourdieu et al ., CR Acad.Sci., 1988, no306, 489-493*



# Efectos en la maceración

## Los 5 principales criterios de elección de una cepa de levadura para los vinos tintos de alta calidad:

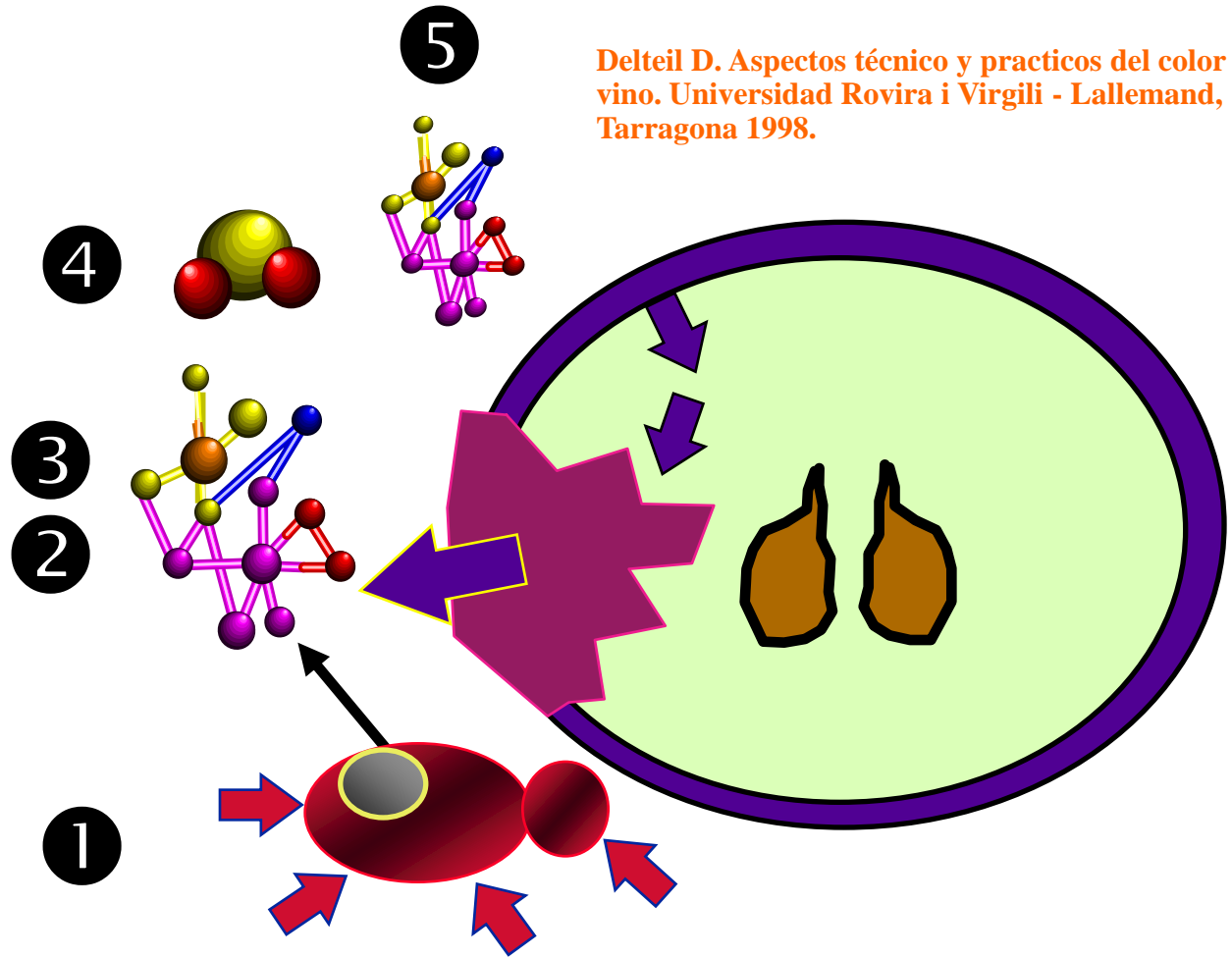
1 : no adsorción del color por las paredes celulares.

2 : producir un nivel elevado de manoproteínas durante la fermentación.

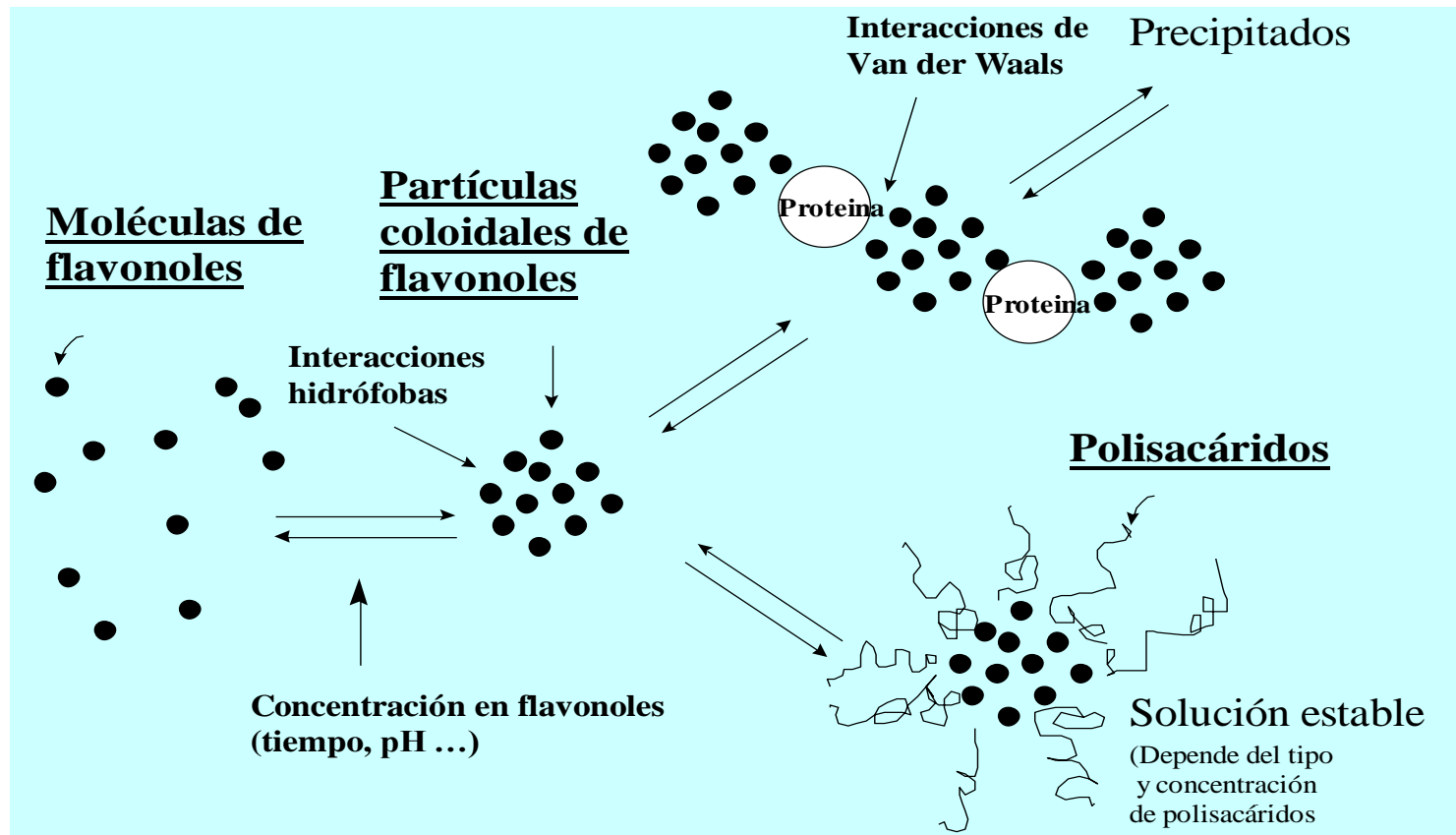
3 : liberar un nivel elevado de manoproteínas durante la autólisis post-fermentativa.

4 : no producir compuestos azufrados:  $H_2S$ , tioles, etc.

5 : no expresar actividad enzimática  $\beta$ -glucosidasa.

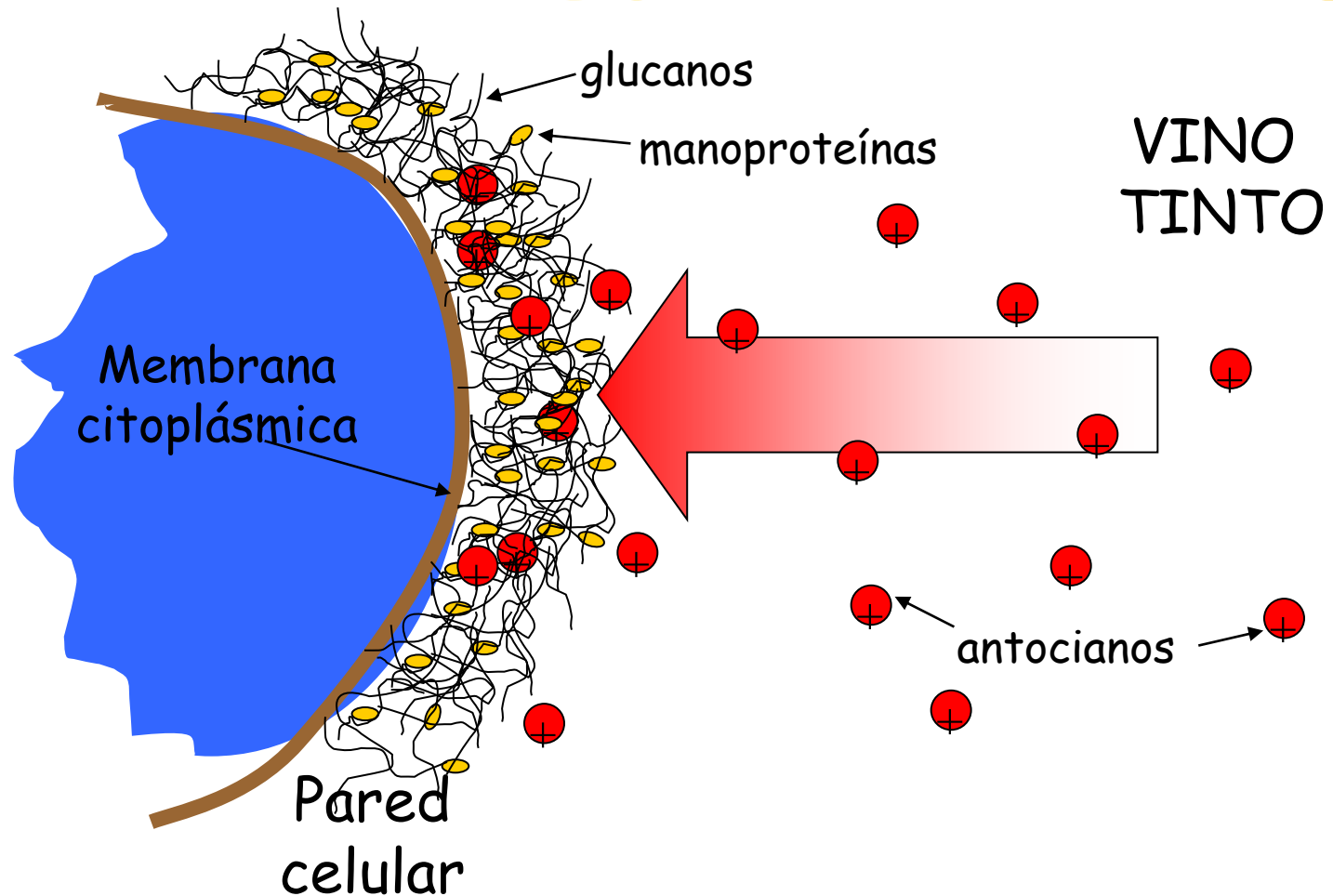


# Incremento de la redondez y la estabilidad de color



*(Saucier et al, 1996).*

# Adsorción de antocianos



# Efectos sobre el color



# Elección de levaduras

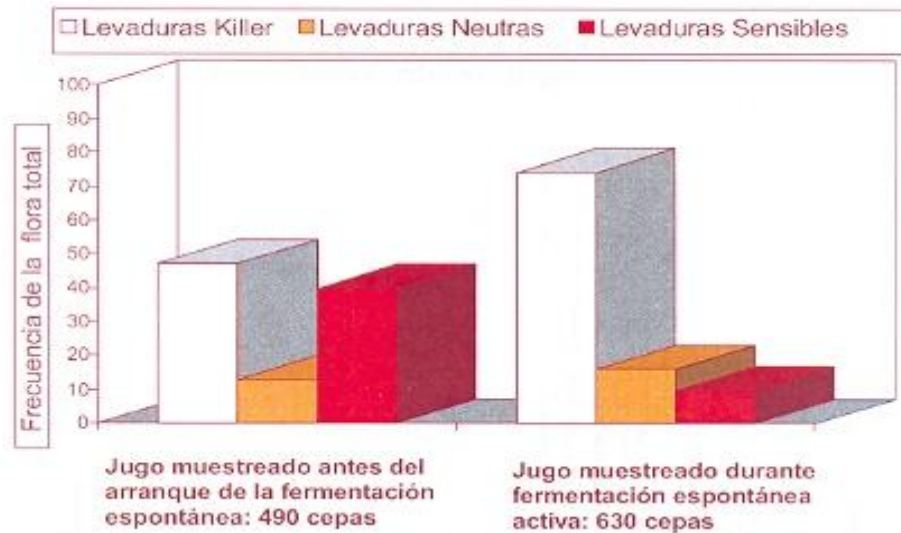
Cepas aconsejadas según aplicaciones y características principales.

CEPA	VINO BLANCO			VINO TINTO			CAVA						
	Joven afrutado	Complejo aromático	Ferm. en barrica	Afrutado y rosados	Fresco joven	Crianza		Paradas de ferm.	Resist. SO <sub>2</sub>	Necesidad nutrientes	Resist. baja temp	Carácter Killer	Raza fisiológica
M-1107									◆◆◆	◆◆	◆	Neutra	<i>cerevisiae</i>
C-1108								◆◆	◆◆	◆	◆◆◆	Neutra	<i>bayanus</i>
M 69	◆◆	◆◆◆							◆◆◆		◆	Killer	<i>cerevisiae</i>
T-73				◆◆	◆◆◆				◆◆	◆	◆	Killer	<i>bayanus</i>
NA-33 Mix	◆◆	◆◆◆		◆◆◆					◆◆	◆◆	◆◆	Neutra	<i>cerevisiae</i> + <i>bayanus</i>
RV-1					◆	◆◆◆			◆◆	◆		Sens.	<i>cerevisiae</i>
ICV K1	◆◆◆			◆◆				◆	◆◆◆		◆◆◆	Killer	<i>cerevisiae</i>
ICV- D47		◆◆◆	◆◆						◆◆	◆	◆◆◆	Killer	<i>cerevisiae</i>
ICV D254						◆◆◆			◆◆			Neutra	<i>cerevisiae</i>
ICV GRE				◆◆◆	◆◆◆				◆◆			Killer	<i>cerevisiae</i>
EC 1118	◆						◆◆◆	◆◆	◆◆	◆	◆◆◆	Killer	<i>bayanus</i>
CY3079		◆◆	◆◆◆						◆◆	◆◆	◆◆◆	Neutra	<i>cerevisiae</i>
1033	◆◆◆								◆◆	◆	◆◆	Killer	<i>cerevisiae</i>
L2226						◆◆◆		◆◆	◆◆	◆		Killer	<i>cerevisiae</i>
L43								◆◆◆	◆◆◆		◆◆◆	Neutra	<i>bayanus</i>



# Levaduras Killer

Figura n°3. Población de levaduras indígenas de las bodegas mediterráneas: sus potencialidades competitivas



## Clasificación de Levaduras

- **Killer:** producen factor Killer
- **Sensibles:** son sensibles al factor Killer
- **Neutras:** no producen factor Killer ni son sensibles a él
- **Suicidas:** producen factor Killer y son sensibles a él. Muy raras.

# Elección de levaduras

CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS	Cepas tradicionales			Cepas Específicas								Esp	
	CM	BC	CEG	CS2	ALB	VRB	UVA	QA23	71B	L2056	BDX	BM45	PM
Comienzo rápido de la fermentación													
Velocidad alta de fermentación													
Capacidad de prevalencia													
Resistencia a alta temperatura													
Criotolerancia													
Elevado rendimiento alcohólico													
Resistencia al etanol													
Baja acidez volátil													
Baja producción de acetaldehído													
Alta producción de glicerina													
Respeto de la acidez original													
Capacidad demalicante													
Producción de aromas fermentativos													
Exaltación de aromas varietales													
Aroma neutro en fermentación													
Escasa exigencia nutricional													
Intenso color al final de la fermentación													
Estabilidad del color													
Reducción de caracteres de astringencia													
Efecto favorable para la FML													
Efecto desfavorable para la FML													
Permite expresión tánica													

☐ Cepa dentro de la norma.  
☒ Expresión del carácter.  
☒ Expresión del carácter de forma especial.



# Elección de levaduras

## Origen

Cepa (n°7013) seleccionada en Corbières por el INRA de Narbona.

## Aplicación

FERMIVIN® es una levadura de tipo starter que garantiza la elaboración de todo tipo de vino.

## Propiedades enológicas

### ■ Cinética de fermentación

- Fase de latencia corta, cinética rápida y regular.

### ■ Rendimiento azúcar/alcool

- 16,5 g de azúcar por un 1 % de alcohol.

### ■ Características tecnológicas

- Intervalo óptimo de temperatura: 15 a 35°C.
- Tolerancia al alcohol: 14% en condiciones estándar, 16% en presencia de nutrientes nitrogenados.
- Resistencia al SO<sub>2</sub> libre: 50 mg/l.
- Baja producción de espuma.

### ■ Características del metabolismo

- Producción de glicerol media a fuerte, 6 a 8 g/l.
- Producción de acidez volátil baja, generalmente inferior a 0,15 g/l.
- Producción de acetaldehído baja, inferior a 20 mg/l.
- Producción de alcoholes superiores baja (vinos aptos a la destilación).
- Producción de H<sub>2</sub>S baja.
- Producción de SO<sub>2</sub> baja, inferior a 10 mg/l.

### ■ Fenotipo: neutro con factor killer.

- Degrada parcialmente el ácido málico (20 a 30%) y favorece así el inicio de la fermentación maloláctica.

- Posee una buena capacidad de fermentar mostos muy trasegados.

## Dosis de empleo

FERMIVIN® contiene 25 mil millones de células secas activas por gramo. Dosis recomendada: 20 g/hl.

## Origen

Cepa (n°7303) seleccionada en la región de Burdeos por el INRA de Narbona.

## Aplicación

FERMIROUGE® es una levadura seleccionada para la producción de vinos tintos afrutados y equilibrados ("media guardia").

FERMIROUGE® está particularmente adaptada a la vinificación de las cepas Garnacha, Tempranillo, Gamay, Pinot noir, Cabernet Franc, Merlot, Cabernet Sauvignon, ...

## Propiedades enológicas

### ■ Cinética de fermentación

- Fase de latencia corta, cinética regular.

### ■ Rendimiento azúcar/alcool

- 16 g de azúcar por un 1 % de alcohol.

### ■ Características tecnológicas

- Intervalo óptimo de temperatura : 10 a 28°C.

La temperatura máxima debe ser minuciosamente controlada para una eficacia óptima.

- Resistencia al alcohol: 15%.
- Resistencia al SO<sub>2</sub> libre: 50 mg/l.
- Baja producción de espuma.

### ■ Características del metabolismo

- Producción de glicerol media, 5 a 7 g/l.
- Producción de acidez volátil baja, generalmente inferior a 0,2 g/l.
- Producción de acetaldehído baja, inferior a 20 mg/l.
- Producción de H<sub>2</sub>S baja.
- Producción de SO<sub>2</sub> baja, inferior a 10 mg/l.

### ■ Fenotipo: neutro con factor killer.

■ Favorece una extracción moderada de polifenoles (materias colorantes y taninos), y el desarrollo de aromas afrutados (fresa, frambuesa, cereza).

■ Posee buena aptitud para fermentar los mostos provenientes de maceración en frío (carácter criófilo).

# Rehidratación e Inoculación



# Eficacia de la Inoculación



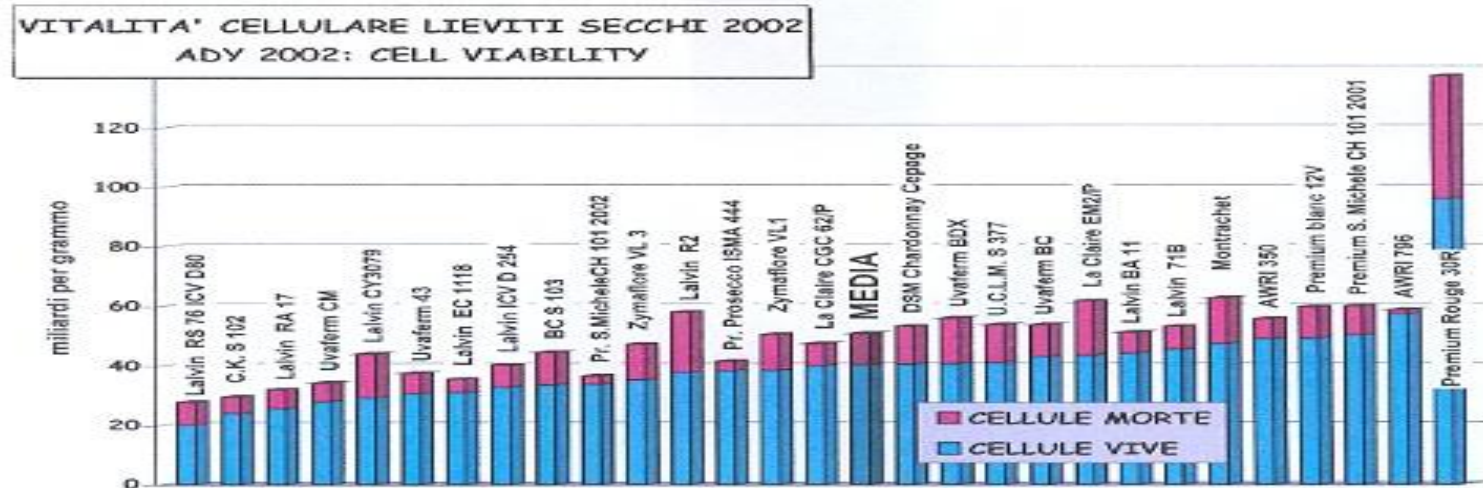
⌘ DOSIS

⌘ CONSERVACIÓN

⌘ REHIDRATACIÓN

⌘ INOCULACIÓN

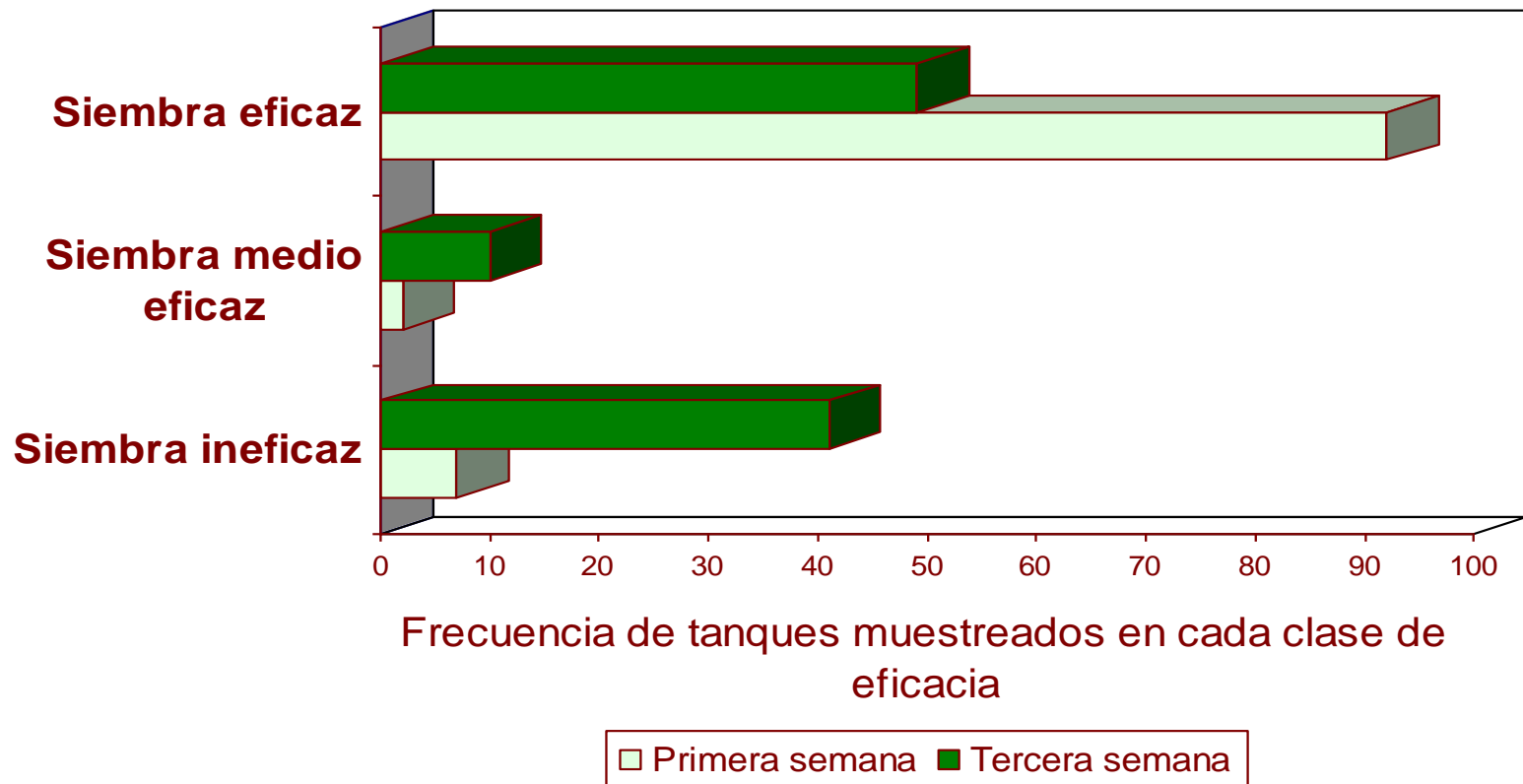
# Dosis. 100 LSA / 1 Indígena



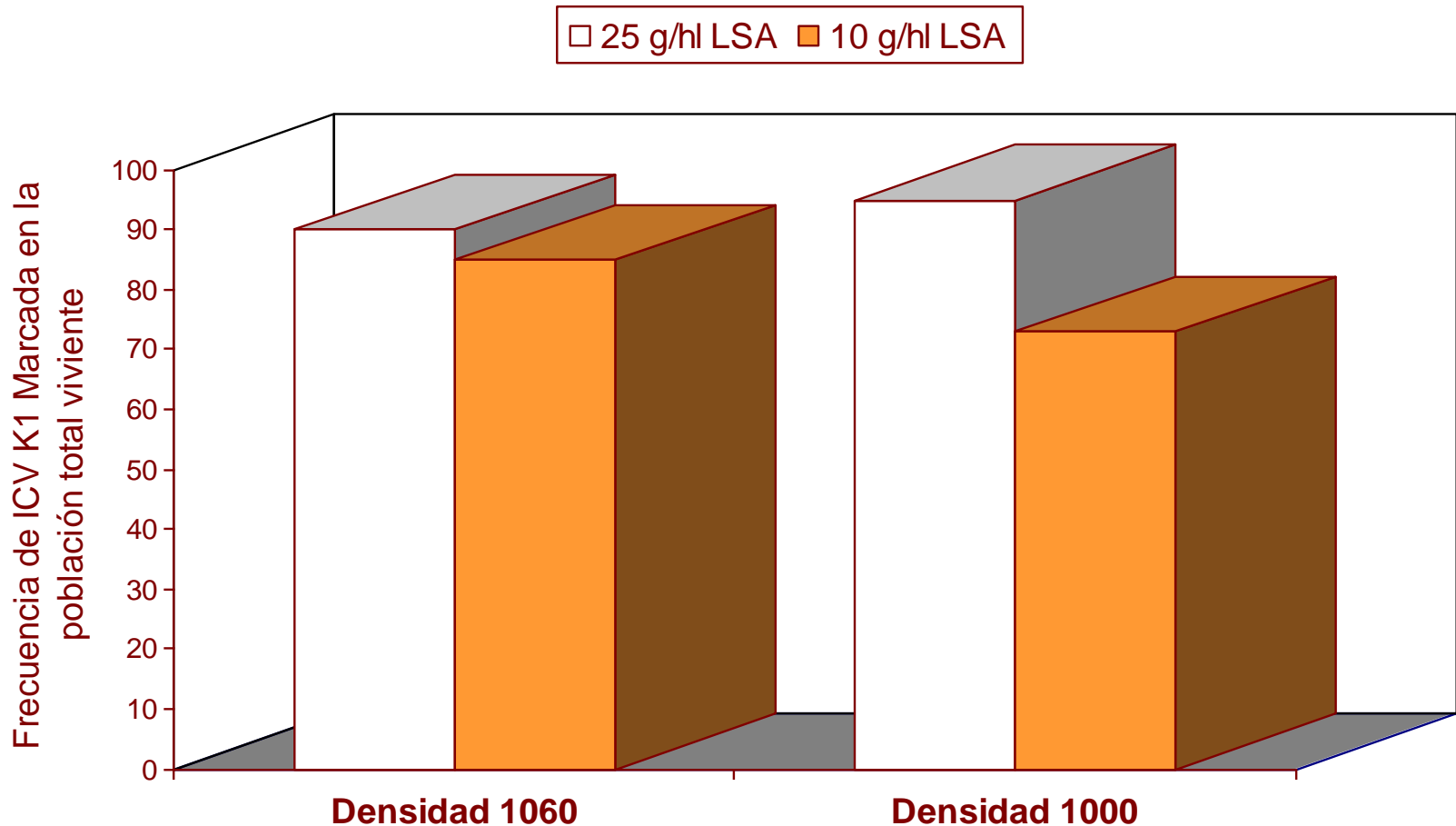
I parametri sottoposti a controllo sono stati:

- **Población de Levaduras Indígenas:  $10^3$  -  $10^5$  levaduras/ml**
  - Clima, Higiene,  $SO_2$ , Momento de Vendimia
- **$20 \times 10^9$  L.S.A./g**
  - **Dosis: 10 g/Hl** =  $20 \times 10^{10}$  L.S.A./Hl =  **$2 \times 10^6$  L.S.A./ml**
  - **Dosis: 20 g/Hl** =  $40 \times 10^{10}$  L.S.A./Hl =  **$4 \times 10^6$  L.S.A./ml**
  - **Dosis: 40 g/Hl** =  $80 \times 10^{10}$  L.S.A./Hl =  **$8 \times 10^6$  L.S.A./ml**

# Aumentar la dosis al avanzar la vendimia

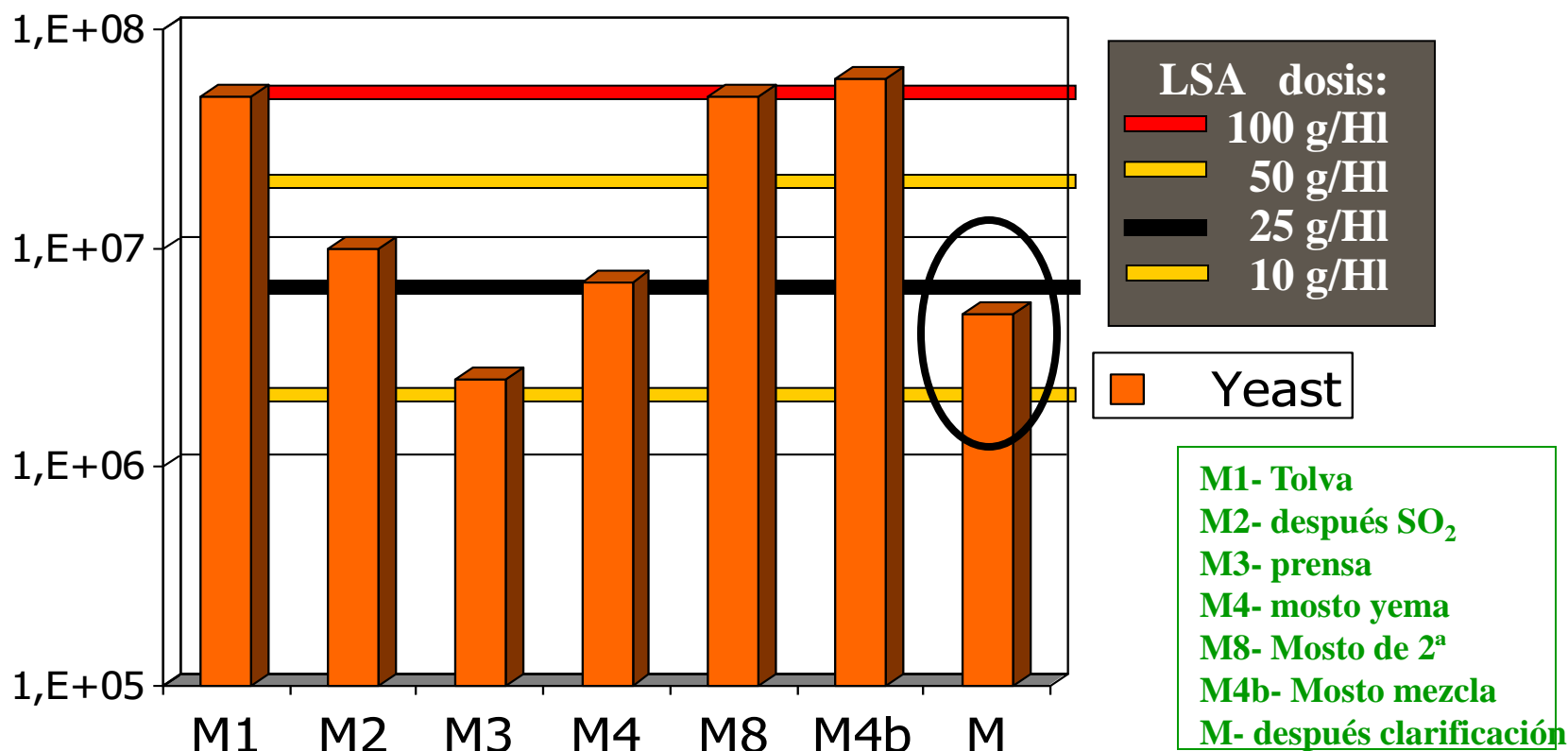


# Dosis de Inoculación y eficacia de implantación. Tinto



# Dosis y Momento de Inoculación

Línea de Prensa Continua. Población de levaduras, (log. u.f.c./mL).



# Condiciones de Conservación

⌘ L.S.A. : levaduras desecadas, con solo un 8% de agua

⌘ Advertencias para la conservación

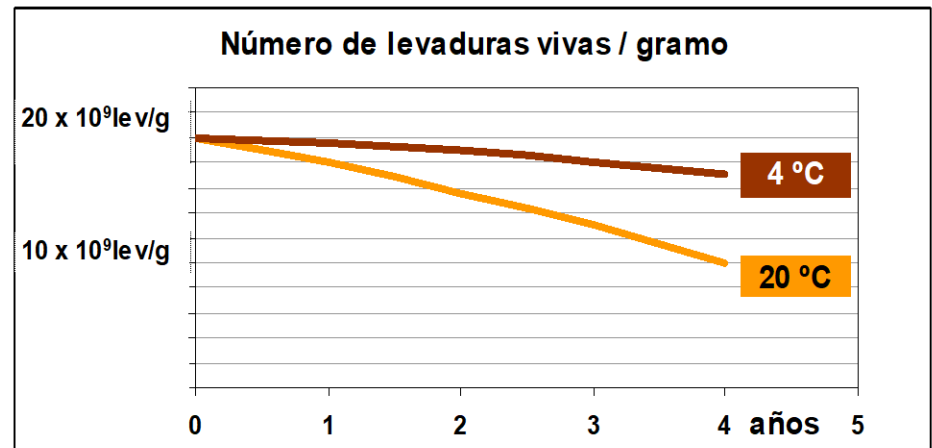
☑ Mantener bien cerrado el envase

☑ Conservar en lugar fresco; si es posible, refrigerado

⌘ Pérdida de vitalidad:

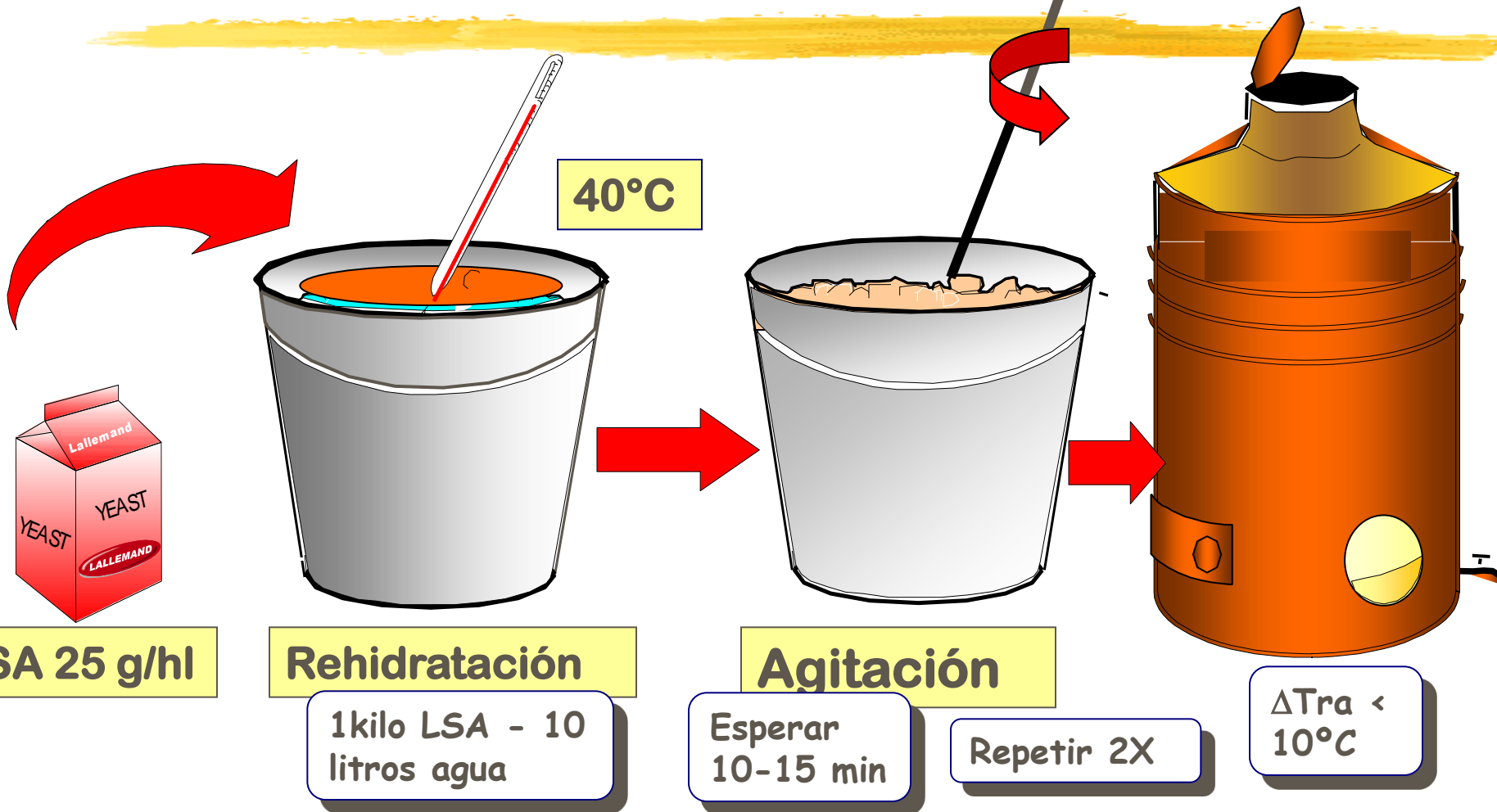
☑ 10 % de pérdida anual a temperatura ambiente (20°C)

☑ Aumentar la dosis





# La Rehidratación de las Levaduras



**NO ESPERAR MÁS del TIEMPO INDICADO**

# Recomendaciones de Rehidratación



## ⌘ Evitar choques térmicos

- ☒ no emplear agua  $< 30^{\circ} \text{C}$
- ☒ evitar  $\Delta T > 10^{\circ} \text{C}$ , aclimatación paulatina

## ⌘ Rehidratar con agua mejor que con mosto

- ☒ azúcar, sulfuroso, fungicidas, levaduras autóctonas

## ⌘ Añadir la levadura al agua y no viceversa

- ☒ rehidratación uniforme, evitar formación de grumos

## ⌘ No superar 30 minutos de rehidratación

- ☒ si fuese necesario, añadir azúcar (20-50 g/l) y nutrientes N,P

# Momento de Inoculación



## ⌘ Lo más rápido posible

- ☑ Blancos: a la obtención del mosto, o tras el desfangado
- ☑ Rosado: a la obtención del mosto
- ☑ Tintos: al inicio del encubado
- ☑ Maceración carbónica: sobre el líquido de fondo, reinocular después del prensado

# Momento de Inoculación

Figure n°5a. Eficacia del levadurado directo en vinificación en tinto. Aporte de las levaduras secas activas desde el inicio del llenado de la cuba.

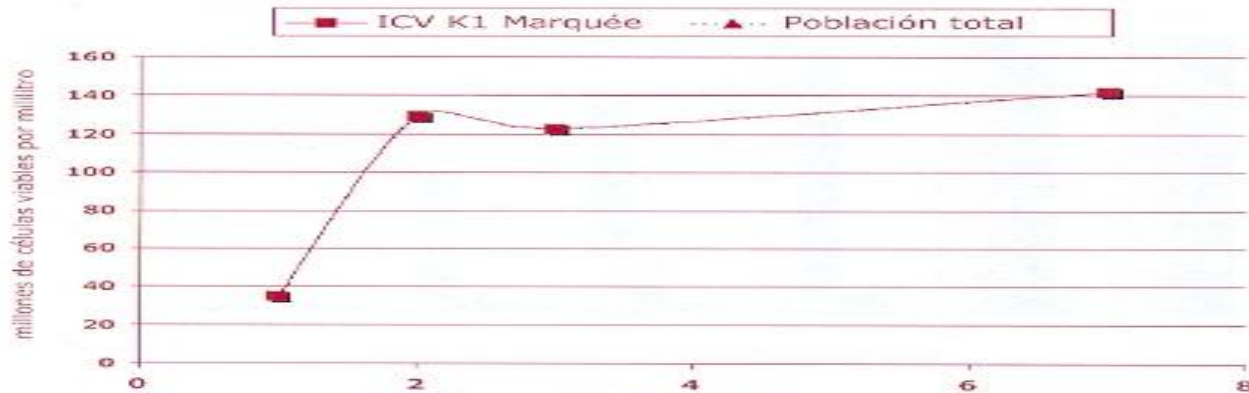
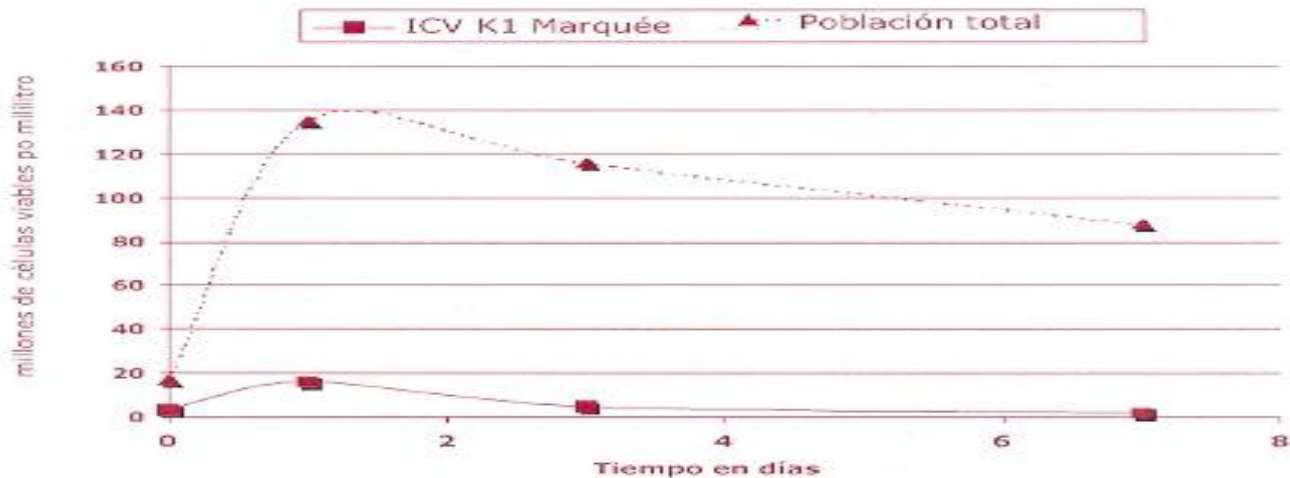
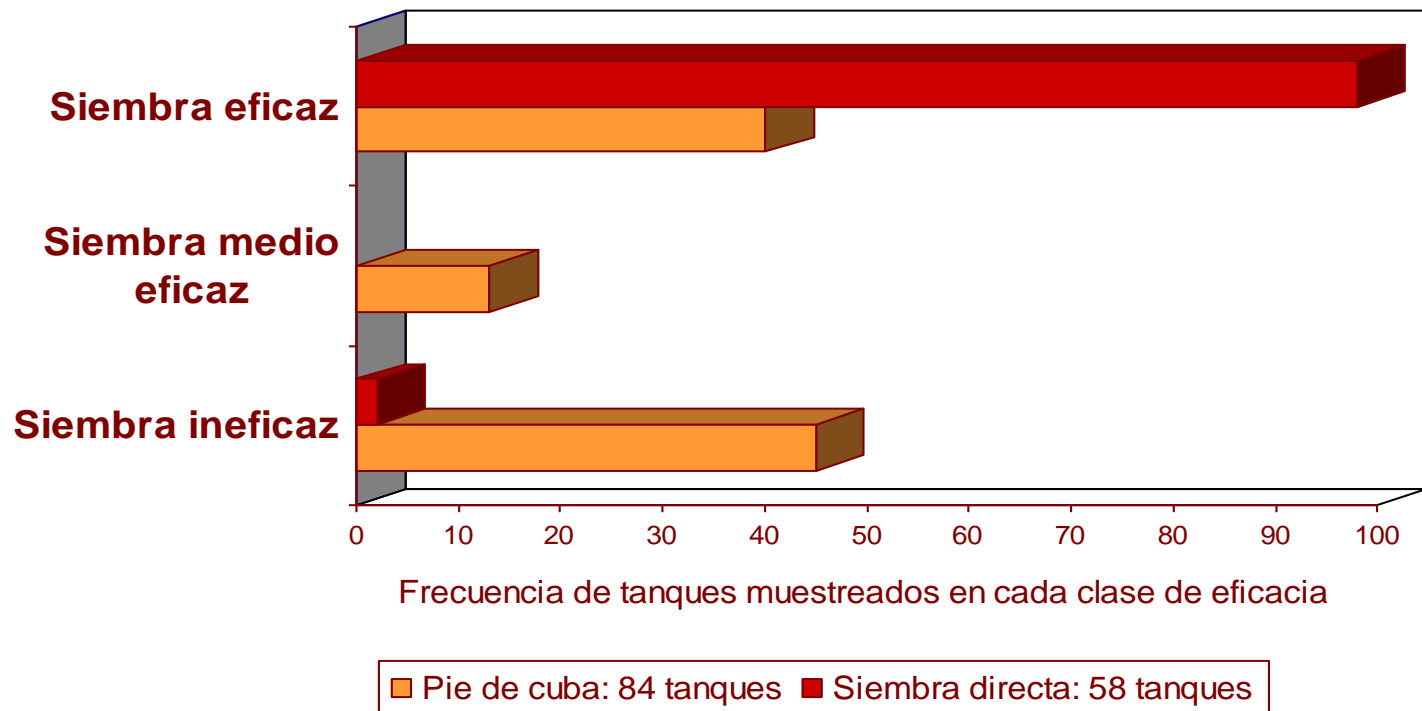


Figure n°5b. Eficacia del levadurado directo en vinificación en tinto. Aporte de las levaduras secas activas 36 horas después del llenado de la cuba

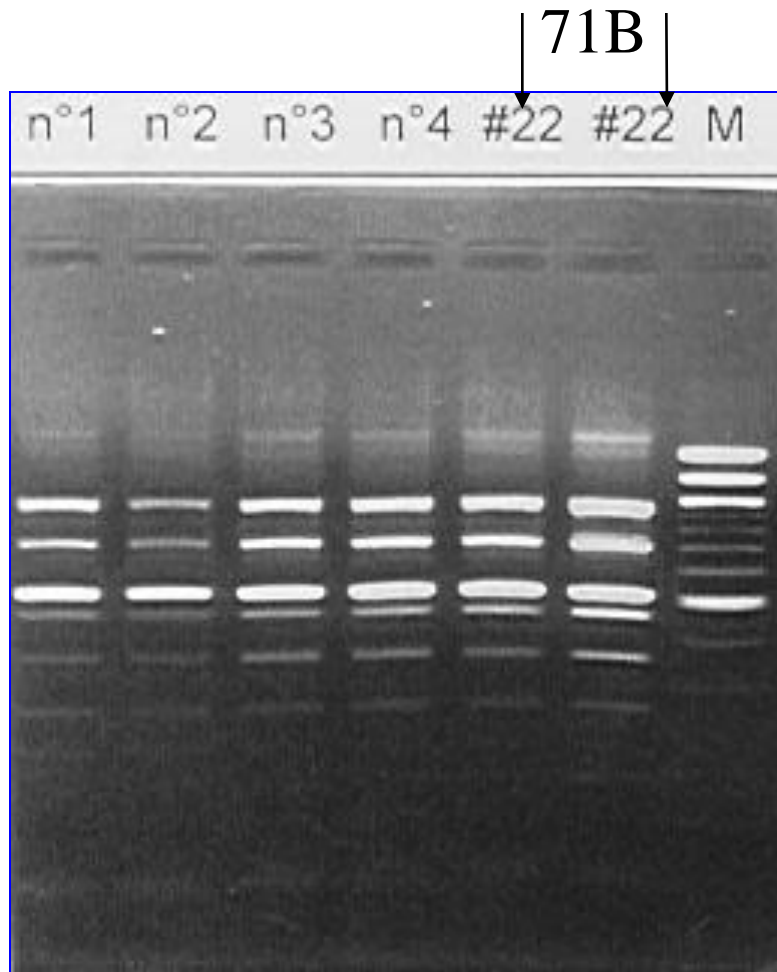


# Comparación entre siembra directa y pie de cuba



**142 tanques diferentes de 40 bodegas, vinificación en tinto**

# Análisis de Implantación



**PCR rapids**  
**DNA mitochondrial**  
**Fingerprinting**  
**ECP - PFGE**