

LEVADURAS NATIVAS PARA ENOLOGÍA DE MÍNIMA INTERVENCIÓN. BIODIVERSIDAD, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Carrau, F.M.¹

RESUMEN

Paradójicamente existe una gran biodiversidad de cepas de levaduras nativas presentes en las uvas y en la bodega, mientras que a nivel industrial existe una muy limitada cantidad de cepas de levaduras comerciales para su aplicación por el Enólogo. En este momento se considera que esta situación es una debilidad de la Enología, dado que uniformiza o limita la diversidad de vinos con identidad propia al utilizarse las mismas cepas comerciales en diferentes regiones del mundo. Esta situación también ocurre dado que para el Enólogo es más fácil trabajar con la inoculación de levaduras comerciales que intentar dominar la fermentación espontánea a nivel industrial. Además en este trabajo se muestra como en muchos casos las cepas comerciales no están bien adaptadas a las condiciones de los mostos regionales, principalmente por estar adaptadas a altos niveles de nitrógeno asimilable. Esto finalmente obliga a que se adicione amonio para evitar la producción de aromas defectuosos. Se plantea aquí dar una visión sobre el gran potencial que existe en la flora nativa presente en los viñedos, y como con métodos de selección racionales se logra obtener cepas que no necesitan de la adición de nutrientes para tener una fermentación normal y además contribuyen con una mayor complejidad aromática. Actualmente algunos enólogos tratan de disminuir la manipulación excesiva y la adición de productos extraños al vino, y esta tendencia es lo que llamamos "Enología de Mínima Intervención". Se discute la importancia de dominar la microbiología del proceso para disminuir al mínimo el agregado de sustancias extrañas al vino, como nutrientes, adyuvantes, conservantes o exceso de manipulaciones a los mostos o vinos a lo largo del proceso que ocasionan pérdida de calidad.

PALABRAS CLAVE: no-*Saccharomyces*, uvas, fermentación, aroma.

SUMMARY

NATIVE YEASTS FOR LOW INPUT WINEMAKING. BIODIVERSITY, SELECTION AND CHARACTERIZATION

Paradoxically, a great biodiversity exists of native yeast strains in grapes and wineries, while there is a very limited quantity of commercial strains available for industrial application. In this context some winemakers considered that this is a weakness of today's winemaking technology. Applications of the same commercial strains in different regions of the world result in ordinary products, limiting wine diversity and the development of a unique style by the winemaker. These situations also occur due to the more difficult alternative of utilizing and dominate spontaneous fermentation at industrial level. It is also discuss the fact that most commercial strains are not adapted to natural grape musts and are usually high nitrogen demand. This phenomenon promotes the addition of ammonium salts to prevent or solve the formation of undesired aroma compounds. There is a great potential in the grape native flora for the selection of low nitrogen demand strains, which would not need ammonium supplementation to the musts, would improved the complexity and the microbial stability of wines. Today, some winemakers are trying to work with the minimum manipulation of the grapes and avoid the use of additives to musts; this is what is defined as "Low Input Winemaking". The importance of Microbiology and Wine Biotechnology to decrease the use of external nutrients, preservatives, other additives and excessive manipulation of wine is discussed.

KEY WORDS: non-*Saccharomyces*, grapes, fermentation, wine aroma.

¹Sección Enología, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. E-mail:fcarrau@fq.edu.uy

INTRODUCCIÓN

Actualmente en la Enología, se sabe que la vinificación comienza en el viñedo, en primer término este proceso se puede mejorar con adecuadas variedades y su manejo para obtener cada vez mejor calidad de fruta. Este manejo de la viña y las características del terruño, van a influir sobre otros aspectos claves del proceso de la vinificación como son las características de la flora nativa de levaduras que llegaran a la bodega. Estas juegan un papel fundamental en la transformación del jugo de uva en vino, principalmente resaltando la expresión de los aromas de las variedades utilizadas y aportando aromas de fermentación que pueden enriquecer el vino obtenido en intensidad y complejidad sensorial. Dado que este proceso de la vinificación no es estéril y ni debería serlo por razones de calidad, existirá una gran biodiversidad de levaduras en la bodega a pesar de que actualmente en muchos casos se inoculan levaduras comerciales. Algunos enólogos, hoy en día buscan disminuir al mínimo la utilización de productos externos al vino para corregir defectos en la composición del mosto o su equilibrio químico, dado que estiman que hay pérdida de calidad cuanto mas tratamientos se realicen de este tipo, promoviendo así la “Enología de Mínima Intervención”. Por ejemplo, uno de los problemas mas serios en la industria del vino es la formación de aromas azufrados, como el sulfhídrico, debido a una carencia de fuentes nitrogenadas o en la mayoría de los casos al uso de levaduras comerciales de alta demanda de nitrógeno que no están adaptadas a las condiciones naturales de un mosto (Henschke, 1998; Carrau, 2003). En este caso, una de las soluciones que se ha encontrado es el agregado de sales de amonio, una operación que es hoy muy utilizada por los enólogos. Sin embargo, actualmente se trata de evitar los riesgos de su uso indiscriminado. Por ejemplo, las principales causas que hacen considerar estas adiciones como no convenientes tecnológicamente son, **1**). La formación de compuestos potencialmente cancerígenos como los etilcarbamatos, **2**). Un exceso de amonio resulta en mayor cantidad de residuos de aminoácidos como la histidina, precursores de la histamina, **3**). La falta de estabilidad posterior en el vino por un exceso de nitrógeno que puede facilitar la acción de microorganismos perjudiciales desde el punto de vista sensorial en la crianza, y **4**). El desequilibrio del perfil aminoácido típico de determinada variedad, que puede ocasionar cambios sensoriales en el vino final que afectan la tipicidad varietal.

Uno de los objetivos de nuestro grupo de investigación es la selección de cepas de baja demanda de nitrógeno y el estudio de la habilidad de estas para utilizar eficientemente el nitrógeno del mosto. El efecto de la com-

petencia en cultivos mixtos, su relación con los aromas y la detención de la fermentación son temas en los que se ha avanzado mucho en los últimos años (Carrau *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 1997). Se ha comprobado que las cepas comerciales en su mayoría se han aislado o adaptado a condiciones de alto contenido de nitrógeno, lo que hace que no estén bien adaptadas a los mostos de uva a nivel industrial. De esta manera algunas producen aromas no agradables o baja concentración de aromas frutales si no son suplementados los medios con amonio (Carrau, 2003).

Actualmente se esta estudiando las diferencias entre cepas del tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* durante el proceso prefermentativo y fermentativo en los mostos y su efecto en el vino final. La caracterización quimiotaaxonomica de cepas de uso industrial según el perfil aromático obtenido ha permitido la selección de cepas de baja demanda de nitrógeno, obteniendo resultados efectivos con respecto a los métodos de caracterización genética y microbiológica de cepas (Carrau, 2003). El diseño reciente de un medio de mosto artificial de bajo nivel de nitrógeno asimilable para obtener perfiles aromáticos que permiten comparar cepas y caracterizarlas según su habilidad para utilizar el nitrógeno, así como su interacción con el color de los vinos tintos ha resultado en una herramienta valida para la obtención de cepas adaptadas a la enología de mínima intervención (Carrau, 2003; Medina *et al.*, 2005; Carrau *et al.*, 2005). Estas cepas previenen también los problemas que surgen a lo largo de la crianza de los vinos, resultando en vinos con mayor potencial de estabilidad microbiológica por su bajo contenido de nutrientes residuales.

SUCESIÓN DE ESPECIES DE LEVADURAS DESDE LA UVA AL VINO

Numerosos estudios ecológicos se han realizado a lo largo de los años para conocer la dinámica, cuantificación y composición de la microflora responsable de las fermentaciones espontáneas del mosto. Las fermentaciones espontáneas son aquellas que se producen de forma natural, es decir, las realizan las levaduras provenientes de la uva y del material de bodega, sin ningún tipo de inoculación externa. Esto hace que las fermentaciones espontáneas no sean producto de la acción de una única cepa de levadura, sino de una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación (Kunkee & Amerine, 1970; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; Lafon-Lafourcade, 1983; Zambonelli, 1988).

Así, en los primeros días de fermentación, los géneros mayoritarios son *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida* y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia* (Querol *et al.*, 1990, Longo *et al.*, 1991;

Fleet & Heard, 1993; Schütz & Gafner, 1994; Neirotti *et al.*, 1995). Después de estos 2 ó 3 primeros días, estos géneros reducen su número, dando paso al crecimiento de la especie fermentadora por excelencia *Saccharomyces cerevisiae*

considerada la principal especie responsable de la fermentación alcohólica hasta agotar los azúcares del mosto (Ribéreau-Gayon, 1985; Vezinhet & Pineau, 1990; Fleet & Heard, 1993). Cuadro 1 y Figura 1.

Cuadro 1. Especies de levaduras relacionadas a la uva y el vino. A la derecha se indica la denominación actual en caso que haya sido cambiada y las características del hábitat. A nivel comercial actualmente solo cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran accesibles al enólogo.

Genero	Especies y/o antigua denominación	Actual segun: Kreger van Rij, 1984; Barnett, 1992; Martini, 1993; Kurtzman & Fell, 1998	Habitat o adaptaciones
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i> <i>beticus</i> <i>capensis</i> <i>chevalieri</i> <i>ellipsoideus</i> <i>oviformis</i> <i>bayanus</i> <i>uvarum</i> <i>fermentati</i> <i>rosei</i>	<i>cerevisiae</i> <i>cerevisiae</i> <i>cerevisiae</i> <i>cerevisiae</i> <i>cerevisiae</i> <i>cerevisiae</i> <i>bayanus</i> <i>bayanus</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>	Mayor resistencia a anaerobiosis y al alcohol. Capacidades para terminar la vinificación.
<i>Hanseniaspora</i>	Uvarum		Apiculada típica de las cascaras de uva en la viña.
<i>Kloeckera</i>	<i>Apiculata</i>		Apiculada, forma anamorfa de <i>Hanseniaspora</i>
<i>Hansenula</i>	<i>Anomala</i> <i>Kluyveri</i>	<i>Pichia anomala</i> <i>Pichia kluyveri</i>	En cáscara de uvas y con aireación. Aumenta población en mostos aireados.
<i>Pichia</i>	<i>kluyveri</i>		En cáscara de uvas. Pueden formar flor en vino.
<i>Candida</i>	<i>membranofaciens</i> <i>guilliermondii</i> <i>krusei</i> <i>stellata</i>		En mostos aireados, inicio fermentación.
<i>Cryptococcus</i>	<i>Albidus</i>		En uvas
<i>Debaromyces</i>	<i>Hansenii</i>		En uvas
<i>Brettanomyces</i>	<i>anomalus</i> <i>bruxellensis</i> <i>intermedius</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Típicos contaminantes de vinos en barricas y en bodega.
<i>Dekkera</i>	<i>anomala</i> <i>bruxellensis</i>		Anamorfa de <i>Brettanomyces</i> . También contaminante.
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i> <i>thermotolerans</i>		Buena fermentadora
<i>Metschnikowia</i>	<i>Pulcherrima</i>		En uvas
<i>Rhodotorula</i>	<i>Glutinis</i>		En uvas
<i>Saccharomycodes</i>	<i>Ludwigii</i>		
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i> <i>japonicus</i>		Fermentan el ácido málico a alcohol. Desacidificación.
<i>Torulaspota</i>	<i>Delbrueckii</i>		Osmotolerantes. Ideales para vinos muy dulces.
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>bailii</i> <i>florentinus</i> <i>bisporus</i> <i>rouxii</i>		Contaminantes de jugos y vinos. Resisten a varios conservantes.

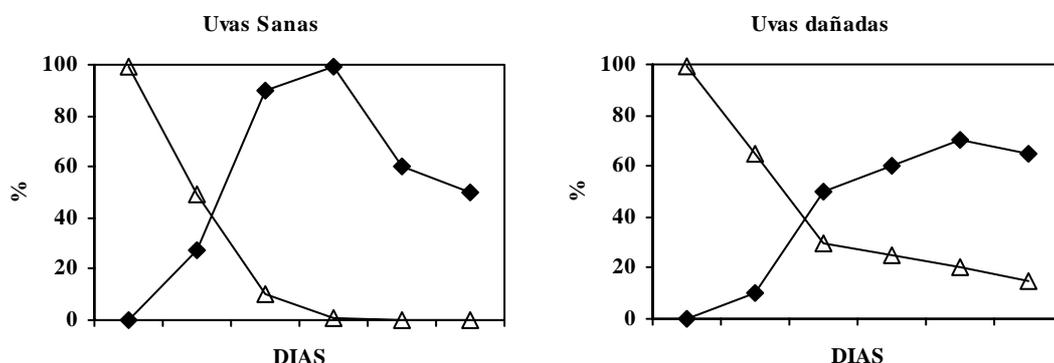


Figura 1. Muestran el porcentaje de levaduras *Saccharomyces* (◆) y no-*Saccharomyces* (△), a lo largo del proceso de la vinificación de un jugo de uva. A la izquierda para el caso de uvas sanas y a la derecha para uvas dañadas.

Sin embargo según los estudios de Fleet *et al.* (1984) y Heard & Fleet (1986), se ha mostrado que algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces*, como *Kloeckera apiculata* y *Candida stellata*, también contribuyen a la fermentación, ya que sobreviven más de lo que se pensaba inicialmente, pudiendo alcanzar poblaciones máximas de 10^6 - 10^7 ufc/mL. Por tanto, este crecimiento es cuantitativamente significativo y seguramente influenciará en la composición organoléptica del vino. Además, como se verá más adelante las modificaciones que estas levaduras producen en la composición del mosto tendrá un efecto en la cinética de la fermentación y en el comportamiento bioquímico de las cepas en competencia con *Saccharomyces* a lo largo del proceso (Carrau *et al.*, 1994).

A pesar de que la fermentación espontánea muestra una sucesión de géneros y especies de levaduras, finalmente sólo unas pocas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* controlan la mitad-final de la fermentación; y este es el resultado de una selección natural (Frazier & Dubourdieu, 1992; Vezinhet *et al.*, 1992; Fleet & Heard 1993; Versavaud *et al.*, 1993).

Tradicionalmente, los métodos utilizados para la identificación y caracterización de cepas de levadura se han basado en sus características morfológicas, sexuales y bioquímicas (Kreger-Van Rij, 1984; Barnett, 1992), pero estas características están muy influenciadas por las condiciones del cultivo y pueden dar resultados poco precisos (Yamamoto *et al.*, 1991). En los últimos años, diversas técnicas de Biología Molecular han sido desarrolladas para la identificación de especies y cepas de levaduras. La aplicación de estas técnicas ha demostrado una amplia diversidad genética entre las cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* (Querol *et al.*, 1992a; Versavaud *et al.*, 1993; Quesada & Cenis, 1995; de Barros Lopez *et al.*, 1998, 1999).

A nivel de cepas industriales de *Saccharomyces* que presentan genomas poligénicos (más de dos juegos de cromosomas), recientemente se han obtenido diferencias precisas por técnicas utilizando microsátélites (González Techera *et al.*, 2001).

La diversidad, composición y evolución de la microbiota de levaduras presente en el mosto depende de varios factores, entre los que podemos citar: (i) la localización geográfica y las condiciones climáticas (Fleet *et al.*, 1984; Parish & Carroll, 1985; Querol *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1991), (ii) la variedad, madurez y edad de la viña (Martini *et al.*, 1980; Rosini *et al.*, 1982; Martínez *et al.*, 1989), (iii) el uso de fungicidas (Bureau *et al.*, 1982), (iv) los daños físicos causados por hongos, insectos o pájaros a la uva (Longo *et al.*, 1991) y (v) las condiciones de vinificación (Epifanio *et al.*, 1999). Esta gran biodiversidad ha originado muchos trabajos en los que se ha analizado la dinámica poblacional de las fermentaciones espontáneas (Schütz & Gafner, 1993; Constantí *et al.*, 1997; Sabaté *et al.*, 1998; Versavaud *et al.*, 1995; Longo *et al.*, 1991; Khan *et al.*, 2000; van der Westhuizen *et al.*, 2000; Beltran *et al.*, 2002).

En una uva sana y madura, la población total de levaduras puede variar entre 10^3 - 10^5 ufc/mL. En Uruguay y en la mayoría de las regiones vitícolas se sabe que la especie mayoritaria en la superficie de la uva es la levadura apiculada *Hanseniaspora uvarum* y su forma imperfecta, *Kloeckera apiculata*, que representan aproximadamente el 50-75% de la población total (Carrau *et al.*, 1988; Neirotti *et al.*, 1995; Rabosto *et al.*, 2005). Otros géneros significativos son *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Hansenula* y *Rhodotorula* (Rosini *et al.*, 1982; Parish & Carroll, 1985).

La causa de la presencia de *Saccharomyces* en el mosto espontáneamente es una cuestión aún hoy controvertida, y existen dos teorías al respecto:

(i) La primera de ellas hace referencia a que los granos dañados de uvas, constituyen depósitos muy ricos para el desarrollo de microorganismos. Estos daños pueden ser producidos por causas diversas como ser inclemencias meteorológicas (exceso de lluvias fuertes, granizo), infecciones con hongos, exceso de agua, insectos, pájaros, etc. (Mortimer & Polsinelli, 1999). En ese depósito de microorganismos se encontraría a *Saccharomyces cerevisiae*.

(ii) La segunda teoría no descarta la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* en las uvas, pero atribuye la principal procedencia de las mismas al ambiente de bodega, (superficies del equipamiento de bodega, en las bombas, tuberías, depósitos de fermentación etc.), (Rosini, 1984; Martín, 1993; Fleet & Heard, 1993; Carrau *et al.*, 1994; Vaughan-Martini & Martín, 1995; Neirotti *et al.*, 1995).

Esta última es la considerada más exacta, dado que en el caso (i), se ha comprobado que favorece a la flora no-*Saccharomyces* y precisamente se hace más improbable la presencia de *Saccharomyces* en mostos de uvas que no estén con perfecta sanidad.

También en las bodegas se han encontrado especies pertenecientes a los géneros *Pichia*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces* (y su forma perfecta *Dekkera*), que serían propias de este ecosistema durante la conservación y la crianza en barricas, y no de la fruta.

A esta sucesión de especies nativas que provienen de la uva y la bodega se le agregan levaduras *Saccharomyces* comerciales que el enólogo tiene opción de utilizar. En muchos casos la necesidad de asegurar una completa fermentación alcohólica y una calidad consistente año a año del producto final, ha favorecido el uso de las levaduras comerciales secas activas (LSA de cepas de *Saccharomyces*), lo que se ha convertido en una práctica bastante frecuente en varias bodegas incrementando así la complejidad de las poblaciones que son espontáneas.

La inoculación con LSA favorece un rápido inicio de la fermentación (normalmente se reduce la fase de latencia) y un consumo total de los azúcares fermentables (Longo *et al.*, 1992), se ha demostrado que se obtiene un producto de calidad uniforme a lo largo de las diferentes vendimias (Ribéreau-Gayon, 1985; Fleet & Heard, 1993). Sin embargo, algunos enólogos consideran que se pierde el carácter diferencial de las cosechas, ocurre una uniformidad aromática y el carácter varietal pierde riqueza sensorial (Carrau *et al.*, 1988; Ramey, 1995). De hecho, se ha visto que las levaduras autóctonas aportan al producto final un distintivo de tipicidad y estilo (Mateo *et al.*, 1991; Fugelsang 1996; Heard 1999). Estos hechos han planteado la necesidad de seleccionar cepas de levaduras mejor adaptadas a las diferentes regiones y variedades del mundo. También

este hecho ha incentivado la investigación para el mejor manejo de la fermentación espontánea. Es así que se incluye la levadura como factor clave en la tendencia actual hacia una “Enología de Mínima Intervención” o “Low Input Winemaking” (Ramey, 1995).

EFFECTOS EN LOS COMPUESTOS NO VOLATILES DEL VINO

El crecimiento de levaduras no-*Saccharomyces*, como *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, etc., en las primeras etapas de la vinificación puede ocasionar cambios en la composición del mosto, como la relación de glucosa/fructosa o en el contenido de vitaminas. Estas levaduras han sido muy poco estudiadas en relación a *Saccharomyces* a pesar de que en la vinificación pueden incluso dominar la fermentación a bajas temperaturas, o con exceso de aireación (Fleet & Heard, 1993), o malas condiciones de transporte de la uva, alcanzando hasta 10⁷ células por mL de mosto (Carrau *et al.*, 1995). Sin embargo, estas cepas pueden realizar aportes interesantes para la elaboración de vinos, entre otros se ha comprobado el aumento de la producción de glicerol en las fermentaciones espontáneas por la acción inicial de cepas no-*Saccharomyces* (Benda, 1981). Mas recientemente Soden *et al.* (2000), reportaron una gran producción de glicerol por *Candida stellata*, así como la forma en que este compuesto aumenta con la inoculación secuencial de esta cepa con *Saccharomyces*, luego de 15 días de la fermentación total de la fructosa natural en un mosto Chardonnay. Normalmente, la mayor aireación y las bajas temperaturas de fermentación son factores que favorecen el desarrollo de las cepas no-*Saccharomyces* (Fleet *et al.*, 1989; Mora & Mullet, 1991; Mora & Rosello, 1992; Fleet & Heard, 1993; Henick-Kling *et al.*, 1998; Erten, 2002). Algunos autores han relacionado a estas cepas con la posible remoción de nitrógeno de un mosto, determinando una carencia de este nutriente en mostos de uva para el crecimiento de *Saccharomyces*, pudiendo resultar en vinos con aromas de mala calidad y detención de fermentaciones (Fleet & Heard, 1993, Carrau *et al.*, 1994, 1995). En la Figura 2, se puede observar como la fermentación en cultivos mixtos entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* enlentece la cinética de la fermentación, ocasionado una parada de la misma.

Otros factores enológicos que influyen en el crecimiento de determinadas cepas son la clarificación previa del jugo (Mora and Mulet, 1991; Epifanio *et al.*, 1999), las concentraciones de SO₂ (Heard & Fleet, 1988), los niveles de azúcares, oxígeno, etanol, pH y la temperatura del mosto (Sharf & Margalith, 1983; Gao & Fleet, 1988; Heard & Fleet,

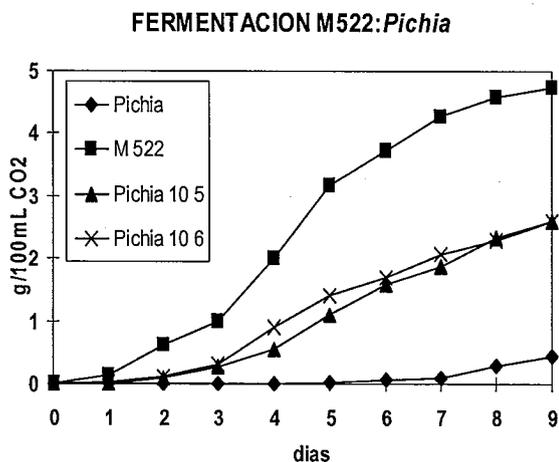


Figura 2. Curvas de fermentación en cultivos puros de una cepa *Pichia* sp. y otra de *Saccharomyces cerevisiae* (M522). Las otras dos situaciones muestran cultivos mixtos con inóculos iniciales de *Pichia* sp 10^5 y 10^6 células/mL, donde a las 24 horas se adicionan 10^5 células/mL de M522. Se observa un claro enlentecimiento de la velocidad de fermentación en los cultivos mixtos con respecto a M522 pura, que determina paradas de fermentación.

los nutrientes del mosto los llamados aromas de fermentación. La Figura 3 muestra esquemáticamente los diferentes fenómenos que ocurren durante la vinificación y el metabolismo de las levaduras.

Los vinos tienen una gran riqueza aromática con respecto al mosto de uva original. Más de 500 compuestos volátiles como alcoholes, ésteres y ácidos, son los determinantes del aroma de un vino. La mayoría de los estudios han analizado los aromas de fermentación producido por *Saccharomyces*, pero algunos han cuantificado la producción de estos compuestos por levaduras no-*Saccharomyces* (Van Zyl *et al.*, 1963; Soufleros & Bertrand, 1979; Millan & Ortega, 1988; Herraiz *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1991; Mateo *et al.*, 1991; Romano *et al.*, 1992; Gil *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 1997; Zoecklein *et al.*, 1997; Romano & Marchese, 1998; Soden 1998;; Erten, 2002; Romano *et al.*, 2003; Swiegers *et al.*, 2005). En estos trabajos se comprueba que a pesar de la baja capacidad fermentativa de la mayoría de estas cepas no-*Saccharomyces*, su impacto en los vinos finales puede ser muy importante, y según algunos autores hasta más importante sobre algunos compuestos que el efecto de las cepas *Saccharomyces*. Sin embargo, los estudios sobre estas cepas no son claros. Según Herraiz *et al.* (1990) la concentración de ésteres y ácidos en los cultivos mixtos y secuenciales con *Kloeckera*, *Torulasporea* y *Saccharomyces*, siempre es menor que en *Saccharomyces* sola. El comportamiento para los alcoholes superiores en este estudio no es tan claro. En otro estudio con cultivos mixtos de apiculadas y *Saccharomyces*, los vinos obtenidos resultaron tener mayores niveles totales de alcoholes superiores y ácidos con respecto al cultivo puro de *Saccharomyces* (Gil *et al.*, 1996). Hay que destacar que en ninguno de estos trabajos se conoce la concentración de nitrógeno asimilable (FAN) del mosto por lo que es difícil analizar correctamente el efecto de estos cultivos mixtos en la producción de aromas de fermentación dado que la disponibilidad del nitrógeno es clave para la síntesis de estos compuestos. Al igual que los trabajos referentes a aromas producidos por *Saccharomyces*, la mayoría de los trabajos en las no-*Saccharomyces*, no reportan la concentración de FAN del medio, y en otros casos se realizaron únicamente en medios con exceso de FAN en relación a un mosto natural. Como se muestra en la Figura 4, la remoción de nitrógeno es muy variable entre cepas y especies de no-*Saccharomyces*. El hecho de que en cultivos mixtos haya un enlentecimiento de la fermentación por carencia de nutrientes como se mostró en la Figura 2, demuestra que el impacto de estas cepas sobre la composición aromática de un vino también va a ser muy variable. Es así que

1988). Sin embargo, estos fenómenos todavía no han sido bien comprendidos en cultivos mixtos con *Saccharomyces*.

Estudios cuantitativos sobre poblaciones de levaduras han demostrado que la sobrevivencia de las levaduras no-*Saccharomyces* es mayor de lo que se pensaba inicialmente, incluso para el caso en que *Saccharomyces* es inoculada en el mosto al mismo tiempo (Fleet *et al.*, 1984; Martínez *et al.*, 1989; Pardo *et al.*, 1989; Mora *et al.*, 1990). La temperatura es uno de los factores claves para la sobrevivencia de las levaduras por su efecto en la capacidad de resistencia al etanol, que es mayor a bajas temperaturas (Fleet *et al.*, 1989). A nivel industrial, en realidad en muchos casos la sobrevivencia de las cepas no-*Saccharomyces* es mucho menor, no encontrándose en el medio luego del cuarto día de fermentación, probablemente por las condiciones extremadamente reductivas que están presentes en tanques a nivel de bodega (Carrau *et al.*, 1995).

EFFECTOS EN LOS AROMAS DEL VINO

Se sabe en general que las levaduras afectan la composición aromática del vino, ya sea modificando los compuestos típicos de cada variedad o sintetizando a partir de

JUGO DE UVA

COMPUESTOS VARIETALES

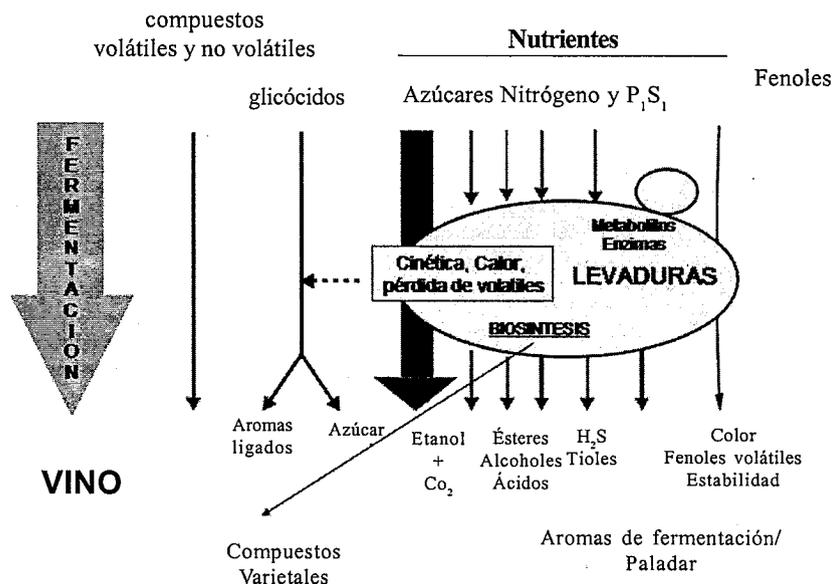


Figura 3. Efecto de las levaduras durante la vinificación en la transformación del jugo de uva en vino y su relación con los aromas varietales de la uva. El esquema muestra la posible transformación y biosíntesis de estos aromas que modifican el perfil original de las uvas utilizadas, y también la formación de los aromas de fermentación por el metabolismo secundario de la fermentación alcohólica que incrementa el aroma de un jugo de uva en más de 50 veces del vino producido.

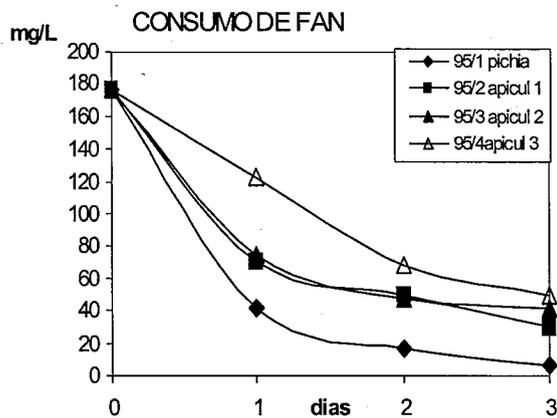


Figura 4. Se muestra el perfil de consumo de nitrógeno asimilable (FAN) por varias cepas no *Saccharomyces*, en las primeras horas del inicio de la fermentación de un jugo de uva. Algunas cepas como se puede observar consumen mas del 70% del nitrógeno del medio en las primeras 24 horas.

los trabajos realizados hasta el momento, sin conocimiento de los niveles de nitrógeno del medio no han permitido obtener una explicación concluyente en el efecto de estas cepas sobre los aromas. Se espera que el desarrollo de medios específicos con un control exacto de los nutrientes que afectan las cepas involucradas y la disponibilidad de FAN, permitan comprender mejor el efecto de las cepas no-*Saccharomyces* en la calidad aromática de un vino.

Efectos de las levaduras en los aromas varietales de la uva.

Se sabe que los compuestos aromáticos relacionados al carácter varietal son intermediarios activos en el metabolismo de la planta. La mayoría de los trabajos han estudiado a los aromas que se encuentran libres (volátiles) en la fruta o el mosto y muy pocos apuntan al estudio de sus β-glicósidos, o los aromas ligados, que se encuentran no volátiles. La presencia de estos glucósidos fue confirmada en vinos elaborados con uvas *Vitis viniferas* del grupo

de las variedades aromáticas como el Moscatel, pero también fueron detectados en otros grupo de plantas superiores. Estos precursores aromáticos, como los monoterpenol-glucósidos (precursores de aromas florales) son de gran interés en la industria vitivinícola y varios esquemas de desarrollo biotecnológico han sido tomados en consideración para su expresión si son liberados del azúcar correspondiente. Desde el punto de vista enológico, varios estudios fueron emprendidos para desarrollar el potencial aromático de los monoterpenol-glucósidos empleando hidrólisis enzimática (Canal-Llauberes, 1993). Un amplio espectro de β -glucosidasas han sido aisladas de hongos filamentosos y levaduras, en este último grupo encontramos la tradicional levadura de vinificación *Saccharomyces cerevisiae*, pero esta actividad es más común en *no-Saccharomyces*. El esquema de la Figura 3, muestra esta opción de hidrólisis por la levadura de un aroma ligado originario de la uva, aumentando su concentración en estado libre y sensorialmente activo.

Grossman *et al.* (1987), reportaron la hidrólisis de los monoterpenol-glucósidos usando directamente levaduras de fermentación que poseían actividad β -glucosidasa. Estos autores encontraron que es mucho más efectivo agregar con este objetivo las levaduras a un vino que ha finalizado la fermentación, que adicionarlas durante el proceso de fermentación. En un mosto fermentando activamente la enzima β -glucosidasa esta sujeta a la desnaturalización por proteasas y a una inhibición de su síntesis y actividad por parte de la glucosa presente en el jugo. Más recientemente, en Sauvignon Blanc, ha sido demostrado el efecto de *Saccharomyces* sobre los precursores típicos de esta variedad haciendo expresar las notas a fruta de la pasión durante la fermentación (Tominaga *et al.*, 1998), lo que sin duda demuestra que deben existir otros casos aun no descubiertos.

Algunos investigadores han demostrado que, a diferencia de *Saccharomyces*, las levaduras *no-Saccharomyces* producen y excretan una gran variedad de enzimas extracelulares como esterases, glicosidasas, lipasas, β -glucosidasas, proteasas, celulasas, etc. Estas enzimas podrían interactuar con los precursores aromáticos del mosto y hacerlos activos aromáticamente en el vino, influyendo así en los aromas varietales (Charoenchai *et al.* 1997; Zoecklein *et al.*, 1997; Zoecklein *et al.*, 1997; 1998; Fernández *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2001; Mendes-Ferreira *et al.*, 2001; Strauss *et al.*, 2001; Fernández-González *et al.*, 2003; Carrau, 2003; Swiegers *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos de estos estudios han sido realizados en forma preliminar, en algunos casos con extractos

de aromas varietales sin un balance de compuestos libres y ligados, o con ensayos primarios como el del p-nitrofenol- β -D-glucopiranosido (p-NPG) y determinación del p-nitrofenol liberado, cuyos valores no solo miden la actividad β -glucosidasa sino también la de las 1,3-glucanasas que están presentes en la mayoría de las levaduras (Strauss *et al.*, 2001). En conclusión, la relación positiva o negativa de las levaduras *no-Saccharomyces*, con los aromas varietales y sus precursores, como los terpenos y norisoprenoides es un tema considerado prácticamente en sus inicios, con un efecto todavía no bien comprendido (Lambrechts & Pretorius, 2000; Swiegers *et al.*, 2005).

Biosíntesis de monoterpenos por levaduras

Los monoterpenos y otros isoprenoides aportan un aroma frutal y floral, y su presencia reviste gran importancia por su influencia en la calidad del vino. Tradicionalmente la enología ha considerado estos compuestos como un aporte varietal, o sea que proviene de las uvas que se procesan y no de la fermentación. En este contexto, su formación por parte de levaduras, se encontraba limitada a nivel de trazas por un reducido número de especies *no-Saccharomyces* como *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida stellata*, y *Ambrosiozyma monospora*. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la síntesis “*de novo*” de terpenos por *Saccharomyces cerevisiae*, que depende de la situación redox y el nivel de nitrógeno del medio de fermentación (Carrau *et al.*, 2005). Este descubrimiento del posible aporte de notas florales por *S. cerevisiae* a un vino además del aportado por la fruta, abre un campo de particular importancia para la enología. Por ejemplo, a partir de variedades *Vitis viniferas* de características no aromáticas, como es el caso de las uvas tintas, que presentan características químicas y sensoriales más relacionadas a frutos rojos o notas herbáceas (norisoprenoides y pirazinas), un aporte de notas florales por levaduras específicas abre una interesante perspectiva. Entre otras, podría ser de fundamental importancia, para un país como Uruguay donde la tipicidad de su viticultura se orienta hacia el desarrollo de vinos tintos como es el caso del Tannat, que resulta en vinos con una gran estructura fenólica, pero muy limitada intensidad aromática.

Restan muchos elementos que deben ser dilucidados en el estudio de la biosíntesis de monoterpenos: identificar y caracterizar cepas nativas productoras de terpenos, comprender mejor las condiciones fisiológicas que promueven su formación y definir la(s) rutas biosintéticas a través de las cuales son producidos estos compuestos.

BIOSINTESIS O TRANSFORMACION DE DERIVADOS DE ANTOCIANOS EN UVAS TINTAS

El color del vino depende de la concentración de antocianos que se extraen de las cáscaras de las uvas durante la maceración. Estos pigmentos son modificados o afectados durante la vinificación, la crianza y el embotellado (Ribereau-Gayon 1982; Boulton 2001; Vivar-Quintana *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 2003). Mas recientemente se ha demostrado que durante la fermentación algunos compuestos secundarios son liberados en el medio por las levaduras, como el ácido pirúvico y el acetaldehído, que pueden reaccionar con las antocianinas para producir derivados que pueden afectar el color de un vino. Algunos ejemplos son la Vitisina A, Vitisina B y pigmentos ligados antocianina-flavonol (Morata *et al.*, 2003; Asenstorfer *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Eglinton *et al.*, 2004). El efecto de varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, comerciales y nativas sobre los antocianos de uvas Tannat fue estudiado recientemente, y se demostró que las diferencias entre cepas no se debían a remociones o degradaciones de antocianos como algunos autores sostienen que es lo normal, sino a la síntesis de nuevos derivados de antocianos que acrecentaban mas o menos el color del vino final según la cepa (Medina *et al.*, 2005). Estos resultados abren nuevas perspectivas para la mejor caracterización de levaduras mas adaptadas a la vinificación de vinos tintos, lo que se piensa puede depender de un estudio para cada variedad en especial. No se conocen hasta el momento trabajos sobre este tema en cepas no-*Saccharomyces*.

IMPACTO SENSORIAL DE LA MAYOR BIODIVERSIDAD EN LA VINIFICACION

El análisis sensorial de cepas no-*Saccharomyces* fermentadas individualmente en cultivos puros de mosto ha tenido muy poca atención. Esta falta de interés quizás se debe a la baja capacidad de estas cepas para fermentar el mosto completamente y a que muchas producen una concentración de acidez volátil elevada, generalizándose rápidamente una mala reputación sobre las cepas no-*Saccharomyces* a nivel enológico. Malan (1956) encontró diferencias sensoriales importantes en vinos fermentados con *Saccharomyces* y *Hanseniopsis uvarum*. En cultivos mixtos entre *Candida glabrata* (*Torulopsis*) y *Saccharomyces*, Kiryalova (1958) ha reportado mejor calidad de vino y frutado que con las cepas individualmente. Algunos estudios han evaluado el efecto de cultivos mix-

tos entre cepas no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*, adicionadas al mismo tiempo o secuencialmente. Soden (1998, 2000) demostró las diferencias sensoriales entre el cultivo de cepas de *Torulopsis delbrueckii* y *Candida stellata* seleccionadas con buenas características organolépticas con *Saccharomyces* co-inoculadas o inoculadas secuencialmente en jugo artificial y mosto Chardonnay. Otro ejemplo interesante de cultivo secuencial para desacidificar un mosto se logra iniciando la fermentación con *Schizosaccharomyces pombe* y posterior inoculación de *Saccharomyces* para terminar la fermentación (Magyar and Panyik, 1989).

Por otro lado, el carácter sensorial de los vinos fermentados con varias cepas de *Saccharomyces* en cultivos mixtos, ha sido reportado como una mejora al efecto de las cepas individualmente (Verona & Castelli, 1955). Schutz *et al.* (1995) demostraron más recientemente que la co-inoculación de cuatro cepas *Saccharomyces* produjo vinos de mayor complejidad aromática que el producido por las cepas individualmente. Es aun poca la información sobre este tema y no se ha evaluado globalmente el fenómeno de la competencia entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. Este campo seria de suma importancia para introducir cepas no-*Saccharomyces* a nivel comercial que permitan desarrollar nuevos procesos a nivel de bodega.

LA BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS COMO ESTRATEGIA PARA LA ENOLOGIA DE MINIMA INTERVENCION

Encontramos una falta de trabajos y publicaciones del efecto de la flora indígena, principalmente sobre las cepas no-*Saccharomyces* en los aromas y sabores de un vino, sin embargo podemos afirmar que existe una clara percepción de que las levaduras nativas mejoran la complejidad y calidad del vino en fermentaciones espontáneas (Egli *et al.*, 1998). Dado que se sabe que la no inoculación de los mostos es una de las operaciones más riesgosas en una bodega si no se realiza un control estricto de este proceso, los enólogos deberán tener una mejor comprensión de la microbiología de la uva y el vino para aprovechar en forma segura la biodiversidad presente en cada bodega. Además de una carencia de trabajos de análisis químicos del efecto de estas levaduras en los aromas, como se mostró se encuentran pocos trabajos desde el punto de vista sensorial que demuestren impacto en el aroma y sabor. Este trabajo muestra la gran diversidad en la capacidad fermentativa, crecimiento y cualidades aromáticas de las cepas no-*Saccharomyces*, lo que hace posible confirmar el gran po-

tencial de estas cepas para su aplicación a nivel enológico en combinación con *Saccharomyces*. Dentro de las cepas *Saccharomyces* también se discutió que existe gran diversidad de cepas nativas mucho mejor adaptadas a condiciones de bajo nivel de nitrógeno del mosto, y que esto indica la necesidad de seleccionar y utilizar esta flora para no depender únicamente de cepas comerciales no adaptadas a nuestras condiciones naturales que demandan suplemento de amonio. Desde el punto de vista enológico, se debe considerar que la fermentación espontánea o el pretratamiento de mostos con cepas no-*Saccharomyces* seleccionadas, serán procesos aplicables en el tratamiento de los mostos, muy útiles para enriquecer y diferenciar en complejidad aromática algunos vinos. Estos procesos deben ser optimizados mediante el manejo de los nutrientes del mosto y el conocimiento de la flora nativa presente en los viñedos y las bodegas. La mayor comprensión de las alternativas presentadas en este trabajo, permitirá desarrollar métodos y microorganismos mejor adaptados a la Enología de Mínima Intervención.

BIBLIOGRAFÍA

- ASENTORFER, R.; A. MARKIDES; P. ILAND & G. JONES. 2003. Formation of vitisin A during red wine fermentation and maturation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9: 40-46.
- BARNETT, J. A. The Taxonomy of the Genus *Saccharomyces* Meyen ex Rees: a Short Review for Non-taxonomists. *Yeast* 8:1-23 (1992).
- BELTRAN, G.; M.J. TORIJA; M. NOVO; N. FERRER, M. POBLET; J.M. GUILLAMÓN; N. ROZÈS, & A. MAS. 2002. Analysis of yeast population during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 287-293.
- BOULTON, R. 2001. The co-pigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 67-87.
- BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F. and KUNKEE, R.E. (1996) Principles and practices of winemaking, 604 pp. Chapman Hall. NY.
- BUREAU, G., D. BRUN, A. VIGUES, A. MAUJEAN, G. VESSELLE, and M. FEUILLAT. 1982. Étude d'une microflore levurienne champenoise. *Conn. Vigne Vin* 16, 15-32.
- CANAL-LLAUBERES, R.M. (1993) Enzymes in Winemaking. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed. by G.H. Fleet. Harwood Academic Publishers, Switzerland, Pp. 477-506.
- CARRAU, F.M.; O. GIOIA and E. NEIROTTI, 1988. Importancia del fenómeno "killer" en la población de levaduras dominantes en la vinificación a nivel industrial. III Simp. Latin. Vitic. Enol. p1-10, Mendoza. Argentina.
- CARRAU F.M., NEIROTTI E. and GIOIA O., 1993. Stuck Wine Fermentations: Effect of Killer/Sensitive Yeast Interactions. *J. Biotechnol. Bioengin.* 76, 67-69.
- CARRAU, F.M.; GIOIA, O. and MEDINA, K. 1994. Carencia de nitrógeno asimilable en mostos por efecto de competencia entre levaduras antagónicas. *VI Cong. Latino. Viti. y Enol.* 21-25 nov. p51-52. Santiago de Chile.
- CARRAU, F.M.; MEDINA, K.; GIOIA, O. and BRASESCO, N. 1995. Enlentecimiento de la vinificación. efecto del crecimiento inicial de levaduras salvajes en la disponibilidad de nitrógeno para *Saccharomyces cerevisiae*. *XXI Cong. Mundial Viña Vino de OIV*, 27 nov. Punta del Este, Uruguay. 2B: 74-75.
- CARRAU F.M. (2003) Caracterización de levaduras en relación a su capacidad para utilizar nitrógeno - Estudio de compuestos responsables de aroma. Tesis Doctoral, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.
- CARRAU F.M., MEDINA K., BOIDO E., FARIÑA L., GAGGERO C., DELLACASSA E., VERSINI G. and HENSCHKE P.A. (2005) De novo synthesis of monoterpene by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiology Letters* 243, 107-115.
- CONSTANTÍ, M., POBLET, M. AROLA, L., MAS, A. and GUILLAMÓN J.M. 1997. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 339-344.
- CHAROENCHAI, C. FLEET, G.H., HENSCHKE, P.A. and TODD, B.E.N. 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeast for the presence of extracellular hydrolytic enzyme. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 2-8.
- EGLI, C.M., EDINGER, W.D. MITRAKUL, C.M., and HENICK-KLING, T. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779-789.
- EGLINTON, J., M. GRIESSER, P. HENSCHKE, M. KWIATKOWSKI, M. PARKER, and M. HERDERICH. 2004. Yeast-mediated formation of pigmented polymers in red wine. In *Red wine color: exploring the mysteries*. A.L. Waterhouse, and J.A. Kennedy (Eds.), pp. 7-21. American Chemical Society, Washington, DC.
- EPIFANIO, S.I., A.R. GUTIÉRREZ, M.P. SANTAMARÍA, and R. LÓPEZ. 1999. The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 219-224.

- ERTEN, H. 2002. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour on *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 373-378.
- FERNANDEZ, M. UBEDA, J.F. & BRIONES, A.I. 2000. Typing of non-*Saccharomyces* with enzymatic activities. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 29-36.
- FERNANDEZ-GONZALEZ, M., DI STEFANO, R. & BRIONES, A. 2003. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiol.* 20, 35-41.
- FLEET, G.H. . 1990. Growth of yeasts during wine fermentations. *Journal of Wine Research* 1, (3): 211-223.
- FLEET, G.H. Y G.M HEARD. 1993. Yeast growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology.* (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- FLEET, G.H., S. LAFON-LAFOURCADE, Y P. RIBÉREAU-GAYON. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034-1038.
- FREZIER, V. ; D. DUBOURDIEU. 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 375-380.
- FUGELSANG, K.C. 1996. In: *Wine Microbiology.* Chapman and Hall, New York, USA.
- FULCRAND, H., C.P.J. CAMEIRA DOS SANTOS, P. SARNI MANCHADO, V. CHEYNIER, Y J. FABRE BONVIN. 1996. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1: 735-739.
- GAO, C. & FLEET, G.H. 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 405-410.
- GONZALEZ TECHERA A., JUBANY S., CARRAU F.M., GAGGERO C. 2001. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 71-75.
- GROSSMAN, M. RAPP, A. & RIETH, W. 1987. Enzymatische Freisetzung gebundener Aromastoffe in Wein. *Deutsche Lebens. Rundschau* 83, 7-12.
- HEARD, G.M. 1999. Novel yeasts in winemaking - looking to the future. *Food Australia* 51, 347-352.
- HEARD, G. & FLEET, G.H. 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 23-28.
- HENICK-KING, T; EDINGER, W; DANIEL, P. & MONK, P. 1998. Select effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* 84: 865-876.
- HENSCHKE, P.A. WINE YEAST. IN: ZIMMERMANN, F.K. AND ENTIAN, K-D.(eds) *Yeast sugar metabolism.* Technomic Publishing co., Lancaster, Pennsylvania, pp.527-560 (1997).
- KHAN, W., O.P.H. AUGUSTYN, T.J. VAN DER WESTHUIZEN, M.G. LAMBRECHTS, Y I.S. PRETORIUS. 2000. Geographic distribution and evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the warmer, inland regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 17-31.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. 1984. *The yeast, a taxonomic study.* Elsevier, Amsterdam.
- KUNKEE, R.E. Y M. AMERINE. 1970. Yeasts in winemaking. In: *The Yeasts, Vol 3: Yeast Technology.* (Eds. A.H. Rose y J.S. Harrison) pp. 5-72. Academic Press, London.
- KURTZMAN, C.P. AND FELL, J.W. (1998) *The Yeasts, a Taxonomic Study* 1st edn. Amsterdam: North-Holland Publishers.
- DE BARROS LOPES, M.A., SODEN, A., MARTENS, A.L., HENSCHKE, P.A. AND LANGRIDGE, P. (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 279-286.
- DE BARROS LOPES, M., RAINIERI, S., HENSCHKE, P.A. AND LANGRIDGE, P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 915-924.
- LAFON-LAFOURCADE, S. 1983. Wine and brandy. In: *Biotechnology, vol 5: Food and Feed Production with Microorganisms.* (Eds. H.J. Rehm y G. Reed) pp. 81-163. Verlag Chemie, Weinheim.
- LAMBRECHTS I., PRETORIUS I.S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma-A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97-129.
- LEE, D. F., E. E. SWINNY, AND G. P. JONES. 2004. NMR identification of ethyl-linked anthocyanin- γ -avanol pigments formed in model wine ferments. *Tetrahedron Lett.* 45: 1671-1674
- LONGO, E., CANSADO, J., AGRELO, D. and VILLA T.G. 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 141-144.
- MAGYAR, I. and PANYIK, I. 1989. Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 233-240.

- MALAN, C. 1956. Taste properties of sterile grape musts fermented by pure yeasts. *Riv. Vitic. Enol. Conegliano* 9, 11-22.
- MARTÍNEZ, J., C. MILLÁN and J.M. ORTEGA. 1989. Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from "Pedro Ximenez" grapes. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 10: 31-35.
- MARTINI, A. 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* 3: 165-176.
- MARTINI, A., F. FEDERICI, and G. ROSINI. 1980. A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Can. J. Microbiol.* 26: 856-859.
- MATEO, J.J., M. JIMÉNEZ, T. HUERTA and A. PASTOR. 1991. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to aroma of wines. *Int. J. Food Microbiol.* 14: 153-160.
- MEDINA, K.; F.M. CARRAU; O. GIOIA, and N. BRASESCO. 1997. Nitrogen availability of grape juice limits killer yeast growth and fermentation activity during mixed-culture fermentation with sensitive commercial yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2821-2825.
- MEDINA, K., BOIDO, E., DELLACASSA, E., CARRAU, F.M. Yeast interactions with anthocyanins during red wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 56(2), 104-109 (2005).
- MENDES-FERREIRA, A. CLIMACO, M.C. and MENDES FAIA, A. 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in realising glycosidic fraction of grape aroma components- a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* 91, 67-71.
- MORA, J. and MULET, A. 1991. Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 133-136.
- MORA, J. and ROSELLO, C. 1992. The growth and survival of *Pichia membranaefaciens* during fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 329-332.
- MORATA, A., M.C. GOMEZ-CORDOVES, B. COLOMO, and J.A. SUAREZ. 2003b. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7402-7409.
- MORATA, A., M.C. GOMEZ-CORDOVES, J. SUBERVIOLA, B. BARTOLOME, B. COLOMO, and J.A. SUAREZ. 2003a. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4084-4088.
- MORTIMER, R. and M. POLSINELLI. 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150: 199-204.
- NEIROTTI, E. G. PEREZ, F.M. CARRAU and GIOIA O. 1995. Native killer yeasts isolated from vineyards and wineries ecosystems. *Arq. Biol. Tecnol.* 38(3): 961-968.
- PARDO, I. GARCIA, M. I. ZUÑIGA, M. and URUBURU, F. 1989. Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Uriel Requena region of Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 539-541.
- PARISH, M.E. and CARROLL, D.E. (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grape and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 165-170.
- PEREZ, G., NEIROTTI, E. and CARRAU FM. Selección de levaduras nativas con alta actividad b-glucosidasa efecto en el índice gg. durante la vinificación de mosto de la variedad aromática muscat miel. VIII Congreso Latinoamericano de Viticultura Enología, 12-16 Noviembre 2001, Montevideo.
- PEYNAUD, E. 1996. *Enología Práctica. Conocimiento y elaboración del vino*, 3era edición.
- PONTALLIER, P., and P. RIBERAU-GAYON. 1983. Influence de láireation et du sulfitage sur le evolution de la matiere colorante des vins rouges au cours de ia phase d'elavage. *Connaissance de la Vigne et do vin*, 17: 105-120.
- PRETORIUS I.S. and HOJ P.B. (2005). Grape and wine biotechnology; challenges, opportunities and potential benefits. *Austr. J. Grape Wine Res.* 11, 83-108.
- QUEROL, A., E. BARRIO, and D. RAMÓN. 1992a. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439-446.
- QUEROL, A., M. JIMÉNEZ, and T. HUERTA. 1990. A study on microbiological and enological parameters during fermentation musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci.* 55: 114-122.
- QUESADA, M.P. and J.L. CENIS. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 204-208.
- RAMEY, D. Low input winemaking- let nature do the work. In: *Proc. Austr. Wine Indust. Tech. Conf.* C.S. Stockley, A.N. Sas, R.S. Johnstone and T.H. Lee (Eds.) pp 26-29, Adelaide, Australia (1995).
- RABOSTO, X., CARRAU, M., PAZ, A., BOIDO, E., DELLACASSA, E., CARRAU, F.M. 2005. Grapes and vineyard soils as sources of microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea*. *American J. Enol. Vitic.* (en prensa).
- RIBÉREAU-GAYON, P. 1985. New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 1-10.
- ROSINI, G. 1984. Assessment of dominance of added yeast with fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine making. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30: 249-256.
- ROSINI, G., F. FEDERICI, and A. MARTINI. 1982. Yeast flora of grapes during ripening. *Micr. Ecol.* 8: 83-89.

- SABATÉ, J., J. CANO, A. QUEROL, and J.M. GUILLAMÓN. 1998. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentation: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 452-455.
- SCHUTZ, M. and GAFNER, J. 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 551-558.
- SCHWARZ, M., T. WABNITZ, and P. WINTERHALTER. 2003. Pathway leading to the formation of anthocyanin – vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3682-3687.
- SHARF, R. and MARGALITH, P. 1983. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. App. Microbiol. Biotechnol.* 17, 311-313.
- SODEN, A. 1998. The fermentation properties of non-*Saccharomyces* wine yeasts and their interaction with *Saccharomyces cerevisiae*. PhD Thesis, University of Adelaide, Australia. Pp 125.
- SODEN, A., FRANCIS, L., OAKEY, H. and HENSCHKE, P.A. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21-30.
- SPONHOLZ, W.R., DITTRICH, H.H. and HAN, K. 1990. The influence on fermentation and acetic acid ethylester formation by *Hanseniaspora uvarum*. *Vitic. Enol. Sciences* 45, 65-72.
- STRAUSS, M. L.A. JOLLY, N.P., LAMBRECHTS, M. G. and VAN RENSBURG, P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182-190.
- SWIEGERS J.H., BARTOWSKY P.A., HENSCHKE P.A., and PRETORIUS I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Austr. J. Grape Wine Res.* 11, 139-173.
- TOMINAGA, T. PEYROT DES GACHONS, C. and DUBOURDIEU, D. 1998. A new type of flavour precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 46 12 : 5215-5219.
- VAN DER WESTHUIZEN, T.J., O.P.H. AUGUSTYN and I.S. PRETORIUS. 2000. Geographic distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the Coastal Regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 3-9.
- VAUGHAN-MARTINI, A. and A. MARTINI. 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism *J. Ind. Microbiol.* 14: 514-522.
- VERSAVAUD, A., L. DULAU, and J.N. HALLET. 1993. Étude écologique de la microflore levurienne spontanée de vignoble des Charentes et approche moléculaire de la diversité intraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Fr. Oenologie* 142: 20-28.
- VERSAVAUD, A., P. CORCOUX, C. POUILLAND, L. DULAU, and J.N. HALLET. 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3521-3529.
- VEZINHET, F. and J. PINEAU. 1990. La levurage. *Progrés Agricole et Viticole* 107: 219-221.
- VEZINHET, F., J. HALLET, M. VALADE, and A. POULARD. 1992. Ecological survey of wine yeast strains by methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 83-86.
- YAMAMOTO, N., N. YAMAMOTO, H. AMEMIYA, Y. YOKOMORI, K. SHIMIZU, and A. TOTSUKA. 1991. Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 4: 358-363.
- ZOECKLEIN BW, JASINSKI and MCMAHON H. 1998. Effect of fermentation, ageing and ageing sur lie on total and phenol-free Riesling (*Vitis vinifera* L.) glycosides. *J Food Comp Anal* 11: 240-248.
- ZOECKLEIN BW, MARCY JE, WILLIAMS JM, and JASINSKI Y. 1997. Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* on glycosyl glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *J Food Comp. Anal.* 10: 55-65.