



El sinergismo entre el SO₂ y el etanol es el «villano» de las levaduras al inicio de la segunda fermentación de los vinos espumosos

Bruno Cisilotto^{1,2}, Fernando Joel Scariot¹, Luisa Vivian Schwarz¹, Ronaldo Kauê Mattos Rocha¹, Ana Paula Longaray Delamare¹, Sergio Echeverrigaray¹

¹ Laboratory of Enology and Applied Microbiology, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Brazil.

² Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Bento Gonçalves, Brazil.

En nuestro trabajo, demostramos que a un pH normalmente encontrado en los vinos base espumosos (2,8-3,3) se produce una sinergia entre el SO₂ añadido como conservante y el etanol presente en el vino base. Este sinergismo provoca un aumento del estrés de las levaduras que conlleva una importante pérdida de viabilidad, lo que a su vez provoca un aumento del tiempo de la fase de latencia, una fermentación lenta y dificultades para terminar la *prise de mousse*.

Creación de hipótesis y diseño experimental

La hipótesis de que el sinergismo entre el SO₂ y el etanol es el principal factor de estrés al inicio de la segunda fermentación de los vinos espumosos surgió a través de la observación de la reducción de la viabilidad de la población de levaduras y de las diferencias en los tiempos entre las fases de latencia en algunas fermentaciones durante la primera semana después de la inoculación del *ped-de-cuve*.

Como se ha visto en la introducción y a lo largo de la discusión en nuestro artículo¹, el estrés causado por el etanol y el SO₂ está bien descrito en la literatura. Existen cálculos y fórmulas en la literatura del vino para teorizar la fracción de SO₂ molecular que considera la concentración de etanol², y estudios que muestran la sinergia causada por el SO₂ y el etanol en vinos «listos» con levaduras de deterioro del vino. Además de las recomendaciones prácticas para que las concentraciones de SO₂ libre en los vinos base espumosos sean inferiores a 10 mg/L antes de iniciar la segunda fermentación³. Sin embargo, no hemos encontrado ninguna investigación en la literatura científica que describa el sinergismo entre el SO₂ y el etanol y que muestre el estrés causado en las cepas de levadura comúnmente utilizadas para la segunda fermentación de los vinos espumosos.

Con esta idea, creamos un modelo fermentativo experimental para comprobar el comportamiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118® (cepa comercializada específicamente para producir vinos espumosos) en diferentes entornos. Los tratamientos se separaron en un medio sintético sin SO₂ y etanol (control), sólo con SO₂, sólo con etanol y con ambos compuestos. De este modo, fue posible evaluar y comparar el comportamiento de las levaduras en cada sistema fermentativo mediante análisis con marcadores de estrés, marcadores de vitalidad y viabilidad celular, y la expresión de genes relacionados con el estrés causado por el SO₂.

Interpretación de los resultados

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos evidencian que la sinergia entre el SO₂ y el etanol intensifica el estrés y afecta significativamente la población de levaduras, provocando una disminución de la vitalidad y la viabilidad, un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), una disminución del pH intracelular, un aumento de la producción de acetaldehído y un aumento de la expresión de los genes relacionados con el

Sinergia entre el SO₂ y el etanol durante la segunda fermentación de los vinos espumosos

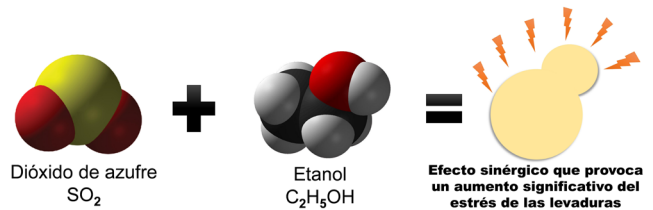


FIGURA 1. Resumen gráfico informativo del efecto sinérgico entre el SO₂ y el etanol.

estrés causado por el SO₂¹. El mismo efecto de disminución de la vitalidad y la viabilidad de la levadura se observó en una segunda fermentación realizada industrialmente con vino real¹. La figura 2 ilustra el efecto de cada tratamiento sobre la viabilidad y la cinética de fermentación. En este caso, el experimento se realizó a una temperatura de 20 °C. La viabilidad de las células se evaluó con el intercalador de ADN de yoduro de propidio (YP) utilizando un citómetro de flujo (Figura 2A) y la cuantificación de los azúcares reductores utilizando el método con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), y lector de microplacas con absorbancia a 595 nm (Figura 2B) (para más información, véase el artículo). Los resultados de la Figura 2, muestran el comportamiento de un inóculo adaptado al etanol en diferentes ambientes, simulando el inicio de una segunda fermentación. Se observa que en los tratamientos con la adición de sólo SO₂, las levaduras tienen un comportamiento muy semejante al control, pero muestran una pequeña reducción de la viabilidad en las primeras horas de adaptación. En el tratamiento con apenas etanol, no hay pérdida de viabilidad, pero sí una disminución de la velocidad de fermentación y del consumo de azúcar, debido a la inhibición del crecimiento de la población¹. En el tratamiento con 5 % de etanol y 20 mg/L de SO₂ es interesante observar que, aunque las levaduras tuvieron una pérdida de viabilidad ligeramente más pronunciada al principio y sufrieron más estrés¹, después de 48 h con la superación del estrés causado por el SO₂, la cinética de fermentación aumentó, lo que muestra que la cantidad de etanol juega un papel importante en el efecto sinérgico. En los tratamientos con cantidades iguales o superiores al 10 % de etanol y una cantidad inicial de SO₂ superior a 10 mg/L, se produjo una marcada disminución de la viabilidad de las levaduras y, en consecuencia, una reducción de la velocidad de consumo de azúcar. Esto ralentiza las fermentaciones y puede llegar a provocar paradas fermentativas.

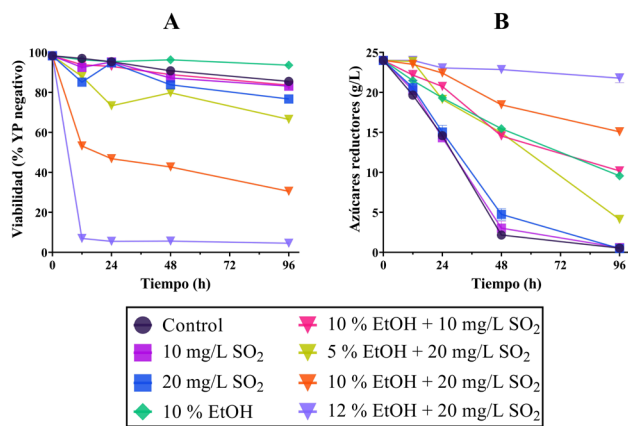


FIGURA 2. Influencia de cada tratamiento en la viabilidad y la cinética de fermentación. Adaptado de Cisolotto et al. (2021)¹.

Observaciones finales

Aunque hay varios estudios que buscan un sustituto con un amplio espectro de actividades como el SO₂⁴, aun no parece haber una alternativa para su uso en la elaboración industrial de vinos que tenga un efecto tan completo (actividad antioxidante y antimicrobiana), sea de bajo coste y seguro para el consumo humano. Así que probablemente seguiremos utilizando el SO₂ como conservante del vino durante mucho tiempo. Mientras tanto, en el caso de los vinos base para espumosos, que es un producto intermedio, las dosis de SO₂ libre deben ser muy precisas y personalizadas. Para esta dosificación es necesario, además del cálculo del SO₂ libre, hay que tener en cuenta el índice de pH, la concentración de etanol, la temperatura de almacenamiento, la turbidez del vino y la fuerza iónica de cada vino. La cantidad de células de levadura inoculadas para la segunda fermentación de los vinos espumosos desempeña un papel importante en la calidad del producto. Un exceso de células en el momento de la inoculación puede causar defectos sensoriales. Para evitar este exceso de células en la inoculación y una pérdida excesiva en el porcentaje de células viables al inicio del proceso, cuanto menor sea la concentración de etanol y la cantidad de SO₂ libre en el vino base, mejor será la adaptación de la levadura y, en consecuencia, mejor será la cinética de fermentación. Una

fermentación lineal y estandarizada puede evitar una serie de complicaciones logísticas y gastos innecesarios, especialmente en los vinos espumosos elaborados por el método tradicional, en los que la reinoculación del *pie-de-cuve* presupone la apertura de las botellas. Por lo tanto, unas concentraciones equilibradas de SO₂ y etanol minimizarán el estrés de las levaduras al inicio de la segunda fermentación de los vinos espumosos y, en consecuencia, minimizarán el «estrés» del enólogo encargado de llevar a cabo este proceso. ■

Información extraída del artículo de investigación "Yeast stress and death caused by the synergistic effect of ethanol and SO₂ during the second fermentation of sparkling wines" (OENO One, 2021).

- 1 Cisolotto, B., Scariot, F. J., Vivian Schwarz, L., Mattos Rocha, R. K., Longaray Delamare, A. P., & Echeverrigaray, S. (2021). Yeast stress and death caused by the synergistic effect of ethanol and SO₂ during the second fermentation of sparkling wines. *OENO One*, 55(4), 49–69. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.4.4809>
- 2 Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry* (first edit). Wiley.
- 3 Alexandre, H. (2019). Yeasts and Sparkling Wine Production. In P. Romano, M. Ciani, & G. H. Fleet (Eds.), *Yeasts in the Production of Wine* (pp. 395–432). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4_13
- 4 Lisanti, M. T., Blaiotta, G., Nioi, C., & Moio, L. (2019). Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 455–479. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12422>