

Efecto de la adición de fenilalanina en la vinificación de *Vitis vinifera* cv Chardonnay con la levadura *Hanseniaspora vineae*

Effect of phenylalanine addition during vinification of *Vitis vinifera* cv Chardonnay with the yeast *Hanseniaspora vineae*.

María José Valera¹, Valentina Olivera¹, Gabriel Pérez¹, Eduardo Boido¹, Eduardo Dellacassa² y Francisco Carrau¹
¹Área de Enología y Biotecnología de Fermentaciones, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

²Laboratorio de Biotecnología de Aromas, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Resumen. El aroma es una de las principales características organolépticas que confieren valor añadido al vino. Muchos compuestos volátiles con impacto en el aroma se pueden agrupar como bencenoides y fenilpropanoides. Estas moléculas derivan del metabolismo vegetal, aunque se ha demostrado que también las levaduras pueden sintetizarlas a partir de aminoácidos aromáticos, como la fenilalanina.

Entre las especies de levaduras que están relacionadas con la producción de vino, *Hanseniaspora vineae* posee características enológicas muy positivas, contribuyendo al aroma y textura. Concretamente, esta especie ha sido caracterizada por producir altas concentraciones de bencenoides y fenilpropanoides volátiles, en comparación con las levaduras convencionales en mostos con bajos niveles de nitrógeno asimilable. Por ello, realizar inoculación secuencial de *H. vineae* y *Saccharomyces cerevisiae* es una alternativa para mejorar la calidad aromática de los vinos.

En este estudio se propone determinar cómo la concentración de fenilalanina afecta a esta síntesis y a la calidad aromática de los vinos finales durante la fermentación con *H. vineae*.

Con este objetivo se llevaron a cabo fermentaciones de jugo de uva Chardonnay con 150 mgN/L de nitrógeno asimilable en volúmenes de 120 mL, suplementados con fenilalanina en una concentración de 60 mg/L y sin suplementar con este aminoácido como control. Las fermentaciones se inocularon de forma secuencial, inicialmente con tres cepas diferentes de *H. vineae* aisladas en viñedos uruguayos, y tras 96 horas con *S. cerevisiae* ALG804. Los aromas se analizaron al finalizar la fermentación mediante cromatografía de gases acoplada a detección por espectrometría de masas y se realizó un análisis sensorial.

Se verificó un aumento significativo de la concentración de bencenoides y fenilpropanoides por la adición de fenilalanina al mosto. El análisis sensorial reveló mayor carácter floral y complejidad aromática respecto al mosto sin fenilalanina añadida.

Abstract. Wine aroma is one of the main organoleptic characteristics that gives added value to wines. Many volatile compounds which impact in wine aroma are aromatic derived molecules that belong to bencenoids and phenylpropanoids families. These compounds are plant metabolites, but they can also be synthesized by yeast from aromatic amino acids, such as phenylalanine.

Among wine yeast species, *Hanseniaspora vineae* presents extraordinary positive oenological characteristics that contribute to aroma and texture. Specially, due to the production of great concentrations of bencenoids and phenylpropanoids compared with conventional *Saccharomyces* yeast. This production is enhanced by low nitrogen content in the must. For that reason, sequential inoculation of *H. vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* is an alternative to improve the aromatic quality of wines.

In this work, we propose to determine the impact on wine aroma of an increase in phenylalanine concentration. This amino acid is precursor of bencenoids and phenylpropanoids biosynthesis. The model microorganism used for these aromatic compounds production was *H. vineae*.

Fermentations were carried out in 120 mL Chardonnay grape juice containing 150 mgN/L of yeast assimilable nitrogen. Treatments were performed adding 60 mg/L of phenylalanine and control fermentations were made without any supplementary addition. Musts were inoculated sequentially. Three different *H. vineae* strains isolated from Uruguayan vineyards were tested in this study, added at the beginning of the process. After 96 hours of fermentation, *S. cerevisiae* ALG804 was inoculated to complete the process. At the end of the fermentation wine aromas were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry and sensorial analysis was carried out as well.

Bencenoids and phenylpropanoids were increased significantly when phenylalanine was added to the must. Sensorial analysis revealed higher floral character and aromatic complexity *versus* control fermentations without added phenylalanine.



1 Introducción

La producción industrial de vino tradicionalmente se realiza empleando inóculos de levaduras seleccionadas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Esta especie se considera buena fermentadora por su capacidad de completar la fermentación alcohólica de forma eficiente. Sin embargo, esta práctica hizo que se generasen muchos vinos con características sensoriales similares y en los últimos años se está introduciendo una tendencia a la diferenciación del producto [1]. Por esta razón surge la necesidad de seleccionar nuevas cepas de levaduras que tengan la capacidad de aportar aroma y textura a los vinos de calidad. El uso de levaduras no-*Saccharomyces* ha sido una opción para crear vinos con características diferenciales de forma alternativa al uso exclusivo de levaduras comerciales *Saccharomyces* [1, 2]. De entre las especies de levaduras no-*Saccharomyces*, el género *Hanseniaspora* es el que se encuentra en las uvas en mayor proporción como microorganismos epífitos [3]. Además, suelen dominar en las primeras horas de fermentación respecto a otros géneros de levaduras [4, 5]. Sin embargo, durante décadas se consideró que eran microorganismos no deseados para la producción enológica, por su reducida capacidad fermentativa. Una de las razones que se argumentaba para ello era su baja tolerancia a las altas concentraciones de etanol [6] lo que no permitiría completar correctamente la fermentación alcohólica. Por ello, generalmente se utiliza una estrategia de cultivos mixtos, donde las levaduras no-*Saccharomyces* aportan su potencial organoléptico y *Saccharomyces* consume los azúcares de forma eficaz. En inoculación secuencial, al principio se incorpora en el mosto la levadura no-*Saccharomyces*, y tras unos días de fermentación se inocula *S. cerevisiae* de forma que se asegura el final de la fermentación.

Una de las especies no-*Saccharomyces* que se ha destacado por su producción de compuestos aromáticos es *Hanseniaspora vineae* [5,7,8]. De hecho, se ha comprobado analíticamente que la inoculación secuencial de *Hanseniaspora vineae* y *Saccharomyces cerevisiae* puede favorecer la calidad final de los vinos aportando mejores aromas [5, 7]. *H. vineae* se caracteriza por producir altas cantidades de bencenoides y fenilpropanoides [9, 10]. Estas moléculas confieren al vino aromas florales y frutales [7]. En el caso de *H. vineae*, se ha visto que es capaz de producir mayor cantidad de estas moléculas cuando fermenta mostos con bajas concentraciones de nitrógeno asimilable [9]. Uno de los precursores de bencenoides y fenilpropanoides es el aminoácido aromático fenilalanina.

Si bien se ha visto que la adición de nitrógeno en forma de sales como el fosfato de diamonio puede inhibir la producción de compuestos aromáticos de la familia de los bencenoides y fenilpropanoides [9], un aumento de la cantidad de fenilalanina disponible en el mosto podría permitir incrementar la producción de estos compuestos, sirviendo como nutriente a las levaduras.

El objetivo del trabajo fue estudiar si la fenilalanina añadida podía variar la calidad aromática del vino. Para ello se realizaron fermentaciones con cultivos mixtos de

H. vineae y *S. cerevisiae* inoculadas secuencialmente utilizando un mosto de la variedad de uva Chardonnay con bajo contenido de nitrógeno. Se comparó la producción de aromas de tres cepas diferentes de *H. vineae* con la adición de fenilalanina respecto al mosto inicial sin añadir este aminoácido.

2 Metodología

2.1 Cepas

Las cepas utilizadas para este estudio fueron *H. vineae* T02/05AF, *H. vineae* T02/19AF, *H. vineae* M12/196F todas ellas aisladas de viñedos uruguayos y *S. cerevisiae* ALG804 (Oenobrand, France). Las cepas se crecieron en medio de cultivo Yeast Peptone Dextrose (2% de glucosa, 2% de peptona y 1% de extracto de levadura) antes de ser empleadas para el pie de cuba.

2.2 Condiciones de fermentación

El mosto de uva de la variedad Chardonnay fue tratado con dicarbonato de dimetilo (Sigma) en una concentración de 200 mg/L. Posteriormente se ajustó a una concentración de 150 mg/L de nitrógeno y 200 g/L de azúcar con la misma proporción de glucosa y fructosa en peso. Dicho mosto se filtró con membrana de 0,45 µm de diámetro de poro. Se realizó un pie de cuba con cada una de las cepas que se inocularon a partir de este mosto en un volumen de 50mL creciendo en agitación y a temperatura de 25°C durante una noche. A partir de cada pie de cuba con *H. vineae* se sembraron fermentaciones en un volumen final de 120 mL con un tamaño de población final de 1×10^5 células/mL. Las fermentaciones se realizaron por triplicado en cada tratamiento, tanto con fenilalanina añadida (60 mg/L) como sin añadir fenilalanina.

El pie de cuba de *S. cerevisiae* se creció a 25°C en agitación en un volumen de 100 mL y se inoculó 96 horas más tarde para alcanzar una concentración de 1×10^6 células/mL en cada fermentador. En ese momento se adicionaron 300 mg/L de fosfato de diamonio, 500 mg/L de extracto de levadura y 0,5 mg/L de tiamina para complementar los nutrientes del mosto. Los fermentadores se mantuvieron a 20°C estáticos y con una agitación cada 24 horas durante todo el experimento.

La evolución de la cinética de las fermentaciones se monitorizó mediante pesada cada 24 horas, evaluando la producción de alcohol de forma indirecta por descenso de peso al desprenderse CO₂. Las fermentaciones se consideraron terminadas cuando el peso permaneció estable durante 48h. Adicionalmente se comprobó que no hubiera contaminación con otras especies de levaduras o bacterias a los 4 y 10 días en placas de medio diferencial Wallerstein Laboratory Nutrient (WLN) Medium (Oxoid, USA). Tanto el mosto como el vino fueron analizados por espectroscopia del infrarrojo cercano utilizando un FOSS WineScan FT 120 (Dinamarca).

Una vez terminados, los vinos resultantes se centrifugaron para eliminar las células y se estabilizaron



añadiendo metabisulfito de sodio (50 mg/L). De cada muestra se emplearon 50 mL para realizar el análisis químico de compuestos volátiles y el resto se sometió a un análisis de evaluación sensorial.

2.3 Análisis sensorial

La evaluación sensorial consistió en test triangulares de cada una de las cepas, servidas en copas de cristal y analizadas por un panel de 8 jueces expertos. Adicionalmente se pidió a los jueces una descripción libre de los aromas de cada vino en cada tratamiento y cepa analizada.

2.4 Determinación analítica de aromas

El análisis químico consistió en una extracción de aromas mediante cartuchos Isolute (IST Ltd., Mid Glamorgan, U.K.) de poliestireno siguiendo la metodología descrita por Boido et al. [11]. Los compuestos extraídos en diclorometano fueron concentrados por evaporación y analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS). Como patrón interno se utilizó 2-octanol (Sigma, USA)

2.5 Tratamiento estadístico

Los resultados tanto sensoriales como analíticos fueron tratados estadísticamente mediante un análisis inicial de la varianza ANOVA y post-hoc usando el test de Tukey. Para ello se utilizó Statistica 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, 1984-2005).

3 Resultados y discusión

Todas las fermentaciones fueron completadas a los 13 días. La cinética de fermentación resultó similar en las tres cepas independientemente de la adición de fenilalanina en el mosto. Las cepas de *H. vineae* fueron recuperadas en placa tras las 96 horas de fermentación en concentraciones entre 1×10^6 y 1×10^7 ufc/mL y permanecieron viables en los vinos hasta los últimos días de la fermentación como reveló el crecimiento en placas de medio diferencial WLN.

El resultado de los análisis de aromas presentó una serie de diferencias significativas en compuestos producidos a partir de los aminoácidos aromáticos y se redujo la concentración de otras moléculas que no proceden del metabolismo de estos compuestos.

La concentración de alcohol isobutílico, 1-butanol, acetoina y metionol se vio reducida significativamente al añadir fenilalanina en el mosto. Este comportamiento fue similar en todas las cepas estudiadas aunque hubo diferencias significativas en la magnitud de esta reducción dependiendo de la cepa que se inoculó. Por otra parte, compuestos procedentes del catabolismo de la fenilalanina como el acetato de 2-feniletilo (Figura 1) incrementó su concentración hasta en un 33%.

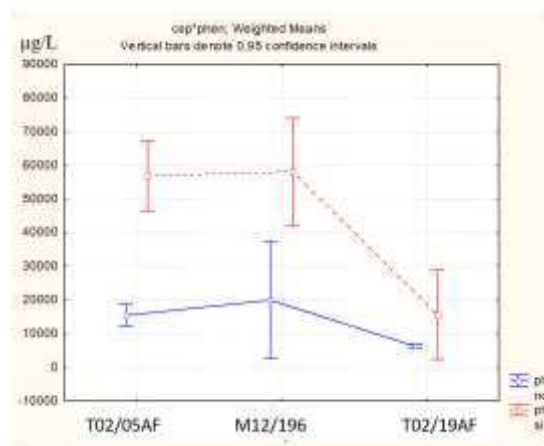


Figura 1. Concentración promedio de acetato de 2-feniletilo producido en las fermentaciones de cada una de las cepas estudiadas. En azul se representa el control y en rojo con fenilalanina añadida en el mosto. Las barras representan intervalos de confianza al 95%.

La cepa que produjo más cantidad de este compuesto fue *H. vineae* M12/196F. Esta cepa ya había sido previamente reportada como una productora de grandes concentraciones de bencenoides [9, 10]. Y se había demostrado que la adición de cantidades incluso menores de fenilalanina en el mosto produjo aumentos de la concentración de bencenoides en estudios previos [10]. Sin embargo, la concentración de acetato de 2-feniletilo en la cepa *H. vineae* T02/19AF no se incrementó significativamente a pesar de que también produjo mayor cantidad de este compuesto en promedio. Esta misma cepa incrementó la concentración de alcohol 2-feniletílico un 40% de promedio con la adición de fenilalanina en el mosto, llegando a una concentración de 34 mg/L que supera los 14 mg/L del umbral de percepción olfativa para este compuesto [7]. Estos compuestos presentan aroma floral, se asocia generalmente a las rosas, aunque está presente en aceites esenciales de otras flores como clavel o azahar. El acetato de 2-feniletilo (umbral sensorial 0,25mg/L) forma parte del llamado bouquet fermentativo, producido por las levaduras. En vinos jóvenes estos compuestos incrementan la complejidad aromática del producto [3].

Curiosamente, tanto moléculas derivadas de la fenilalanina como de la tirosina incrementan su concentración en los vinos elaborados a partir de mosto con adición de fenilalanina. El incremento de derivados de la fenilalanina era esperable debido a la adición de una mayor cantidad de precursor de estos. Sin embargo, también los derivados de tirosina como acetato de tirosol y tirosol incrementaron sus concentraciones en el vino final significativamente, contrariamente a lo que podría suponerse. Este comportamiento sugiere una interconversión de alguno o algunos de los metabolitos de las vías del catabolismo de los dos aminoácidos aromáticos como fue demostrado en plantas la conversión en fenilalanina de la tirosina [12].

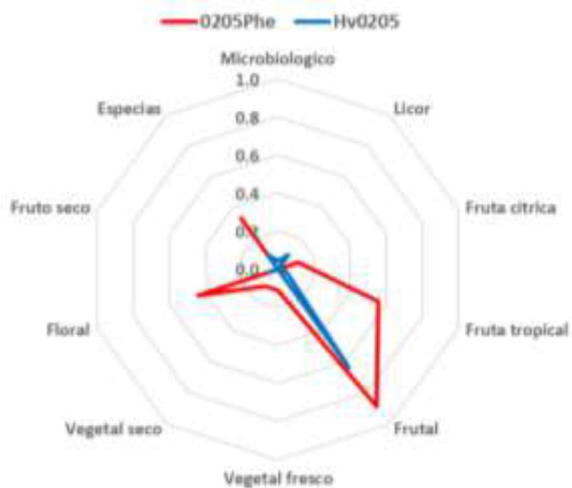


Figura 2. Análisis descriptivo de los vinos fermentados con la cepa Hv02/05AF sin fenilalanina (azul) y con fenilalanina añadida (rojo).

La descripción de aromas de cada una de las muestras reveló que en las tres cepas la complejidad aromática era mayor cuando se añadía fenilalanina respecto a la misma cepa sin añadir este aminoácido (Figura 2).

Los descriptores aromáticos secundarios aportados en la descripción de los jueces revelaron un mayor carácter floral en los vinos elaborados a partir de mosto con fenilalanina añadida respecto a los que no la tienen (Figura 3).

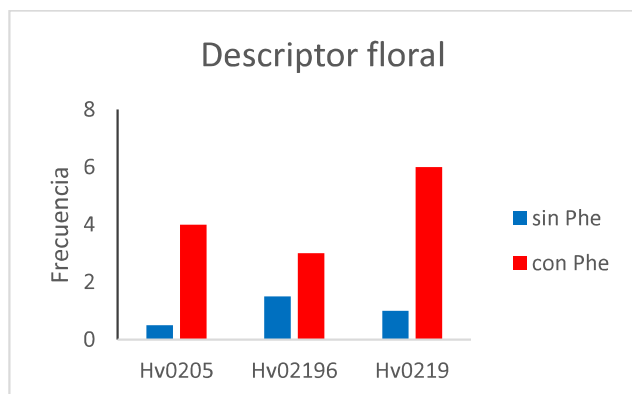


Figura 3. Frecuencia absoluta de uso de descriptores florales en la evaluación sensorial por todos los jueces.

Los resultados de la evaluación sensorial en test triangulares mostraron que de los 8 jueces expertos 6 fueron capaces de distinguir como diferentes aquellas las muestras que tenían fenilalanina añadida fermentadas con la cepa *H. vineae* T02/05AF respecto a las que no tenían este aminoácido añadido. Las muestras con el tratamiento de fenilalanina añadida fueron sensorialmente diferentes con un 5% de significación ($p \leq 0,05$). Además, los jueces consideraron los vinos con fenilalanina añadida como más agradables y con mayor intensidad aromática respecto a las muestras que no tenían este aminoácido añadido. Las cepas de *H. vineae* T02/19AF y M12/196F en fermentaciones con y sin fenilalanina añadida fueron diferenciadas correctamente sólo por 3 jueces en los tests triangulares.

4 Conclusión

El uso de levaduras no convencionales diferentes al género *Saccharomyces* comienza a implantarse como recurso enológico. El resultado de las fermentaciones con levaduras seleccionadas como *H. vineae* permite un mayor potencial aromático. Esta levadura tiene un metabolismo apropiado para la producción de aromas en bajas condiciones de nitrógeno. Añadir 60mg/L de fenilalanina en mostos de la variedad Chardonnay con bajo nitrógeno asimilable permite obtener mayor cantidad de aromas florales y frutales cuando se emplea *H. vineae* en la fermentación. Para una correcta elaboración con cultivos mixtos es recomendable iniciar la fermentación con *H. vineae* para generar la máxima cantidad de aromas. Pudiéndose a partir de las 96 horas inocular *S. cerevisiae* con un agregado de tiamina, fosfato de amonio y extracto de levadura.

5 Agradecimientos

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el proyecto *Hanseniaspora vineae* FMV 6956 y beca postdoctoral PD_NAC_2016_1_133945; y a las ayudas postdoctorales Clarín-COFUND del Principado de Asturias y la Unión Europea. También agradecen a Oeonobrands Francia, por la cepa suministrada de *S. cerevisiae*.

6 Referencias

1. S. Pretorius, *Yeast*, **16**, 675-729 (2000)
2. Varela, 2016 C. Varela, *App Microbiol Biotechnol*, **100**, 9861-9874 (2016)
3. V. Martín, M. Valera, K. Medina, E. Boido, F. Carrau. *Fermentation*, **4**, 76 (2018).
4. B. Padilla, L. Zulian, A. Ferreres, R. Pastor, B. Esteve-Zarzoso, G. Beltran, G., A. Mas, *Front Microbiol*, **8**, 1293 (2017)
5. J. Lleixà, V. Martín, M. D. C. Portillo, F. Carrau, G. Beltran, A. Mas, *Front Microbiol*, **7**, 338 (2016)
6. C. Pina, C. Santos, J. A. Couto, T. Hogg, *Food Microbiol*, **21**, 439-447 (2004)
7. K. Medina, E. Boido, L. Fariña, O. Gioia, M. E. Gomez, M. Barquet, C. Gaggero, E. Dellacassa, F. Carrau, *Food Chem*, **141**, 2513-2521 (2013).
8. F. Viana, C. Belloch, S. Vallés, P. Manzanares, *Int J Food Microbiol*, **151**, 235-240 (2011).
9. V. Martín, E. Boido, F. Giorello, A. Mas, E. Dellacassa, F. Carrau, *Yeast*, **33**, 323-328 (2016)
10. V. Martín, F. Giorello, L. Fariña, M. Minteguiaga, V. Salzman, E. Boido, P. S. Aguilar, C. Gaggero, E. Dellacassa, A. Mas, F. Carrau, *J Agric Food Chem* **64**, 4574-4583 (2016)
11. E. Boido, A. Lloret, K. Medina, L. Fariña, F. Carrau, G. Versini, E. Dellacassa, *J Agric Food Chem*, **51**, 5408-5413 (2003)
12. H. Yoo, J. R. Widhalm, Y. Qian, H. Maeda, B. R. Cooper, A. S. Jannasch, I. Gonda, E. Lewinsohn, D. Rhodes, N. Dudareva, *Nature Comm*, **4**, 2833 (2013)