

CAPACIDAD DE LAS LEVADURAS ENOLÓGICAS DE CONSUMIR FRUCTOSA

Ann DUMONT¹, Céline RAYNAL², Françoise RAGINEL², Anne ORTIZ-JULIEN², Carlos Suarez³, Jose María Heras³.

¹ Lallemand, 1620 rue Préfontaine, Montréal, QC H1W 2N8 Canadá

² Lallemand S.A., 19, rue des Briquetiers, Blagnac CEDEX 31702 Francia

³ Lallemand España, Zurbano 71, oficina 6, Madrid 28010 España.

Introducción

Las paradas de fermentación han sido objeto de numerosos estudios, y muchos de estos han determinado los factores responsables de este problema fermentativo. La investigación ha demostrado que ciertas condiciones de fermentación, como deficiencias nutricionales, elevados niveles de azúcares iniciales y presencia de compuestos inhibidores, pueden dar lugar a problemas fermentativos. Los resultados de este tipo de investigaciones están ayudando a los enólogos a disminuir de forma significativa los riesgos de paradas fermentativas.

En condiciones enológicas, los principales azúcares fermentables por *Saccharomyces cerevisiae* son glucosa y fructosa. Estas dos hexosas se encuentran generalmente presentes en los mostos en cantidades iguales, pero esta proporción puede variar en algunos mostos. *S. cerevisiae* prefiere consumir glucosa, lo cual explica que cuando las fermentaciones se paran, los azúcares que quedan están constituidos principalmente por fructosa. La frecuencia de las paradas de fermentación con fructosa residual plantea la cuestión de la capacidad de la levadura de consumir esta hexosa.

Las cinéticas de utilización de los azúcares por *S. cerevisiae* durante las fermentaciones son llevadas a cabo mayoritariamente a través del transporte de los azúcares y, por regla general, la glucosa es consumida a mayor velocidad que la fructosa. En las fermentaciones lentas, la velocidad máxima de fermentación se reduce cuando la mayor parte de la glucosa ha sido consumida, y la fermentación se puede parar cuando queda una concentración significativa de fructosa. De acuerdo con la literatura, el nivel de glucosa residual en vinos con paradas de fermentación es 10 veces menor que las concentraciones de fructosa. Según Gafner y Schütz (1996), es posible pronosticar una parada de fermentación cuando la relación glucosa/fructosa (GFR) es inferior a 0.1.

Durante la fermentación alcohólica, los azúcares son consumidos principalmente durante la fase estacionaria. En esta fase, el nitrógeno disponible empieza a disminuir gradualmente, y teniendo en cuenta que se trata de un nutriente esencial implicado en el transporte de los azúcares dentro de la célula a través de la síntesis de proteínas, esto explica parcialmente por qué tanto el metabolismo de las levaduras como la actividad fermentativa (Salmon, 1996) se reduce. El grado alcohólico también aumenta gradualmente convirtiéndose en tóxico para la célula de levadura, y haciendo que la utilización de fructosa se haga cada vez más difícil.

A nivel molecular, la investigación ha confirmado los genes que codifican los transportadores de hexosas en la levadura. En condiciones enológicas hay numerosos genes implicados en el transporte de los azúcares, que está regulado por una amplia familia multigen denominada HXT. Existen 20 genes HXT. Hxt1 y Hxt7 son los principales transportadores. Hxt2, Hxt6 y Hxt7 son portadores de elevada afinidad, mientras que Hxt1 y Hxt3 son portadores de baja afinidad. Otros numerosos portadores Hxt tienen afinidades intermedias. Tanto los portadores de elevada como de baja afinidad presentan una mayor afinidad por la glucosa que por la fructosa, lo que podría afectar a la velocidad de utilización de estas hexosas. La concentración de hexosas en el medio influenciará la expresión de cada uno de los genes HXT. (Perez et al, 2005; Guillaume et al, 2007). Ha sido demostrado que Hxt3 tiene la mayor capacidad de soportar la fermentación (Luyten et al., 2002) y estudios muy recientes evidenciaron también que el gen Hxt3 es, en efecto, responsable de la capacidad de algunas levaduras de consumir fructosa (Guillaume et al., 2007). También demostraron que una mutación en un alelo del gen Hxt3 era responsable del mejor funcionamiento de las levaduras vínicas gracias a la utilización de la fructosa durante la fermentación o en el caso de paradas de fermentación.

Es un hecho comprobado que existen variaciones en la capacidad de las levaduras de consumir fructosa. El objetivo de este estudio era evaluar los comportamientos fermentativos de levaduras seleccionadas obtenidos en condiciones enológicas, poniendo especial atención en su capacidad para consumir fructosa. Se desarrolló un método para determinar el “índice fructofílico”, que podría ayudar a determinar la capacidad de una determinada levadura para consumir fructosa.

El carácter “fructofílico” de las levaduras

En nuestras experimentaciones, evaluamos la capacidad de las levaduras de utilizar fructosa, basándonos en criterios fenotípicos medibles.

Las diferentes levaduras comerciales fueron seleccionadas por su capacidad para fermentar mostos con altas concentraciones de azúcares y por su aptitud para reanudar las fermentaciones paradas.

Se estudió el efecto de varios parámetros enológicos:

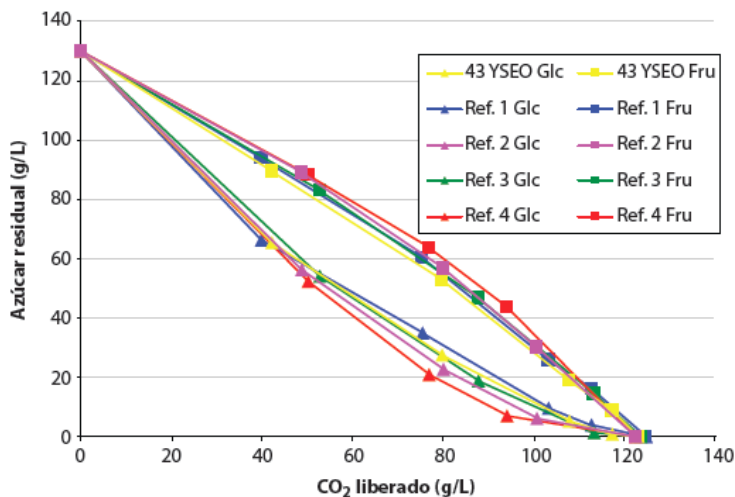
- Los niveles iniciales de azúcares
- La relación glucosa/fructosa (GFR)
- El nivel inicial de nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (NFA)
- La temperatura de fermentación.

Los criterios evaluados para cada una de las levaduras fueron:

- **Actividad fermentativa** – Las cinéticas de fermentación están representadas por la velocidad de fermentación en términos de tiempo o de CO₂ liberado
- **Las cinéticas de consumo de glucosa y fructosa** – Para evaluar y diferenciar la capacidad de las levaduras en cuanto a la asimilación de fructosa, se determinó el contenido de glucosa y fructosa durante toda la fermentación con el fin de evaluar las cinéticas de consumo de azúcar.

El índice fructofílico se basó en el cálculo del área entre las curvas de consumo de glucosa y fructosa por la misma levadura en función del CO₂ liberado (Figura 1), y fue el criterio elegido para evaluar la capacidad de cada una de las levaduras de consumir fructosa y para compararlas entre ellas. Nos centramos en el área situada en la última mitad de la fermentación ya que éste es el área crítica en la que los azúcares son principalmente consumidos. Cuanto menor es el área, más cercanas están las cinéticas de consumo de fructosa a las cinéticas de consumo de glucosa. Elegimos este valor para representar cada una de las levaduras y para clasificar las cepas de levaduras enológicas de acuerdo con su capacidad para utilizar fructosa. Las levaduras cuyas cinéticas de consumo de fructosa son parecidas a las de la glucosa son las levaduras que presentan carácter “fructofílico” y pueden comportarse mejor en aquellas situaciones con niveles elevados de fructosa.

Figura 1. Evolución de glucosa y fructosa durante la fermentación alcohólica. Comparación de 5 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; Medio MS300 130 Glucosa/Fructosa (130 g/L de cada azúcar); 24°C; 25 g/hL.



Para validar nuestro sistema de ranking, incluimos en el estudio una levadura testigo de muy buena reputación descrita como poseedora de un fuerte carácter “fructofílico” (Guillaume et al., 2007).

Materiales y métodos

Levaduras enológicas. Utilizamos varias levaduras enológicas disponibles en el mercado y en algunos casos levaduras seleccionadas por su capacidad para reanudar las fermentaciones paradas, como por ejemplo UVAFERM® 43. En un principio se probaron diecinueve levaduras comerciales disponibles, de las que quedaron cuatro en base a su comportamiento excepcional para reanudar fermentaciones paradas, además de UVAFERM® 43 (YSEO). Estas fueron codificadas como Ref. 1, Ref. 2....hasta Ref. 4.

Durante las fermentaciones por microvinificación, las levaduras fueron inoculadas en 1,1 L de medio dentro de fermentadores de 1,2 litros de capacidad. La dosis de inoculación fue de 25 g/hL (que corresponde a cerca de 5×10^6 células/mL).

Ambiente fermentativo. Para comparar diferentes levaduras enológicas comercialmente disponibles, decidimos trabajar en un ambiente estándar: un medio sintético que imita la composición del medio (MS300) descrito por Bely et al., 1991, con algunas modificaciones con respecto al nivel inicial de azúcares (utilizamos de forma sistemática una cantidad de fructosa equivalente a la de glucosa, o una cantidad más elevada en las pruebas en las que GFR era <1). Del mismo modo, variamos las concentraciones de nitrógeno total desde 100 mg/L hasta 400 mg/L según la prueba.

Fermentación. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en agitación continua, a 18°C, 24°C ó 28°C en fermentadores de 1,2 litros de capacidad.

Velocidad de las fermentaciones

CO₂. Se determinó la cantidad de CO₂ liberado, cada 20 minutos, mediante análisis automático de la pérdida de peso de cada uno de los fermentadores. La validez de esta técnica, desarrollada por Jean-Marie Sablayrolles del INRA de Montpellier para estimar los niveles de azúcar y alcohol, ha sido descrita en numerosas publicaciones, incluido El Haloui et al., 1988 y Sablayrolles et al., 1987.

Velocidad de producción de CO₂ (dCO₂/dt). La velocidad de producción de CO₂ fue calculada por suavizado polinomial de los últimos 11 valores de CO₂ liberado. La frecuencia de las determinaciones de la liberación de CO₂ y la precisión de la pesada (de 0,1 g a 0,01 g) nos permitió calcular repetidamente la velocidad de las fermentaciones con gran precisión (Bely et al., 1990).

Consumo de glucosa y fructosa

Se tomaron muestras durante la fermentación; tras su centrifugación, se determinaron los azúcares en el sobrenadante con ayuda del kit ENZYTEC™ D-Glucosa/D-Fructosa (Scil Diagnostics GmbH, Alemania).

Se estudiaron diferentes condiciones enológicas, incluyendo los diferentes niveles iniciales de azúcares pero en este artículo presentaremos sólo las siguientes condiciones enológicas:

1. Temperatura de fermentación: 24°C
Medio sintético con **NFA alto** (MS300) y nivel alto de azúcares
Azúcares totales: **260 g/L, GFR = 1 (glucosa = 130 g/L y fructosa = 130 g/L)**
2. Temperatura de fermentación: 24°C
Medio sintético con **NFA alto** (MS300),
Azúcares totales: **260 g/L, GFR = 0.33 (glucosa = 65 g/L y fructosa = 195 g/L)**
3. Temperatura de fermentación: 24°C
Medio sintético **deficiente en NFA (MS70)**
Azúcares totales: **260 g/L, GFR = 0.33 (glucosa = 65 g/L y fructosa = 195 g/L)**

4. Temperatura de fermentación: 18°C
Medio sintético con **NFA alto** (MS300),
Azúcares totales: **260 g/L, GFR = 0.33 (glucosa = 65 g/L y fructosa = 195 g/L)**
5. Temperatura de fermentación: 28°C
Medio sintético con **NFA alto** (MS300),
Azúcares totales: **260 g/L, GFR = 0.33 (glucosa = 65 g/L y fructosa = 195 g/L)**

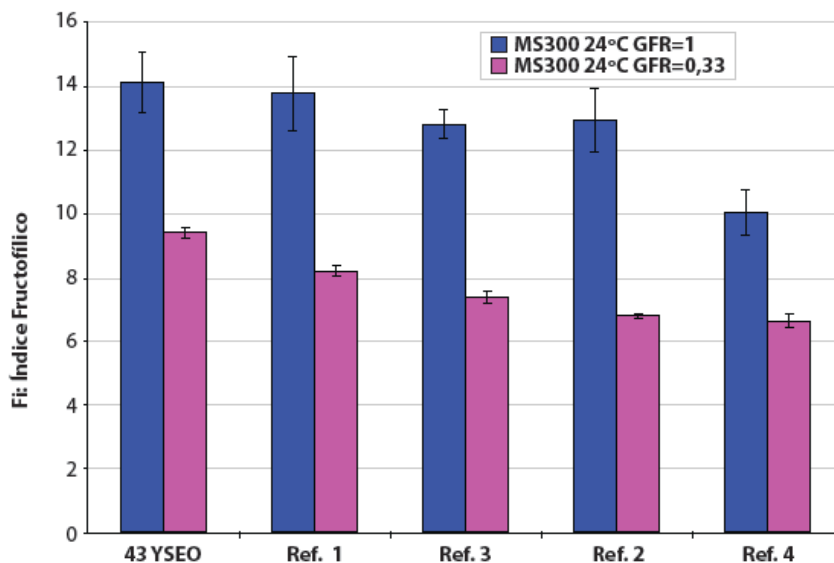
Dado el elevado número de condiciones estudiadas, no todos los datos de cinéticas de fermentación y de velocidad de consumo de azúcares han sido presentados en este artículo.

Resultados

Efecto de la relación glucosa/fructosa

La única variable entre las condiciones enológicas 1 y 2 era el GFR: los respectivos niveles de las dos hexosas eran idénticos en la condición 1 mientras que en la condición 2 había tres veces más fructosa que glucosa. Se efectuó el seguimiento de los dos azúcares durante la fermentación, y se calculó la diferencia de asimilación de los dos azúcares para obtener el índice fructofílico. La Figura 2 muestra los resultados de las cinco levaduras estudiadas en las condiciones 1 y 2, e independiente del nivel de GFR (igual a 1 o a 0.33), UVAFERM YSEO® 43 fue la levadura que mostró la mayor capacidad para consumir fructosa. El ranking de las levaduras en función de su capacidad para consumir fructosa se mantuvo con las dos diferentes relaciones glucosa/fructosa consideradas. La figura muestra también que cuando el GFR es menor que 1, el índice fructofílico es también menor. Sin embargo se observa que algunas levaduras están menos afectadas que otras. Por ejemplo, UVAFERM YSEO® 43 y Ref. 4 parecen estar menos afectadas que las otras tres, como muestra el nivel de reducción del índice fructofílico.

Figura 2. Efecto del GFR sobre el índice fructofílico para diferentes levaduras comerciales.



El efecto del contenido de nitrógeno

Cuando se comparan las condiciones enológicas 2 y 3, en las que la única variable era el nivel inicial de NFA, con un GFR <1, se observa que la levadura UVAFERM YSEO® 43 presenta todavía el mejor comportamiento con respecto al consumo de fructosa (Figura 3), y que la capacidad de las levaduras de utilizar fructosa también se mantiene, sin importar si el NFA está disponible o si hay deficiencia de nitrógeno (<150 mg/L).

La figura 4 muestra el efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la actividad fermentativa de las levaduras. La duración de la fermentación fue cerca de cuatro veces mayor en la MS70, y se produjo un efecto notable sobre la velocidad máxima de fermentación, como en el caso de la deficiencia de nitrógeno, el metabolismo de la levadura ralentizó significativamente. Esto concuerda con la literatura (Salmon, 1989, Salmon et al., 1993). Trabajar con un medio deficiente en nitrógeno es una oportunidad para discernir mejor el comportamiento de las levaduras, y para demostrar la variabilidad en cuanto a las necesidades de nitrógeno entre las levaduras. Estos resultados son perfectamente coherentes con los de un estudio precedente (Julien et al., 2001). Estos resultados muestran también que los niveles iniciales de nitrógeno tienen una influencia muy significativa sobre la actividad fermentativa de las levaduras, pero no afectan a su capacidad variable de utilizar la fructosa. En las dos condiciones, UVAFERM YSEO® 43 fue la que completó antes la fermentación con una velocidad de fermentación regular.

Figura 3. Ranking de levaduras seleccionadas en función de la diferencia en el consumo de azúcar en un medio con una relación glucosa /fructosa = 0.33 y con diferentes niveles de nitrógeno (medio deficiente en nitrógeno o con elevado nivel de nitrógeno).

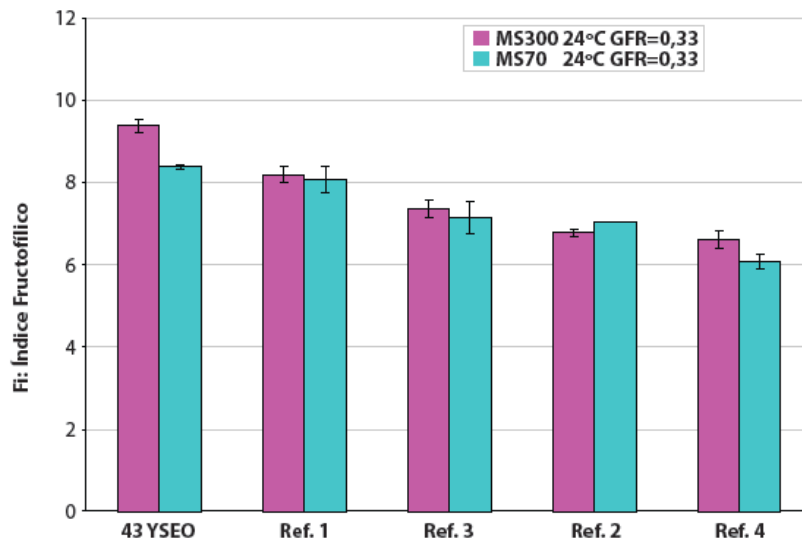
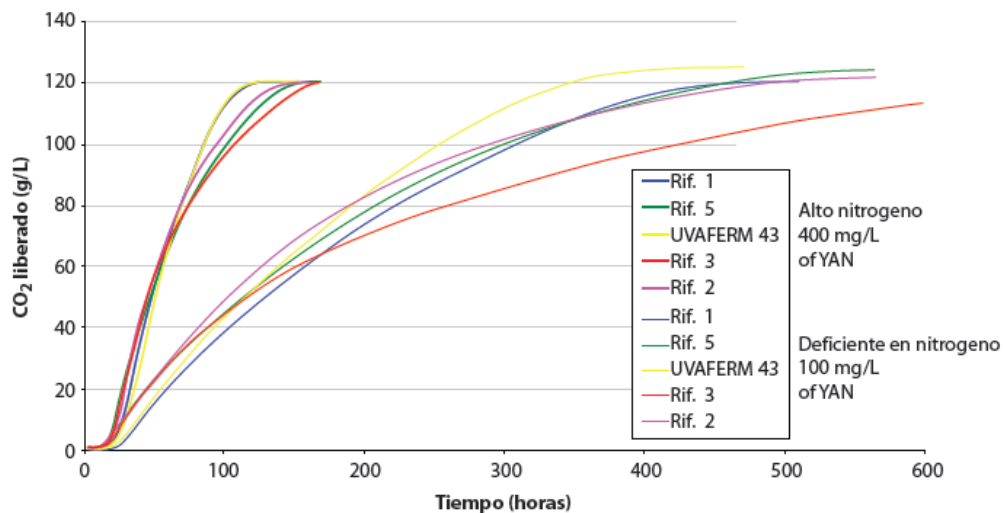


Figura 4. Comparación del comportamiento fermentativo de las levaduras en un medio con una relación Glucosa/Fructosa = 0.33 y con diferentes niveles de nitrógeno (medio deficiente en nitrógeno o alto en nitrógeno).



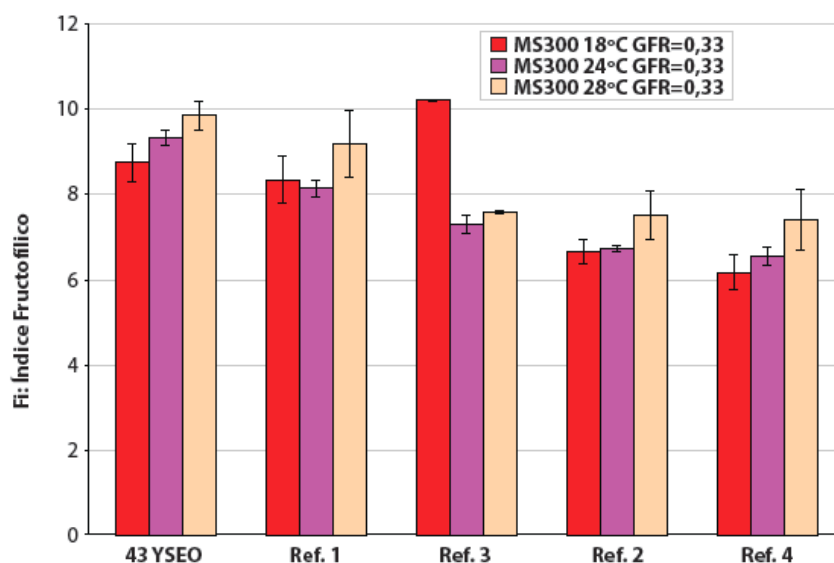
El efecto de la temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la capacidad de las levaduras de asimilar fructosa (Figura 5). Los resultados indicaron que esta capacidad aumentaba con la temperatura independientemente de la levadura considerada, excepto para una específica levadura (Ref. 3). En ese caso, se vio que el índice fructofílico aumentó significativamente cuando la fermentación fue conducida a 18°C, comparada con la fermentación a temperatura más elevada, pero también comparada con las otras levaduras. Esta levadura (Ref. 3) es conocida por adaptarse bien a las fermentaciones a bajas temperaturas, y esto podría explicar su comportamiento.

Excepto para esta particular situación, el ranking entre las levaduras seleccionadas se mantuvo igual, con el mejor índice fructofílico para la UVAFERM YSEO® 43, independientemente de la temperatura.

El hecho de que la capacidad de las levaduras de asimilar la fructosa es menor a bajas temperaturas puede ser explicado por el metabolismo más lento de la levadura cuando la temperatura disminuye.

Figura 5. Ranking de levaduras seleccionadas en función de la diferencia de consumo de azúcar en un medio con una relación glucosa/fructosa = 0.33 a diferentes temperaturas.



Conclusión

La levadura UVAFERM YSEO® 43 mostró siempre el menor área entre las curvas de consumo de glucosa y fructosa durante la última mitad de la fermentación y, por consiguiente, presentó el índice fructofílico más elevado, lo que significa que esta levadura tiene la mejor capacidad para asimilar fructosa, independientemente del GFR, del nitrógeno o de los niveles de temperatura. Aunque en este artículo este comportamiento ha sido mostrado sólo para el caso particular de cinco levaduras, sin embargo fue estudiado en otras 19 levaduras seleccionadas obteniendo los mismos resultados.

Las levaduras seleccionadas diferían en su capacidad para consumir fructosa, y éste es un indicador del comportamiento en mostos potencialmente problemáticos, en los que el GFR es menor y/o las condiciones del mosto son difíciles. El índice fructofílico determinado como la diferencia de área entre las curvas de consumo de glucosa y fructosa puede ser una herramienta utilizada para evaluar la capacidad fructofílica de las levaduras vínicas, y para caracterizar este fenotipo y evitar paradas de fermentación.

El estudio para la caracterización de la levadura UVAFERM YSEO® 43 continúa con una investigación a fondo sobre su capacidad para reanudar fermentaciones paradas y para desarrollar protocolos fiables para cada situación.

Referencias

- Bely, M., J. M. Sablayrolles, and P. Barre. 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am J Enol Vitic.* 41:319-324.
- Bely, M., J. M. Sablayrolles, and P. Barre. 1991. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J Ferm Bioeng.* 70:246-252.
- Bely, M., J. M. Salmon, and P. Barre. 1994. Assimilable nitrogen addition and hexose transport activity during enological fermentations. *J Inst Brew.* 100:279-282.
- Bisson, L. F. Glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of potassium in stuck fermentation. Proceedings of the 2000 *Entretiens Scientifiques Lallemand*, Krems, Austria. 27-33.
- McClellan, C. J., A. L. Does, and L. F. Bisson. 1989. Characterization of hexose uptake in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *Am J Enol Vitic.* 40:9-15.
- El Haloui, N., D. Picque, and G. Corrieu. 1988. Alcoholic fermentation in wine-making: on line measurement of density and carbon dioxide evolution. *J Food Eng.* 8:17-30.
- Gafner, J., and M. Schütz. 1996. Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: practical experience to restart stuck fermentations. *Vitic Enol Scien.* 51:214-218.
- Guillaume, C., P. Delobel, J. M. Sablayrolles, and B. Blondin. 2007. Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 73(8):2432-2439.
- Perez, M., K. Luyten, R. Michel, C. Riou, and B. Blondin. 2005. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Res.* 5:351-361.
- Sablayrolles, J. M., P. Barre, and P. Grenier. 1987. Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal oenological conditions. *Biotech Tech.* 1:181-184.
- Salmon, J. M. 1989. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 55:953-958.
- Salmon, J. M., O. Vincent, J. C. Mauricio, M. Bely, and P. Barre. 1993. Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentation. *Am J Enol Viticul.* 44:56-64.
- Salmon J. M. 1996. Sluggish and stuck fermentations: some actual. trends on their physiological basis. *Vitic Enol Sci.* 51:137-140.