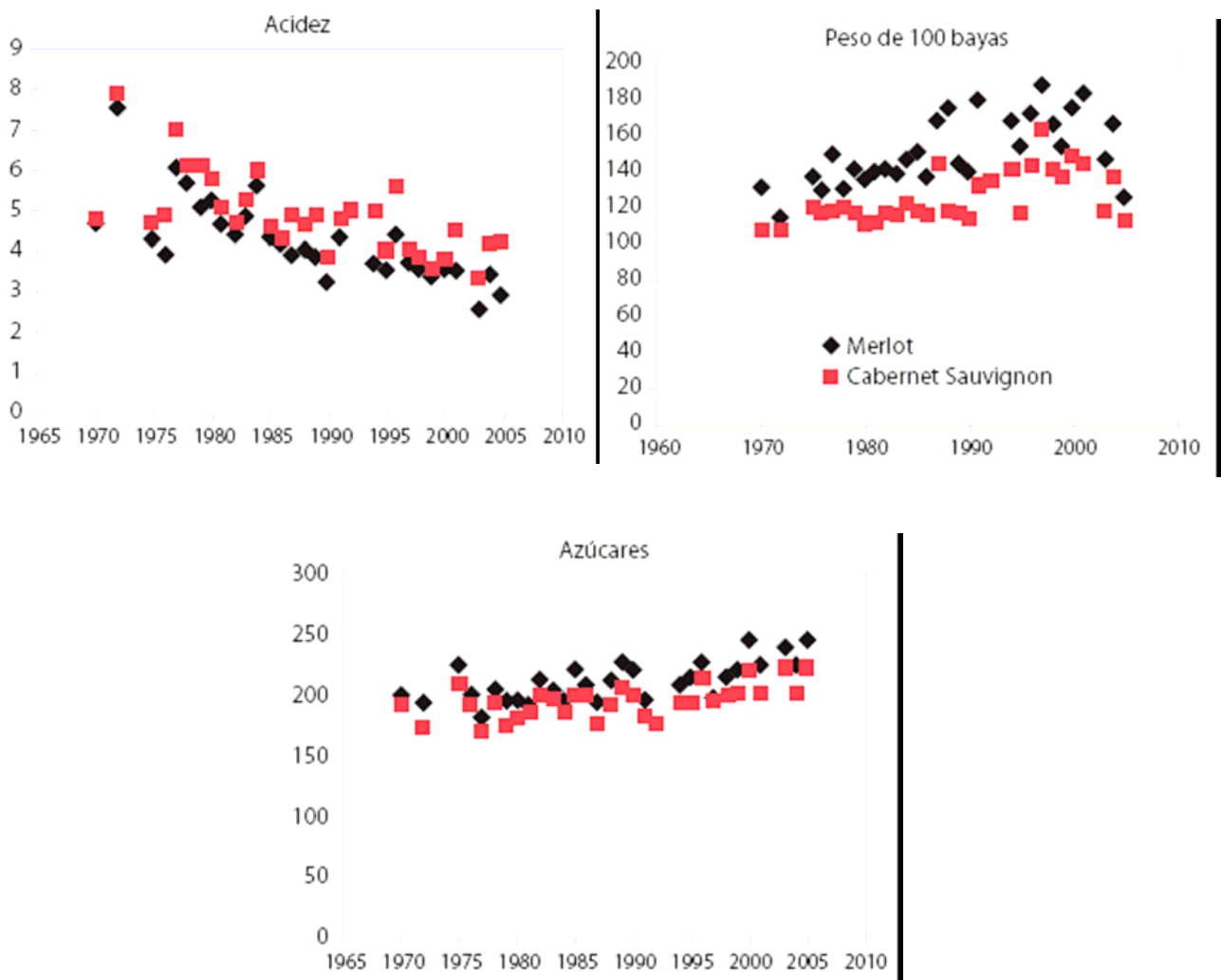


LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL POR LAS LEVADURAS VÍNICAS

Lallemand I&D

Durante estos últimos años se ha estado observando un incremento en los niveles de alcohol de los vinos. En parte este fenómeno puede ser explicado por el cambio climático, como se puede ver en la Figura 1 en donde se muestra la evolución de las uvas de calidad a lo largo de los últimos 35 años en Burdeos. Este fenómeno se ha visto también acentuado por el uso de variedades de madurez elevada, así como por unas vendimias cada vez más tardías. En función del clima, las uvas pueden presentar diferencias entre el nivel de madurez tecnológica, aromática y fenólica. Un verano excesivamente caluroso refuerza todavía más esta diferencia.

Figura 1. Evolución de la calidad de las uvas en vendimia a lo largo de los últimos 35 años en la Appellation Pessa Leognan de Burdeos para las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon (INRA Burdeos).



La tendencia actual es dar preferencia a vendimias tardías para obtener vinos más redondos y con más color. Esto requiere unas uvas en fermentación con unas concentraciones de azúcares a menudo muy elevadas, lo que da lugar a problemas de fermentación y a unos vinos con aromas a frutas cocidas y sensación ardiente debida al alcohol. Para limitar estos problemas técnicos y satisfacer las demandas del consumidor de vinos equilibrados, muchos enólogos están dirigiendo la atención hacia unos vinos con unos niveles de alcohol moderados. Por otro lado, algunos países están sometidos a presiones económicas a causa del gravamen impuesto a los grados de alcohol.

Actualmente los enólogos están buscando herramientas para controlar la fermentación alcohólica (FA) y en cierto modo limitar la producción de alcohol. Dentro de este contexto, la investigación se está interesando por diferentes medios microbiológicos para reducir la producción de alcohol. Recientemente se han llevado a cabo varios estudios con el objetivo de proponer cepas de levadura que produzcan un menor nivel de alcohol a partir de la misma cantidad de azúcar consumido. Este número de *Winemaking Update* informa sobre los principales enfoques desarrollados recientemente con este objetivo y sobre las estrategias previsibles para el futuro.

El metabolismo de la fermentación alcohólica

Azúcares → Alcohol + CO₂ + calor + compuestos secundarios

Glucosa y fructosa – los dos azúcares metabolizados por la levadura – son degradados durante la glicólisis. El alcohol representa el principal producto de la FA. Una parte significativa de los azúcares es utilizada para formar la biomasa y otros subproductos de la fermentación (glicerol, ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes superiores), lo que significa que el índice de transformación de los azúcares en alcohol alcanza del 92% al 93%. La producción de etanol durante la FA es de 0.47 g de alcohol por gramo de azúcar; se necesitan 16,8 g de azúcar para obtener un grado de alcohol.

Producción de alcohol por cepas de levadura seleccionadas

Un estudio llevado a cabo por Lallemand en 2007 comparó la mayoría de las cepas seleccionadas en función de su producción de alcohol. A través de microvinificaciones

efectuadas a escala de laboratorio se determinó la producción de alcohol por parte de levaduras seleccionadas disponibles de los principales productores de levaduras. Se compararon sesenta y cinco diferentes levaduras *Saccharomyces cerevisiae* mediante una simulación del proceso de vinificación de mostos de uva tinta, y del mismo modo se efectuaron pruebas con mostos blancos utilizando 60 levaduras diferentes. En total, se probaron 113 levaduras genéticamente distintas, lo que parecía representar la mayor parte de las levaduras seleccionadas utilizadas en general por los enólogos de todo el mundo. Las fermentaciones experimentales de vinos blancos fueron llevadas a cabo en un medio modelo que contenía 200 g/L de azúcar (alcohol probable 12%) y simulaban un mosto clarificado con niveles iguales de nitrógeno. En los vinos tintos, el medio modelo contenía 280 g/L de azúcar (alcohol probable 16%), con un nivel de nitrógeno adecuado. Las temperaturas de fermentación fueron de 15°C para los blancos y de 28°C para los tintos. Los valores obtenidos (Figura 2) en los vinos blancos mostraron que 56 levaduras asimilaron todos los azúcares, alcanzando niveles de alcohol entre 11.75% y 12.09% v/v. Por tanto la máxima diferencia de grado alcohólico fue de sólo 0.34% v/v. En los vinos tintos (Figura 2), los niveles de alcohol variaron entre 16.55% y 17.06% en volumen, presentando una diferencia máximo de 0.51% v/v.

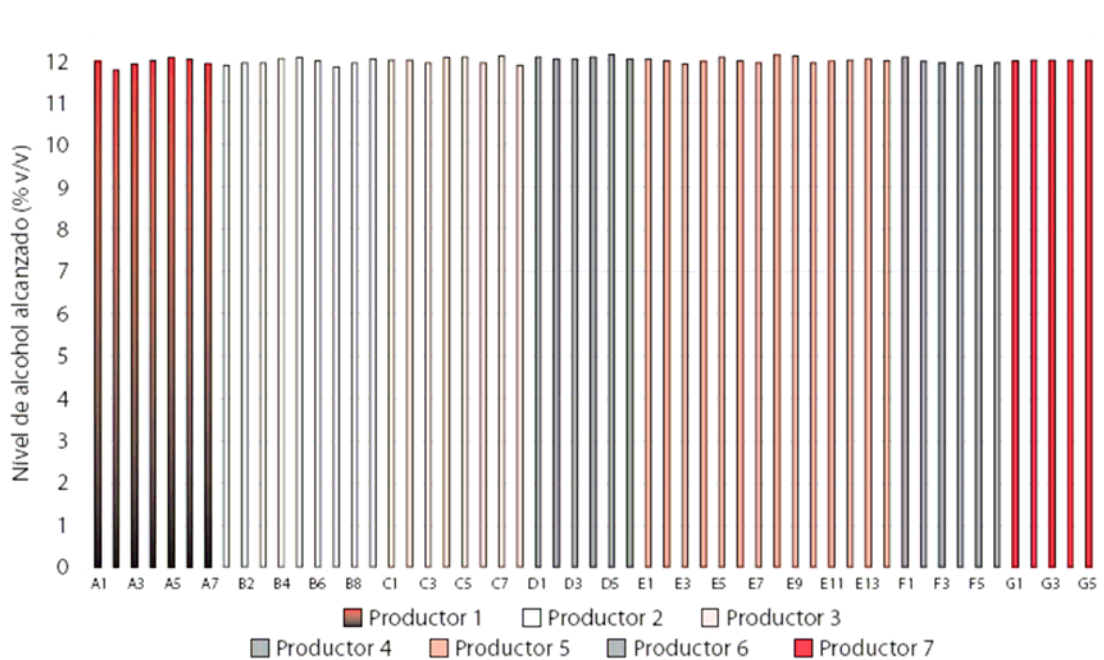


Figura 2: Nivel de alcohol alcanzado (%v/v) tras la inoculación de 56 cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en vinos blancos que fermentaron todos los azúcares (Palacios et al., 2007).

Estas variaciones corresponden a la diferencia teórica asociada al error analítico. Este trabajo experimental nos permitió concluir que las actuales cepas de *S. cerevisiae* presentan unas diferencias mínimas en términos de rendimiento de la transformación de azúcares en alcohol.

No existe hoy en día ninguna levadura, entre las cepas de *S. cerevisiae* conocidas, que produzca menores niveles de alcohol. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la literatura.

Diferentes estrategias dirigidas a disminuir la producción de alcohol de las levaduras

Para obtener levaduras que produzcan de 1° a 2° menos de alcohol al final de la FA, muchas de las investigaciones se están centrando en la modificación del metabolismo de la levadura, respetando al mismo tiempo las normativas en vigor sobre el uso de microorganismos en el vino.

Este enfoque consiste en favorecer determinadas rutas metabólicas en detrimento de aquella que produce alcohol. Una parte de los azúcares es desviada hacia subproductos distintos del alcohol; su acumulación no deberá tener ningún efecto negativo sobre las cualidades sensoriales del vino. Las modificaciones no deben afectar a las propiedades de la levadura (capacidad de fermentación, crecimiento, etc.). La elección de los metabolitos diana es crucial, ya que el reto es seleccionar las rutas metabólicas de la levadura responsable de la cesión al vino de compuestos positivos, como por ejemplo el glicerol y de algunos compuestos neutros, sin ningún efecto sensorial negativo, como la producción de CO₂.

Es posible desviar una parte de los azúcares hacia la ruta de la pentosa fosfato, que compite con la glicólisis, a través del método de selección adaptativo. Al eliminar parte de la molécula de carbono como CO₂, la amplificación de esta ruta disminuye el carbono disponible para producir etanol. Este método para seleccionar levaduras mediante evolución dirigida nos permite obtener unas interesantes levaduras, cuya adaptación ha sido impuesta manteniéndolas en condiciones selectivas durante varias generaciones. Esta investigación ha permitido la mejora de ciertas características en los últimos años. Esta estrategia, actualmente en fase de estudio en el INRA, es particularmente interesante ya que no introduce ningún tipo de modificación genética en las levaduras.

Otras técnicas, incluyendo la introducción o modificación de genes existentes, están siendo evaluadas por la Universidad de Stellenbosch, en Sudáfrica, en donde algunos investigadores están particularmente interesados en la posibilidad de producir ácido glucónico en lugar de alcohol. Por el momento, este estudio ha permitido una disminución del 1- 2% de alcohol en

volumen, lo que conduce a una excesiva concentración de ácido glucónico y por lo tanto a un incremento significativo de acidez total.

En Montpellier, el INRA está trabajando sobre otra ruta metabólica, que incluye la transformación del piruvato en ácido láctico. Sin embargo, una vez más, la relación entre la acumulación de ácido láctico y la ligera disminución de alcohol (¡una producción de 5 g de ácido láctico corresponde a una disminución de 0.2% por volumen de alcohol!) es desproporcionada.

Una de las estrategias más prometedoras consiste en la reducción del etanol incrementando el glicerol. En este caso, la levadura es estimulada a producir la enzima GPD1, que transforma el azúcar en glicerol e inhibe el proceso de acumulación de acetato y acetoina (Figura 3). Hasta la fecha, la investigación – llevada a cabo gracias a la colaboración entre Lallemand y el INRA, Montpellier – ha demostrado que es posible reducir la concentración de alcohol de un 15- 20% y el nivel de alcohol de 1.5- 2% en volumen, lo que representa la máxima diferencia alcanzada hasta la fecha (Michnick et al., 1997; Remize et al., 1999). La investigación puesta en marcha pretende estudiar el efecto de estas adaptaciones sobre los compuestos aromáticos y, en particular, sobre el metabolismo de la levadura.

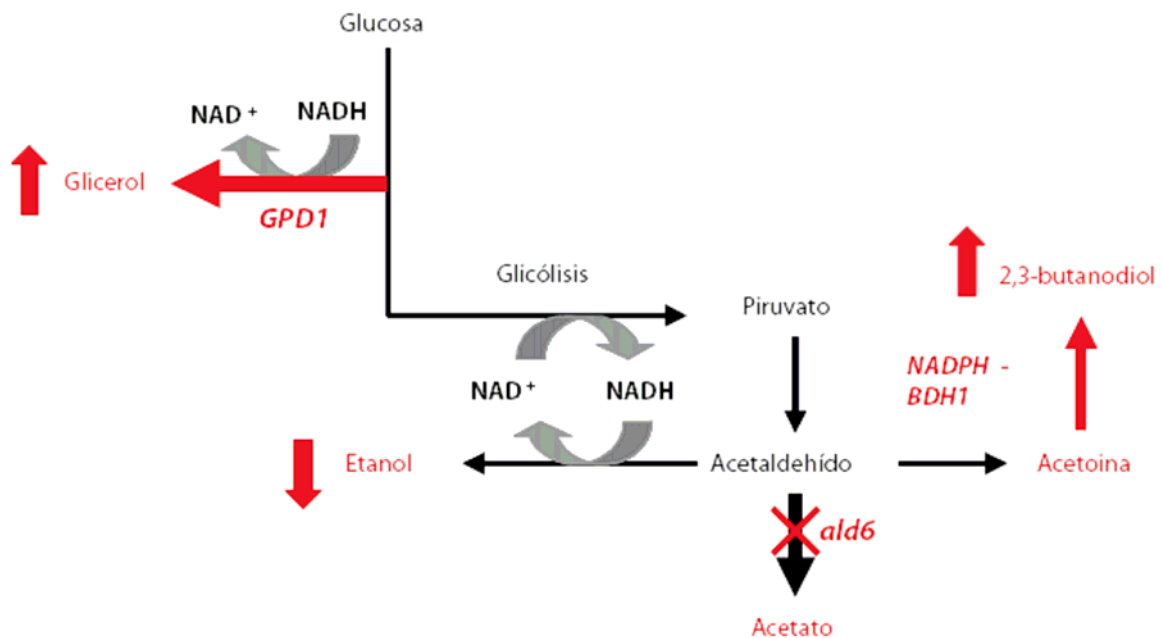


Figura 3: Estrategia para disminuir la producción de etanol basada en una desviación de los azúcares hacia la formación de glicerol y 2,3-butanodiol (Dequin, 2008).

Entre los enfoques procedentes de la genética “clásica”, las técnicas de mejora genética basadas en cruzamientos de esporas han dado lugar a la mejora de numerosas características ya existentes. Este enfoque ha sido utilizado para seleccionar híbridos que producen más glicerol (Eustace and Thornton, 1987; Prior et al., 1999; Prior et al., 2000), con unos resultados no demasiado satisfactorios debido a los niveles de superproducción alcanzados. Se han obtenido híbridos que producen de 12 a 15 g/L de glicerol en un medio sintético, pero que producen mucho menos en un mosto natural, alrededor de 9 g/L de glicerol, lo que no conduce a una reducción significativa de alcohol.

Otras levaduras no-*Saccharomyces* podrían también demostrar ser interesantes. La utilización de fermentadores mixtos también está siendo estudiada. Estudios comparativos efectuados por Souza Oliveira et al. (2004) enfrentando 24 cepas de *S. cerevisiae* con otras especies de levaduras (*Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*), mostraron que las levaduras no-*Saccharomyces* presentan un índice de transformación azúcar/etanol menor, aunque liberan más glicerol y ácidos orgánicos.

Dado el elevado número de parámetros a considerar, un enfoque que implique tanto la viticultura como la gestión de la FA sería más apropiado a la hora de facilitar la producción de vinos de calidad con menores niveles de alcohol.

EN RESUMEN

Varias razones explican el actual aumento de los niveles de alcohol del vino. Para satisfacer tanto la demanda de los consumidores de menores niveles de alcohol en los vinos como las necesidades de los enólogos de un control efectivo de las fermentaciones, están en marcha diversos estudios muy prometedores para transformar levaduras seleccionadas con el fin de obtener vinos con niveles de alcohol reducidos, lo cual significa incrementar la capacidad de las actuales levaduras vínicas de producir menos alcohol a partir de un nivel de azúcar equivalente.

Referencias

Dequin, S. 2008 Managing alcohol excess in wines: A new challenge for wine yeasts..
Proceedings from Entretiens Scientifiques Lallemand, Margaux 2007

Eustace, R., and R. J. Thornton. 1987. Selective hybridization of wine yeasts for higher yields of glycerol. *Canadian Journal of Microbiology*. 33:112-117.

Seguin, B. and J.-P. Gaudillère. 2008 Climate change and viticulture Proceedings from
Entretiens Scientifiques Lallemand, Margaux 2007

Michnick, S., J. L. Roustan, F. Remize, P. Barre, and S. Dequin. 1997. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*. 13:783-793.

Palacios García, A., F. Raginel, and A. Ortiz-Julien. 2007. Can the selection of *Saccharomyces cerevisiae* yeast lead to variations in the final alcohol degree of wines? *Australia and New Zealand Grapegrower and Winemaker*. 527:71-75.

Prior, B. A., C. Baccari, and R. K. Mortimer. 1999. Selective breeding of *Saccharomyces cerevisiae* to increase glycerol levels in wine. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. 35:57-65.

Prior, B. A., N. Jolly, T. H. Toh, C. Baccari, and R. K. Mortimer. 2000. Impact of yeast breeding for elevated glycerol production of fermentative activity and metabolite formation in Chardonnay wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 21:92-99.

Remize, F., J. L. Roustan, J. M. Sablayrolles, P. Barre, and S. Dequin. 1999. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Applied Environmental Microbiology*. 65:143-149.

Souza Oliveira, E., C. A. Rosa, M. A. Morgano, and G. E. Serra. 2004. Fermentation characteristics as criteria for selection of Cachaça yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20:19-24.