

SACCHAROMYCES cerevisiae

Contribución organoléptica en la vinificación

Guserbiot

Miren Zumárraga y Francisca Barbero
Departamento Enología, GUSERBIOT S.L.U.

El valor del vino se atribuye a su calidad sensorial, una propiedad extremadamente compleja determinada por cientos de compuestos diferentes que derivan principalmente de las uvas y de los microorganismos presentes durante el proceso de vinificación. Entre todos los microorganismos, las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1) son las protagonistas principales, influyendo significativamente en las características organolépticas del producto final. La cepa de levadura involucrada en la fermentación y su actividad metabólica específica contribuyen de manera importante en el aroma, sabor y color del vino.

El metabolismo de *S.cerevisiae* en la fermentación alcohólica

El mosto de uva se caracteriza por tener una elevada concentración de azúcares fermentables (entre 160 y 240 g/L), repartidos entre glucosa y fructosa en cantidades equivalentes. La fermentación alcohólica de las levaduras se inicia con la ruta conocida como glicolisis, que conduce a la obtención de dos moléculas de piruvato por cada molécula de azúcar metabolizada. Posteriormente el piruvato se descarboxila y conduce a la producción de etanol y CO₂.

Pero además través de diferentes rutas metabólicas se producen otros muchos productos y metabolitos secundarios que tienen una gran influencia en las cualidades sensoriales del vino (Figura 2).

A concentraciones iniciales iguales en el mosto, *S.cerevisiae* prefiere la glucosa. Es decir, consume la glucosa a mayor velocidad que la fructosa, lo cual explica que cuando las fermentaciones se paran, los azúcares residuales que quedan están constituidos principalmente por fructosa, que además es el doble de dulce que la glucosa. Esta preferencia se debe a que los transportadores celulares de estas hexosas presentan una mayor afinidad por la glucosa que por la fructosa. Sin embargo, existen variaciones en la capacidad de consumir fructosa y hoy en día encontramos levaduras "fructofílicas" que asimilan ambos azúcares prácticamente por igual y que pueden evitar problemas de final de fermentación.

El metabolismo de azúcares produce otros muchos subproductos derivados de rutas secundarias que usan intermediarios de la degradación de azúcares como por ejemplo glicerol,

acetaldehído, ácido acético (que contribuye a la acidez volátil), diacetilo, ácido succínico (y en menor medida los ácidos tartárico, málico y láctico), compuestos volátiles como monoterpenos o los ésteres que contribuyen a los aromas frutales y florales o compuestos no volátiles como los ácidos grasos y los alcoholes superiores que contribuyen al cuerpo y volumen del vino.

En cuanto al metabolismo del nitrógeno, durante el proceso de la fermentación alcohólica, *S. cerevisiae* incorpora el nitrógeno de compuestos simples, como el amonio, para la síntesis de compuestos estructurales tales, como los aminoácidos, (y en consecuencia péptidos y proteínas), ácidos nucleicos y vitaminas. Por otra parte, los aminoácidos representan la mayor fuente de nitrógeno asimilable en los mostos y su uso por las levaduras a través de la reacción de Ehrlich da lugar a la formación de alcoholes superiores. La síntesis de alcoholes superiores depende de la cepa de levadura y es función de las concentraciones de nitrógeno amínico y nitrógeno amoniacal. De hecho, la naturaleza y cantidad de nitrógeno asimilable por la levadura afecta directamente a la concentración y por lo tanto a la percepción aromática de alcoholes superiores (como el isoamil alcohol o el alcohol amílico) y ésteres (como el isoamil acetato o el 2-fenilatil acetato) que son producidos durante la fermentación alcohólica mediante la regulación de las diferentes rutas de síntesis. Es más, la producción excesiva de H₂S y los malos olores asociados, se deben a menudo a una inadecuada concentración de nitrógeno asimilable. Respecto al metabolismo de los sustratos azufrados, *S. cerevisiae* tiene un complejo mecanismo para

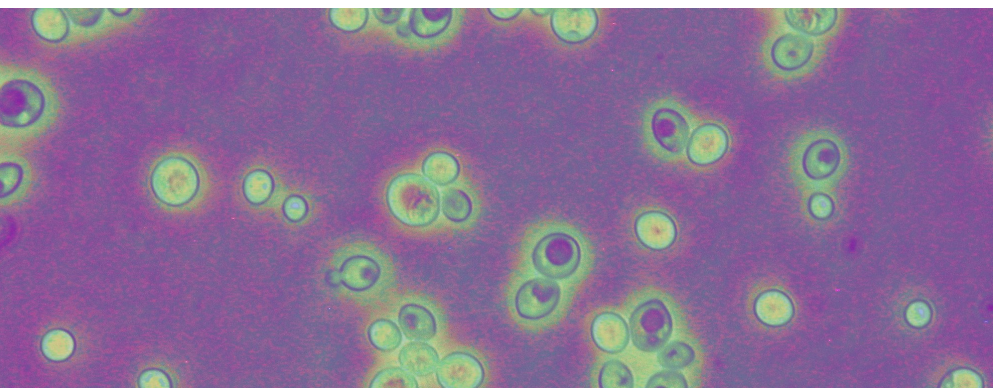


Figura 1 *Saccharomyces cerevisiae* al microscopio (x400)

metabolizar compuestos altamente volátiles como los sulfitos, sulfuros y tioles (mercaptanos) con impacto sensorial muy negativo en el vino y que se pueden percibir a concentraciones muy bajas. El principal compuesto volátil de azufre es el sulfuro de hidrógeno (H₂S) que se forma a partir de la reducción de sulfato en su asimilación (aroma a huevos podridos). Las levaduras sintetizan y excretan de manera natural pequeñas cantidades de sulfito. Sin embargo, los sulfatos usados para el tratamiento del mildiu en los viñedos o las adiciones de sulfato de cobre usados para atenuar los problemas de H₂S pueden metabolizarse a sulfito, que puede posteriormente reducirse a sulfuroso y manifestarse con los malos olores. Para evitar problemas es recomendable el uso de levaduras con bajo producción de H₂S y bajos requerimientos nutricionales, ya que la producción de H₂S está directamente relacionada con mostos deficientes en nitrógeno asimilable. La actividad metabólica de *S. cerevisiae* en las condiciones enológicas se traduce, por lo tanto, en la transformación no sólo del azúcar del mosto en etanol y CO₂, sino también en otros tantos compuestos que van a influir notablemente en la calidad organoléptica del vino. Todas estas rutas metabólicas, sus metabolitos y la concentración son los que diferencian unas cepas de levadura de otras.

S. cerevisiae y el aroma

Se han identificado cerca de 1000 compuestos volátiles en el vino que contribuyen a la compleja composición química del aroma del vino y de estos, al menos 400 son producidos por *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica. La naturaleza y concentración de estos productos secundarios viene determinada por las cepas de levaduras que participan, por sus características fisiológicas y genéticas. La mayor parte de los compuestos formados que contribuyen al aroma del vino son: ácidos, alcoholes, aldehidos, ésteres y compuestos azufrados (Tabla I). Estos compuestos aparecen principalmente como productos secundarios durante la fermentación glicéropirúvica, particularmente los alcoholes, ésteres y ácidos volátiles, lo que confiere a las levaduras un papel importante en el aroma del vino. Los alcoholes y ésteres son los más importantes desde el punto de vista cuantitativo, pero su impacto en el aroma no es el mismo.

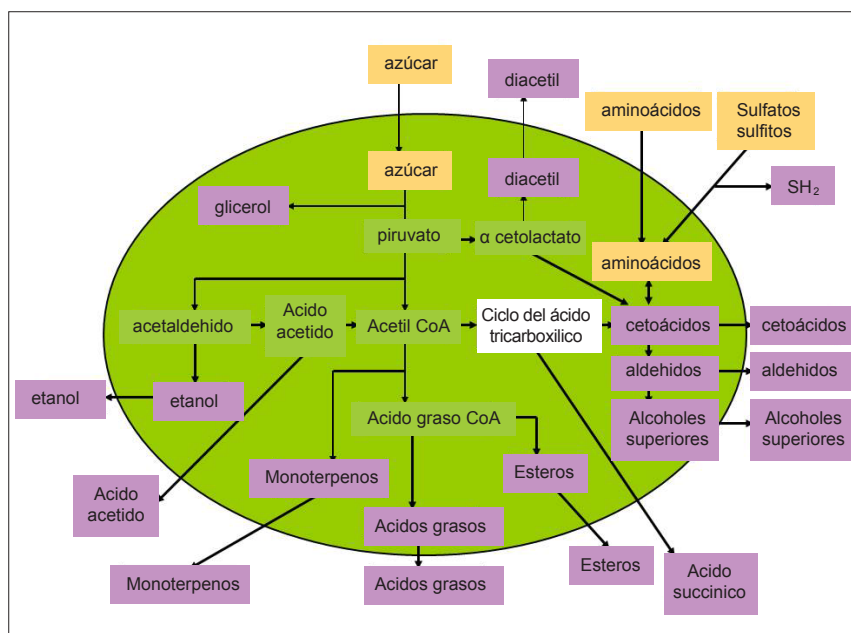


Figura 2. Síntesis de compuestos aromáticos a partir del metabolismo de *S. cerevisiae* (adaptado a partir de Pretorius 2000).

Tipo de Compuesto	Compuesto (a)	Descriptor (b)
Alcoholes	etanol propanol butanol 2-metilpropanol 2-metilbutanol 3-metilbutanol hexanol feniletanol	alcohol disolvente, pungente alcohol, disolvente disolvente, pungente disolvente, pungente disolvente, pungente hierba cortada floral, rosas
Ácidos	acético propanoico butírico 2-metilpropanoico 2-metilbutanoico 3-metilbutanoico hexanoico octanoico decanoico	pungente avinagrado queso, rancio queso, rancio queso, sudor, pungente queso fuerte queso, sudor rancio grasa rancia
Esteres etílicos	butirato de etilo hidroxybutirato de etilo hexanoato de etilo octanoato de etilo decanoato de etilo propanoato de etilo 2-metilpropanoato de etilo 2-metilbutirato de etilo 3-metilbutirato de etilo	floral malvavisco quemado manzana verde jabón jabón afutado afutado, piña afutado frutas del bosque
Acetatos	acetato de etilo acetato de hexilo 2-metilpropilacetato 2-metilbutilacetato 3-metilbutilacetato fenilacetato	afutado, avinagrado, disolvente perfume afutado, plátano afutado, plátano plátano floral, rosas
Aldehidos	acetaldehído diacetilo acetoina	manzana oxidada, jerez mantequilla, rancio mantequilla
Compuestos azufrados volátiles	sulfhídrico metanotiol etanotiol dimetilsulfuro	huevos podridos col cocida cebolla, caucho col, maíz cocido

Tabla I. Compuestos aromáticos producidos por *Saccharomyces cerevisiae*. (a) Tomado de Ferreira 2010; (b) Descriptores de Bartowsky & Pretorius 2009, Ferreira 2010.

Los alcoholes son compuestos que individualmente no presentan olor marcado pero cuando están diluidos refuerzan el aroma. El etanol, el glicerol y los alcoholes superiores son los alcoholes comunes en el vino, resultantes de la actividad biológica de *S.cerevisiae*. El etanol equilibra la acidez del vino, desempeñando así un papel importante en la percepción del gusto, y también “buffer” de la detección de otros compuestos aromáticos. En el caso de los alcoholes superiores, la mayor parte de estos compuestos derivan de los aminoácidos asimilados durante la fermentación alcohólica, distinguiéndose tres tipos: alcoholes alifáticos superiores (1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol), alcoholes azufrados (metionol) y alcoholes aromáticos (2-feniletanol).

Los ácidos grasos y sus ésteres son junto con los alcoholes superiores, los principales responsables de los aromas fermentativos o secundarios. Los ésteres contribuyen a los aromas frutales y florales del vino y se forman por la reacción de condensación entre un alcohol y un grupo acilo que integra la coenzima A. Hay dos clases principales de éster producido por *Saccharomyces*: los ésteres de etilo que contienen etanol como grupo alcohol y los ésteres de acetato que contienen acetato como grupo acilo (Figura 3).

Los ésteres más significativos son el acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, caproato y caprilato de etilo y acetato de 2-feniletilo. Aunque se producen en pequeñas cantidades son los compuestos que determinan en mayor intensidad el aroma secundario del vino (Lilly 2000).

Otros compuestos con gran impacto aromático y sobre los que la actividad biológica de las levaduras tiene incidencia son los terpenos. Los monoterpenos, principalmente linalool, geraniol, nerol y α -terpineol, son compuestos presentes en la uva en forma no-volátil o glucosídica, ligados a moléculas de glucosa y otros monosacáridos. Durante la fermentación la enzima β -glucosidasa de la levadura hidroliza estos glucósidos terpénicos liberando monoterpenos con aromas florales y frutales (Figura 4). Por otra parte, además de la producción de compuestos que aportan al vino de un aroma y atributos

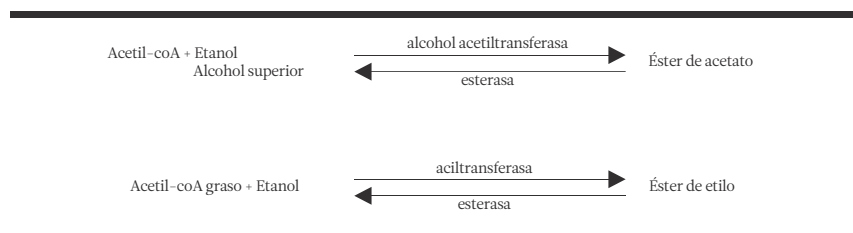


Figura 3. Síntesis de ésteres en *Saccharomyces cerevisiae*.

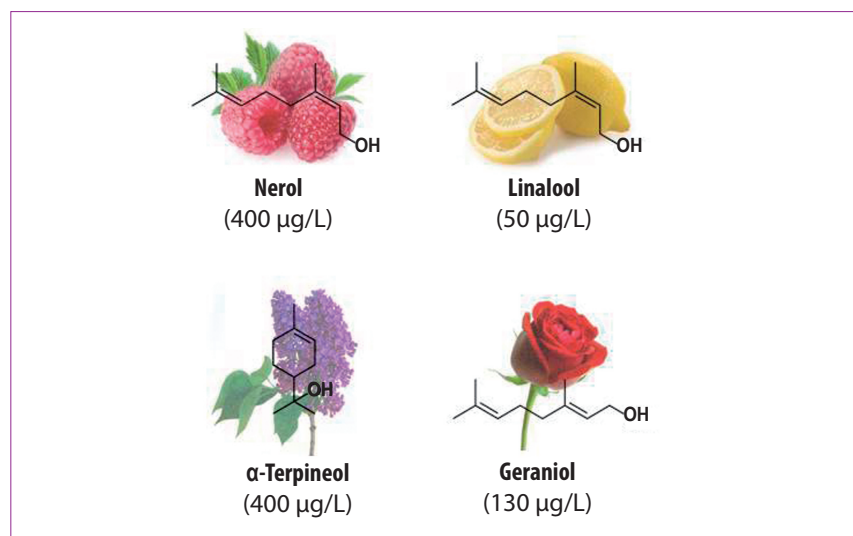


Figura 4. Estructura química, aroma y umbral de percepción de los principales monoterpenos encontrados en la uva e hidrolizados por la enzima β -glucosidasa para formar parte de la fracción aromática del vino.

positivos, la actividad metabólica de las levaduras también puede resultar en desviaciones y defectos olfativos en el aroma del vino. Entre estos compuestos se encuentran principalmente el ácido acético, los compuestos aldehídicos y los azufrados.

Con respecto a los ácidos, el ácido acético, es responsable de la acidez volátil del vino y constituye un índice negativo en la apreciación de cualquier vino, por la acritud y acescencia que transmite (Suarez-Lepe. 2004). Su producción varía sensiblemente con las cepas de levadura que llevan a cabo la fermentación (entre 0,15–1 g/L). Entre los compuestos aldehídicos producidos por *Saccharomyces*, destaca el acetaldehído, el cual se forma durante la fermentación alcohólica por descarboxilación del piruvato. El acetaldehído, con concentraciones entre 10 y 300 mg/L, aporta aromas descriptores como manzana, cítricos, nueces y en algunos casos es señal de oxidación. Los compuestos azufrados suelen producirse en cantidades muy bajas, pero tienen umbrales de detección también bajos y generalmente confieren características sensoriales negativas (col, huevo podrido, sulfuroso, ajo, cebolla, goma), aunque

algunos también pueden aportar aromas positivos (fresa, maracuyá, pomelo). Los compuestos más comunes son sulfuros, tioles y tioésteres (Swiegers y cols. 2005).

S. cerevisiae y el color del vino

La interacción de las levaduras en el color del vino puede desarrollarse bajo tres mecanismos y en todos los casos, el resultado va a depender de la cepa utilizada para el proceso fermentativo.

(i) Absorción de compuestos fenólicos. La pared celular de la levadura es capaz de absorber antocianinas y otros componentes del color, que son eliminados junto con las lías. De este modo, las levaduras que absorben menos componentes polifenólicos eliminan una menor cantidad de color del vino, y por lo tanto, producen vinos con más color.

(ii) Secreción de polisacáridos de la pared. La interacción de los polisacáridos (principalmente glucanos y manoproteínas) liberados por la pared celular de las levaduras y los componentes polifenólicos del vino, favorece entre otros la estabilidad del color y reduce la astringencia.

Tanto la producción como la liberación de manoproteínas depende de la cepa de levadura (Feuillat 2006).

(iii) Extracción de compuestos fenólicos. Para acentuar el color del vino *S. cerevisiae* posee pectinasas (poligalacturonidasas) que pueden catalizar la hidrólisis de las pectinas de la piel lo cual favorece la extracción de los antocianos. Estas enzimas se activan durante la primera fase de la fermentación alcohólica. Por otra parte, también existen las actividades enzimáticas del tipo glicosidasas de las levaduras que conducen a una disminución de la forma glicosilada de los antocianos y como consecuencia a una precipitación del color, ya que la forma no glicosilada de los antocianos es más inestable. La actividad β -glucosidasas de ciertas cepas de *S. cerevisiae*, la cual tiene un efecto positivo en el aroma del vino liberando la aglicona volátil de los glicósidos terpénicos, podría tener un efecto negativo en el color del vino ya que la antocianidina, resultante de la ruptura de la unión glucosídica de los antocianidin-3-glucósidos es una forma menos estable y podría degradarse fácilmente durante el envejecimiento del vino.

Además varios metabolitos secundarios producidos durante la fermentación alcohólica, como el ácido pirúvico y el acetaldehído pueden reaccionar con compuestos fenólicos favoreciendo la estabilización de los pigmentos durante la fase de envejecimiento del vino. La cepa de levadura utilizada en la fermentación no solo afecta a la complejidad aromática del producto final, también afecta a las características de color del mismo. Es evidente que las diferentes levaduras tienen influencia sobre el color y el contenido fenólico del vino elaborado a partir del mismo mosto y bajo las mismas condiciones operativas. Además, la simple comparación del color de las lías de diferentes cepas de levaduras después la fermentación del mismo mosto, demuestra que existen efectivamente diferentes capacidades de absorción de una cepa a otra.

Autólisis de levaduras

Otro aspecto muy importante de las levaduras es la autólisis, la ruptura y degradación de las estructuras celulares tras la muerte de las levaduras una vez terminada la fermentación. Se trata de una reacción bioquímica auto-destructiva de las células muertas o lías.

Una vez que las células de levadura han completado su ciclo metabólico, han agotado los nutrientes y mueren, las células muertas forman un sedimento en el fondo del depósito. Posteriormente las propias enzimas de la levadura rompen las células y liberan al vino moléculas de distinta naturaleza (manoproteínas, polisacáridos, aminoácidos, nucleósidos, ésteres y otros compuestos volátiles etc.) que afectan a su equilibrio coloidal, estructura, estabilidad de color y perfil aromático, con importantes repercusiones organolépticas. Por ello, las levaduras con una mayor capacidad de autólisis son de gran interés para el envejecimiento de vinos mediante la técnica de crianza sobre lías.

Perspectivas futuras

Dada la importancia que el metabolismo de la levadura *S. cerevisiae* ejerce en la calidad final del vino, en los últimos años se han investigado y desarrollado distintos tipos de estrategias encaminadas a la búsqueda y mejora de diferentes propiedades enológicas de las levaduras. Los avances en las distintas áreas como la biotecnología han permitido el aislamiento, selección, caracterización y finalmente la comercialización de una amplia variedad de levaduras con diferentes características: cepas que producen una mayor cantidad de glicerol, cepas que no producen H₂S, cepas resistentes a condiciones de fermentación extremas o poco favorables, cepas que favorecen la extracción de determinados aromas, cepas que absorben poco el color, cepas con una elevada liberación de manoproteínas, etc. Las herramientas y metodologías utilizadas para la selección de levaduras abarcan metodologías que pueden consistir desde la simple selección mediante el aislamiento a partir de la diversidad genética natural presente en la uva o mosto, hasta la mejora genética de cepas enológicas ya existentes con el fin de obtener nuevas cepas con propiedades mejoradas. Dentro de estas últimas podemos diferenciar (i) las técnicas de mejora genética clásica como la mutagénesis al azar y la hibridación sexual y (ii) las técnicas de ingeniería genética y la fusión de protoplastos. Las primeras presentan la ventaja de ser ampliamente aceptadas en el entorno social y enológico y de no estar sometidas a restricciones de uso y comercialización como lo están los organismos genéticamente modificados (OGM) obtenidos mediante las técnicas de ingeniería genética. En Europa actualmente no

está autorizada la utilización de levaduras OGM para la elaboración del vino, mientras que en EEUU, Canadá y Sudáfrica sí se permite.

Conclusiones

La transformación del mosto en vino es resultado de la interacción y actividad biológica de varios géneros y especies de levadura, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la levadura con mayor influencia en dicha transformación. El aroma, el color y la propia textura del vino están condicionados por las cepas de levaduras, las cuales, pueden contribuir positiva o negativamente en función de su actividad metabólica, determinada intrínsecamente por sus características genéticas. Por lo tanto, el conocimiento de las capacidades metabólicas de las diferentes cepas de levaduras *S. cerevisiae* se hace necesario a la hora del diseño del proceso de vinificación así como de la definición de los perfiles organolépticos a alcanzar en el vino. La biotecnología facilita la selección y el desarrollo de levaduras, con mejores propiedades metabólicas, lo que ha permitido optimizar tanto los procesos de elaboración como la calidad organoléptica del vino. Sin embargo, aunque se han logrado obtener muy buenos resultados, todavía quedan aspectos en los que mejorar e innovar, entre ellos conseguir un mejor rendimiento alcohólico, por lo que será necesario seguir apostando por la biotecnología como herramienta de futuro.

Bibliografía

- Bartowsky, E.J. y I.S. Pretorius. (2009). Microbial formation and modification of flavour and off-flavour compounds in wine. In: H. König, G. Uden & J. Frölich (eds.), *Biology of Microorganisms on grapes, in must and wine*. Springer, Heidelberg, Alemania. Capítulo 11, pp. 209-231
- Ferreira V. (2010) Volatile aroma compounds and wine sensory attributes. *Managing wine quality*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition pp.3-28
- Feuillat M (2006) Oenological impact of manno-proteins and peptides from yeast: examples of interaction with wine polyphenols. New trends in the use of specialty inactivated yeast during winemaking. XVIIIes entretiens scientifiques lallemand, Sudáfrica.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G. y Pretorius, I.S. (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental microbiology* 66(2):744-753
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Suárez Lepe, J.A. y Íñigo Leal, B. (2004) *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación*. Ed. Mundi-Prensa, 3ª ed.
- Swiegers, J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A. y Pretorius, I.S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 139-173.