

DESARROLLO DE UNA NUEVA LEVADURA ENOLÓGICA QUE COMBINA UNA BAJA PRODUCCIÓN DE SO₂, H₂S Y ACETALDEHÍDO CON UNA ALTA CAPACIDAD FERMENTATIVA UTILIZANDO UNA NUEVA HERRAMIENTA DE SELECCIÓN

**Jessica BERLESE-NOBLE¹, Céline RAYNAL¹, Anthony SILVANO¹, Jose Maria HERAS¹
Daniel GRANES², Caroline BONNEFOND², Anne ORTIZ-JULIEN¹ y Bruno BLONDIN³**

1 Lallemand SAS, 19, rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, Francia

2 Institut Coopératif du Vin, La Jasse de Maurin, 34970 Lattes, Francia

3 Montpellier SupAgro, 2, Place Viala, 34060 Montpellier, Francia

Resumen

Los sulfitos son ampliamente utilizados en enología. Sin embargo, existe una tendencia a reducir su uso y controlar sus niveles en el vino final. Aparte de su adición en mostos y vinos, las levaduras enológicas pueden también producirlos en cantidades variables durante la fermentación alcohólica, lo que puede provocar un retraso en el inicio de la fermentación maloláctica si esta es buscada y una falta de control sobre su concentración final. Además, los sulfitos son precursores para la síntesis de sulfuros, subproductos para nada deseables. A pesar de que las levaduras enológicas muestran una gran diferencia en su capacidad de producir estos compuestos azufrados, se desconoce la base molecular de tales diferencias.

Realizamos un estudio genético para determinar la base molecular de estas propiedades. Mediante un método genético cuantitativo, se descubrieron dos locus que afectan la producción de SO₂ y H₂S. La disección de rasgos de un carácter cuantitativo (QTLs según su abreviación en inglés) llevó a la identificación de dos alelos de los genes *MET2* y *SKP2* responsables de las diferencias de producción de compuestos azufrados entre dos cepas de levadura enológica. Una validación funcional demostró su implicación y subrayó el poder y el alcance de su control sobre los fenotipos, así como sobre la producción de SO₂ y H₂S. La transferencia de estos alelos mediante hibridación ofrece grandes posibilidades para optimizar levaduras enológicas y ya ha sido seleccionada una nueva levadura enológica utilizando esta técnica.

1. Introducción

La demanda de nuevas levaduras enológicas optimizadas para diferentes propiedades tecnológicas particulares, ha aumentado en los últimos años. El conocimiento cada vez mayor y el desarrollo de nuevas tecnologías ofrecen otras posibilidades para la selección de nuevas levaduras enológicas. Se pueden implementar técnicas como la selección clonal, la ingeniería genética y la selección evolutiva, sin embargo, la hibridación es la que se emplea con más frecuencia para tales mejoras. Además, la hibridación no requiere la intervención de la manipulación genética, y resulta en levaduras naturales, no modificadas genéticamente (no MG). No obstante, este método necesita un conocimiento de la base molecular de las propiedades consideradas de interés. La técnica del mapeo de rasgos cuantitativos de interés (QTL) se amplió recientemente para estas aplicaciones. Este método consiste, por ejemplo, en identificar un vínculo entre una o varias regiones del genoma y una variación fenotípica en un microorganismo. Una vez identificada esta región, se puede entonces dirigir su transferencia de una cepa de levadura a otra para combinar varias propiedades de interés. En este estudio, hemos intentado identificar la región del genoma responsable de numerosas características enológicas, particularmente la producción de sulfitos. Aunque los sulfitos son ampliamente utilizados en enología por sus numerosas propiedades tecnológicas (p. ej., sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antioxidásicas), hay una tendencia actualmente a reducir su uso y control en vino final.

Altas concentraciones de sulfitos en los vinos pueden tener un impacto sensorial negativo, provocar un retraso del inicio de la fermentación maloláctica (FML) y pueden ser responsables de problemas de salud. Es también muy probable que las levaduras enológicas produzcan cantidades importantes de sulfitos durante la fermentación alcohólica (FA). Las levaduras enológicas pueden producir desde pequeñas cantidades de sulfitos hasta más de 90 mg/L, dependiendo de las condiciones de fermentación y de la cepa de levadura. El dióxido de azufre es un metabolito intermediario en la ruta de asimilación de sulfatos, que lleva a la síntesis de aminoácidos azufrados. En ciertas condiciones, se puede sintetizar en exceso y luego excretarse en el medio. Además, los sulfitos son precursores para la síntesis de sulfuros, subproductos para nada deseables. A pesar de que la ruta de asimilación de sulfatos ha sido ampliamente estudiada, poco se sabe de los parámetros que influyen en la producción de sulfitos y todavía no se ha identificado la base molecular responsable de las diferencias entre las cepas de levadura.

El acetaldehído es uno de los compuestos que puede combinarse con el SO_2 más importantes, y su concentración en los vinos es habitualmente muy elevada. El acetaldehído representa típicamente el 75 % del SO_2 combinado en los vinos blancos y el 50 % en los vinos tintos. Su reactividad y su capacidad de combinación con los sulfitos explican en gran medida por qué los vinos necesitan distintas cantidades de SO_2 y por qué una buena gestión del dióxido de azufre es importante en bodega para asegurar la estabilidad después del embotellado. La capacidad de controlar la producción de acetaldehído por parte de la levadura es, por ende, un parámetro importante que debe tenerse en cuenta para el contenido de sulfitos en los vinos.

El objetivo de este estudio era la selección y desarrollo de nuevas levaduras enológicas combinando varios fenotipos de interés, como los de baja producción de $\text{SO}_2/\text{H}_2\text{S}$ /acetaldehído y alta capacidad fermentativa. El enfoque original fue el uso de nuevas herramientas genéticas, para conseguir levaduras no MG.

2. Estrategia para la optimización de levadura: Hibridación asistida por marcadores moleculares.

Se seleccionaron dos levaduras enológicas con propiedades complementarias que resultan de interés para este estudio. La cepa JN10 es muy robusta, capaz de completar la fermentación bajo condiciones muy difíciles, como temperaturas altas/bajas y mostos muy clarificados, mientras que la cepa JN17 tiene bajas necesidades en nitrógeno, presenta un perfil equilibrado de compuestos volátiles y produce bajas cantidades de SO_2 , acetaldehído y H_2S .

La identificación de QTL se llevó a cabo para encontrar las regiones del genoma de la cepa de levadura JN17 vinculadas a los fenotipos de interés: bajo SO_2 y bajo H_2S . A través de una combinación de conjuntos de datos fenotípicos y genotípicos, hemos logrado ubicar una región del cromosoma XIV que está vinculada a la producción de sulfitos. En esta región, hemos descubierto dos genes de la ruta metabólica del azufre, *MET2* y *SKP2*.

Una vez que se detectaron los marcadores moleculares vinculados a las propiedades que nos interesan, es posible transferirlos de una cepa a otra mediante hibridación dirigida.

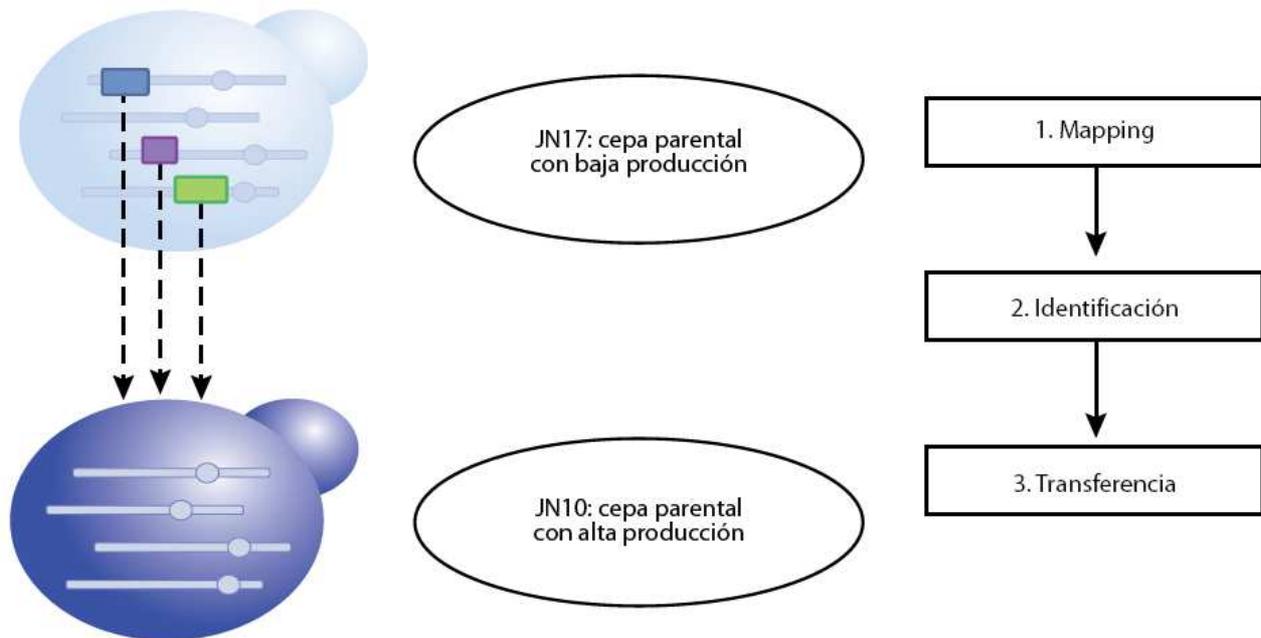


Figura 1. Estrategia general de hibridación dirigida asistida por marcadores de regiones de rasgos cuantitativos

En nuestro estudio, pudimos transferir la propiedad de bajo $\text{SO}_2/\text{H}_2\text{S}$ de la cepa de levadura JN17 a la JN10 conservando todas las buenas propiedades de la última. En paralelo, logramos transferir otros dos fenotipos de la cepa parental JN17 (baja producción de acetaldehído y bajas necesidades en nitrógeno).

Intentábamos alcanzar dos objetivos principales:

- Transferir los fenotipos de interés de la cepa de levadura JN17 a la JN10 controlando la presencia de Los marcadores moleculares en cada etapa de hibridación;
- Mantener la mayor parte de los antecedentes genéticos de la cepa de levadura JN10 mediante el cruzamiento de cada híbrido haploide generado con la cepa parental JN10.

La figura 2 ilustra el desarrollo de la nueva cepa de levadura mediante esta estrategia de ciclos de cruzamiento. Después de cuatro ciclos de hibridación, se restituyó más de 93 % del genoma de la cepa de levadura JN10 y validamos la transferencia de todos los fenotipos seleccionados que procedían de la cepa de levadura JN17: bajo SO_2 , bajo H_2S , baja producción de acetaldehído y bajas necesidades en nitrógeno. A partir del híbrido de cuarta generación, se inició una nueva etapa de selección para obtener la mejor cepa, combinando las propiedades de este híbrido y buscando propiedades enológicas como una buena capacidad fermentativa, la resistencia a temperaturas extremas, características sensoriales interesantes, etc.

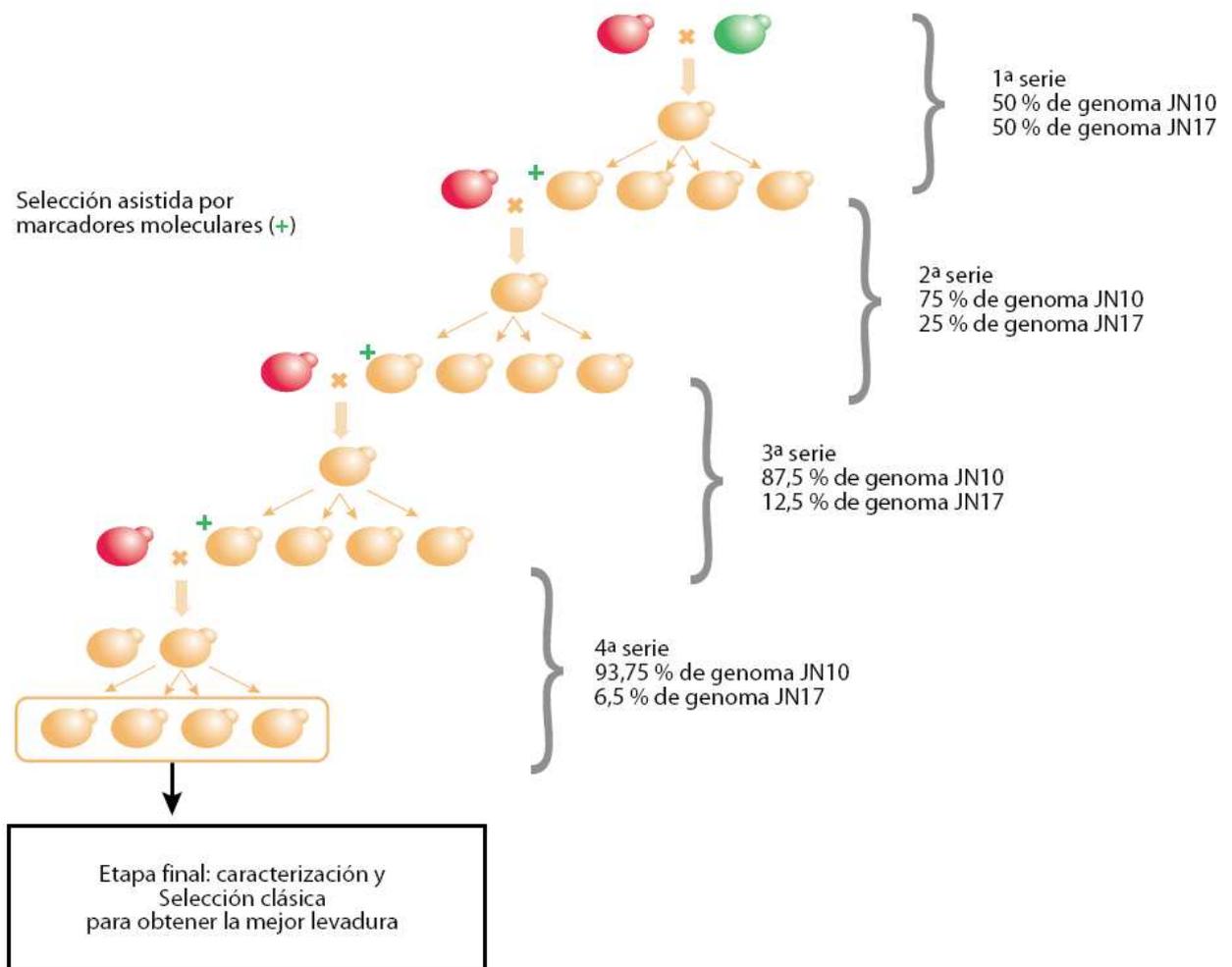


Figura 2. Selección de una nueva cepa de levadura por ciclos de recruzamiento

3. Caracterización en laboratorio para seleccionar la cepa de levadura final combinando propiedades positivas de ambas cepas parentales

Todas las cepas derivadas del cuarto ciclo de recruzamiento fueron cuidadosamente caracterizadas a escala de laboratorio en diferentes condiciones enológicas. El objetivo era validar que las propiedades positivas de la cepa de levadura JN10 permanecieran y, también, que las levaduras generadas mostraran una mejora en los fenotipos de interés. Se seleccionó una levadura (Lalvin ICV oKay®) que fue retenida para las etapas de caracterización final.

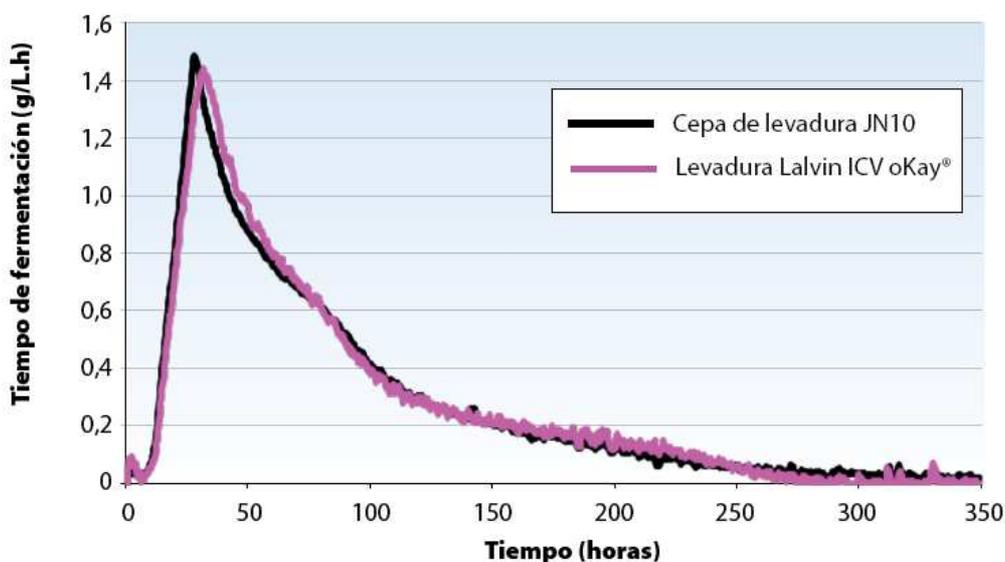


Figura 3. Cinéticas de fermentación en pruebas realizadas a escala laboratorio en un mosto de Chardonnay fermentado a 20°C en condiciones isotérmicas.

Las cinéticas y el análisis final del vino confirman que la levadura obtenida por hibridación mantuvo los rasgos positivos de una de las cepas parentales (JN10), incluyendo una actividad fermentativa fuerte y fiable, sin problemas de aromas desagradables o de acidez volátil.

Cuadro 1. Parámetros enológicos clásicos medidos al final de la fermentación alcohólica (escala laboratorio)

	Grado alcohólico % vol	Azúcar residual (g/L)	Acidez volátil H ₂ SO ₄ g/L	Acidez total H ₂ SO ₄ g/L
Ceba de levadura JN10	12,94	1,8	0,16	4,32
Levadura Lalvin ICV oKay®	13,01	0,7	0,19	4,40

También confirmamos las bajas concentraciones de SO₂, H₂S y acetaldehído en los vinos fermentados con la levadura Lalvin ICV oKay®, validando la fiabilidad de la estrategia (figura 4).

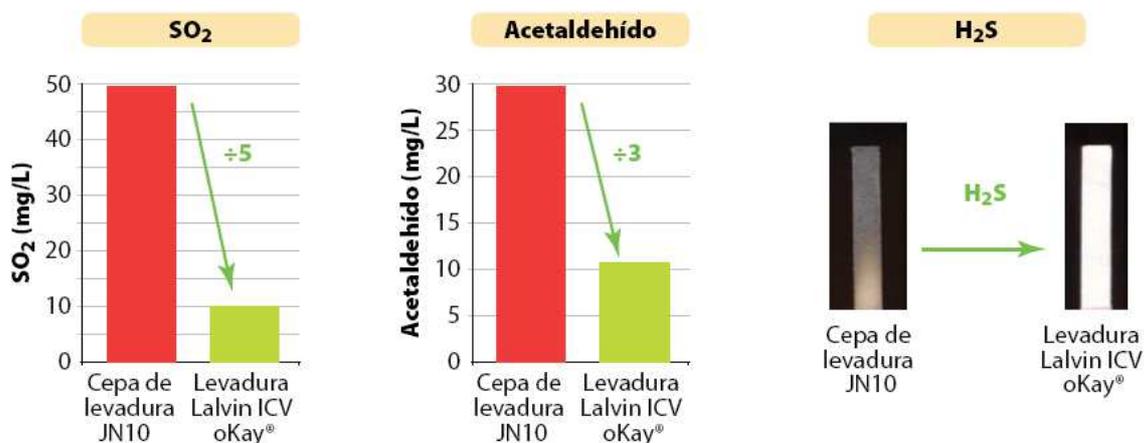


Figura 4. Validación de la transferencia de fenotipos de interés procedentes de la cepa de levadura JN17 (escala de laboratorio)

4. Pruebas a escala piloto con la levadura Lalvin ICV oKay®

Se realizaron las pruebas en la Unidad experimental (INRA) de Pech Rouge, Francia. El propósito era comparar la levadura Lalvin ICV oKay® con una levadura de referencia. Las fermentaciones se realizaron con mostos de tres diferentes variedades de uvas: Merlot, Syrah rosado y Macabeo. El mosto de Merlot fue obtenido por la técnica *flash détente*. El mosto de Syrah rosado y el Macabeo fueron prensados y trasegados tras un desfangado estático a baja temperatura. Las levaduras fueron rehidratadas con Go-Ferm Protect® e inoculadas en una concentración de 25 g/hL. Cuando fue necesario, se agregaron nutrientes en forma orgánica y compleja al primer tercio de la FA. El Merlot fermentó a temperaturas de entre 22°C y 25°C. El Syrah rosado y el Macabeo se fermentaron a 18°C. La FML se llevó a cabo con la bacteria seleccionada Lalvin VP41® en dosis de 1 g/hL.

Se monitorizaron las cinéticas de fermentación, así como la producción de SO₂, H₂S y acetaldehído.

Cuadro 2. Análisis del mosto en tres variedades diferentes después del sulfitado del mosto.

	Merlot	Syrah rosado	Macabeo
Azúcar (g/L)	254	190	211
Acidez total (H ₂ SO ₄ g/L)	2,85	4,15	2,6
NFA (nitrógeno fácilmente asimilable) (mg/L)	84	150	200
SO ₂ libre inicial (mg/L)	23	4	28
SO ₂ total inicial (mg/L)	45	15	55
Turbidez (NTU)	110	60	60

4.1 SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN

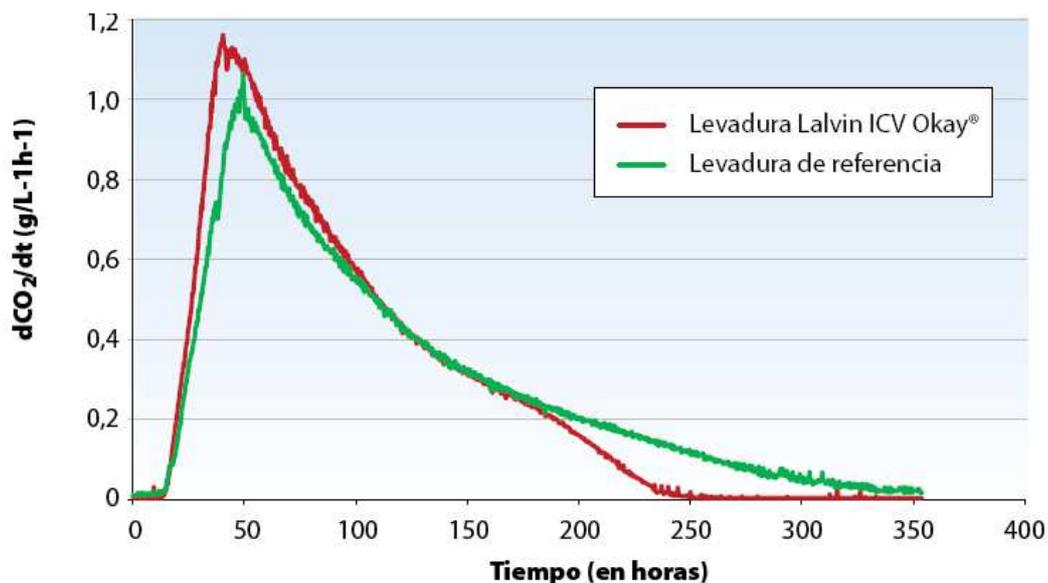


Figura 5. Ejemplo de cinéticas de fermentación en mosto Macabeo, comparando la levadura Lalvin ICV oKay® con la levadura de referencia

Como se observa en la figura 6, en cada caso, se obtuvo un mejor resultado con la nueva levadura (Lalvin ICV oKay®) con respecto a la levadura de referencia. La fase de latencia fue también más corta, mostrando una buena vitalidad y actividad fermentativa hasta bien avanzada la fermentación, evitando todo riesgo de una fermentación lenta o parada.

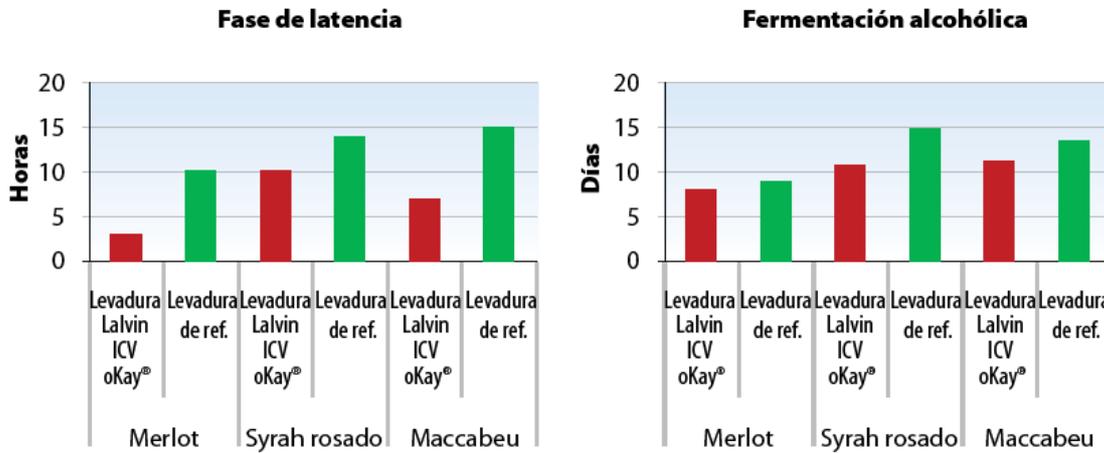


Figura 6. Parámetros de fermentación en pruebas piloto comparando la levadura Lalvin ICV oKay® con la levadura de Referencia

Durante la FA, medimos el SO₂ en los vinos y validamos la no producción de SO₂ con la levadura Lalvin ICV oKay® comparando con la levadura de referencia (figura 7).

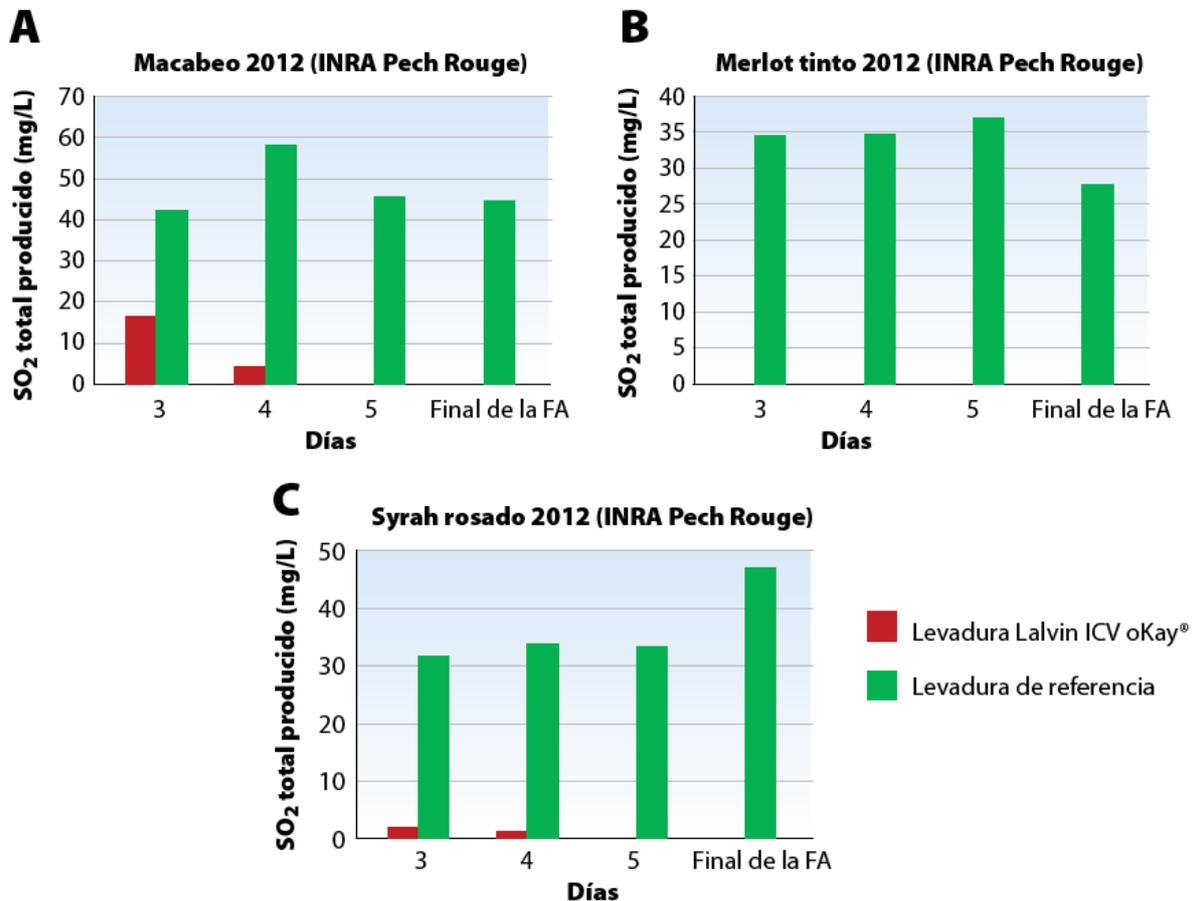


Figura 7. Producción total de SO₂ durante la fermentación alcohólica en tres vinos comparando la levadura Lalvin ICV oKay® con la levadura de referencia

5. Caracterización sensorial

Se llevaron a cabo cuatro diferentes pruebas comparativas en la bodega experimental del Instituto Cooperativo del Vino (ICV, Institut Coopératif du Vin), Francia, para obtener información sobre el perfil sensorial proporcionado por distintas variedades de uvas y con diferentes estrategias de vinificación:

- Un mosto de Merlot tinto a partir del tratamiento de *flash détente seguido del prensado* y de la clarificación con filtración del mosto por vacío;
- Un mosto de Syrah rosado de prensado directo con enzimas pectolíticas y desfangado en frío durante 20 horas;
- Un mosto de Garnacha rosado de maceración pelicular de 4 horas seguido de prensado con enzimas pectolíticas y desfangado en frío durante 20 horas;
- Un mosto de Chardonnay de prensado directo con enzimas pectolíticas y desfangado en frío durante 20 horas.

Se compararon diferentes levaduras de la gama del ICV bajo las mismas condiciones de FA. Las levaduras fueron rehidratadas con Go-Ferm Protect® e inoculadas en una concentración de 30 g/hL. Se agregaron nutrientes, cuando fue necesario, en forma de nutrientes orgánicos y complejos al primer tercio de la FA. El Merlot fue fermentado en temperaturas entre 18°C y 22°C. La FML fue llevada a cabo con Lalvin Elios 1® a 1 g/hL, inoculada después de dos trasiegos siguiendo el final de la FA. Los dos rosados y el Chardonnay fueron fermentados a 18°C.

Se realizó un seguimiento de las cinéticas. Las caracterizaciones sensoriales se llevaron a cabo con un análisis sensorial descriptivo cuantitativo del método del ICV (Granès et al. 2010) y se realizó un análisis de los compuestos azufrados indeseables o negativos (p. ej., H₂S, metanotiol y etil mercaptano) en los vinos dos meses después del embotellado.

Cuadro 3. Análisis del mosto justo antes de la inoculación de la levadura

	Chardonnay	Merlot	Syrah rosado	Garnacha rosado
Azúcar g/L	247,1	233,7	248,9	221,3
Grado potencial %	14,56	13,89	14,67	13,03
Acidez total (H₂SO₄ g/L)	3,83	4,28	2,88	2,96
Acidez volátil (H₂SO₄ g/L)	0,07	0,07	0,08	0,08
SO₂ libre (mg/L)	< 10	< 10	< 10	< 10
SO₂ total (mg/L)	< 15	< 15	< 15	< 15
pH	3,45	3,71	3,50	3,45
Ácido málico (g/L)	2,77	1,48	2,8	1,28
Ácido láctico (g/L)	< 0,1	< 0,1	0	-0,05
Ácido tartárico (g/L)	4,79	3,75	2,63	5,09
DO280	-	94	-	-
Potasio (g/L)	1,9	2,5	1,13	1,36
Nitrógeno asimilable (NFA) (mg/L)	250	200	224	160
Turbidez (NTU)	60	< 50	67	62

5.1. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

En el Merlot de termovinificación, el análisis de la concentración de ácido málico después de la inoculación con Lalvin Elios 1® se realizó tres veces por semana y muestra (figura 8) que la interacción con la levadura Lalvin ICV oKay® fue la más eficaz.

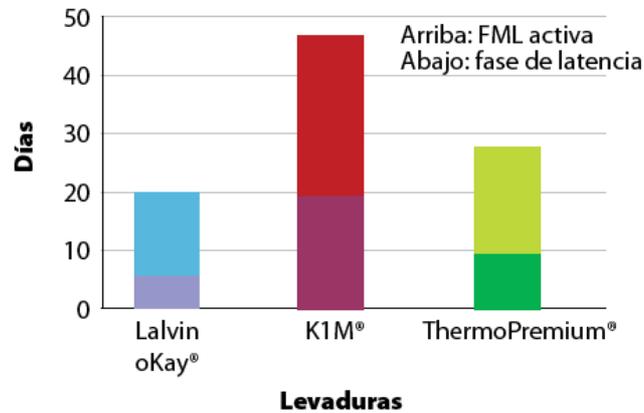


Figura 8. Tiempo de fermentación maloláctica de un Merlot de termovinificación

5.2 PERFILES SENSORIALES

Todas las pruebas comparativas mostraron una tendencia de Lalvin ICV oKay® a:

- Producir menos aromas azufrados indeseables;
- Mostrar una mayor complejidad aromática con una mezcla de sensaciones amílicas y afrutadas;
- Mantener un equilibrio positivo entre el volumen en boca y la acidez;
- Reducir el amargor.

Las figuras 9 y 10 ilustran los resultados de las pruebas en los perfiles sensoriales de las uvas Chardonnay y Garnacha.

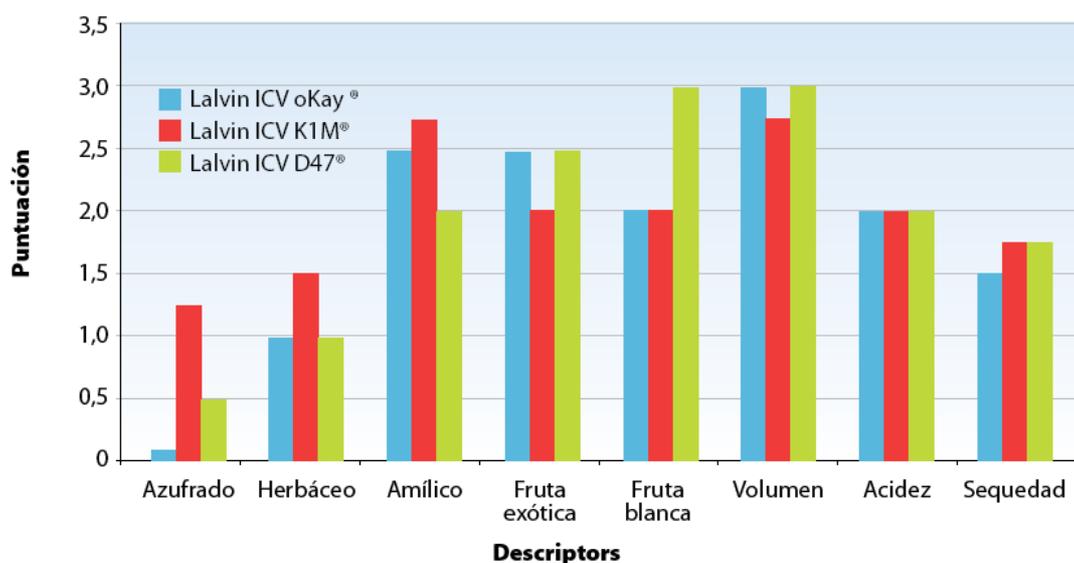


Figura 9. Perfil sensorial del Chardonnay 2012 fermentado con tres levaduras diferentes (ICV R&D)

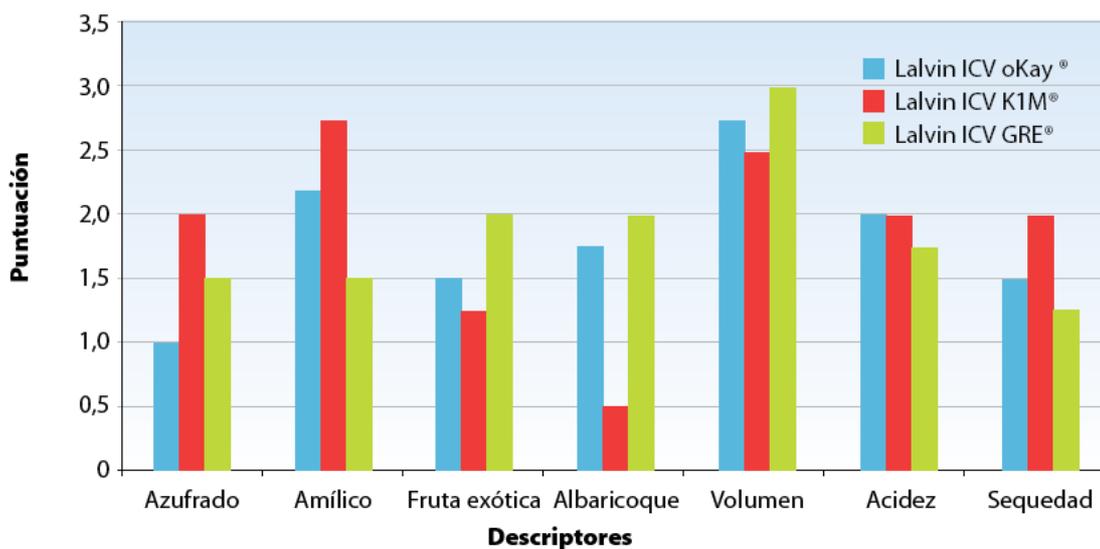


Figura 10. Perfil sensorial del vino rosado de Garnacha 2012 fermentado con tres levaduras diferentes (ICV R&D)

5.3 ANÁLISIS DE COMPUESTOS AZUFRADOS INDESEABLES

Los compuestos azufrados indeseables de H₂S, metanotiol y etil mercaptano, fueron medidos dos meses después del embotellado. El análisis estadístico, donde se toma en cuenta las levaduras fermentadas, la variedad de uva y el análisis del mosto, muestra que la variedad de la uva es el factor principal que afecta las concentraciones de estas moléculas.

Sin embargo, se constató que la levadura Lalvin ICV oKay® era muy diferente a todas las otras y producía una menor cantidad de los compuestos azufrados indeseables analizados. Convertimos entonces su concentración en «unidades de aroma», teniendo en cuenta el umbral de estas moléculas. La figura 11 ilustra algunos de los resultados obtenidos.

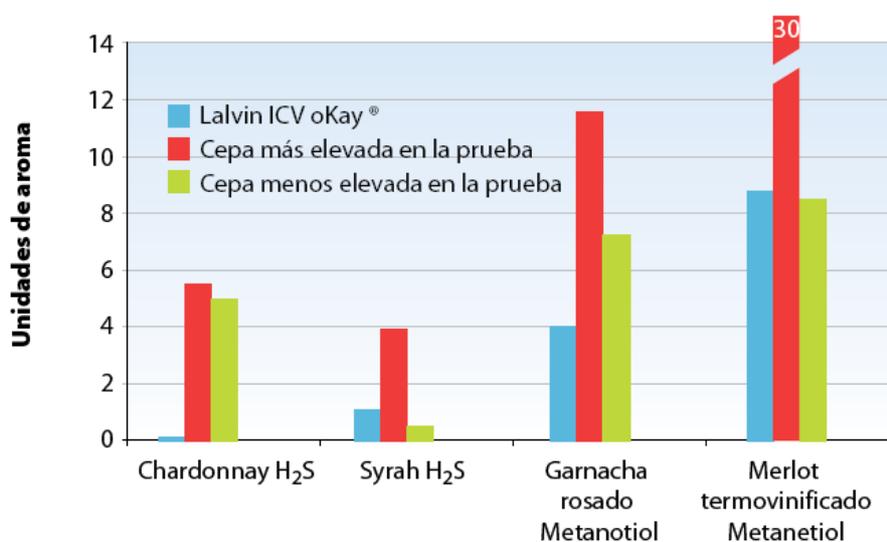


Figura 11. Comparación de los niveles de compuestos azufrados indeseables con pruebas en cuatro variedades distintas de uva (2012 ICV R&D)

6. Conclusión

Comprender la base molecular de la diversidad fenotípica de las levaduras enológicas constituye la primera etapa para el empleo de estrategias de hibridación destinadas a mejorar las propiedades tecnológicas de las levaduras. En este estudio, pudimos descubrir la base molecular responsable de la variación fenotípica en la producción de sulfitos en las levaduras enológicas. Se implementó una investigación QTL con un enfoque global combinando un estudio fisiológico y un análisis transcriptómico. El estudio muestra que la combinación de dos genes, *MET2* y *SKP2*, es responsable de la variación fenotípica observada entre las dos cepas parentales. Además, se ha demostrado que estos genes son también responsables del cambio fenotípico de otras características de interés tecnológico, como la producción de SO₂, H₂S y acetaldehído.

Hasta ahora, los estudios genéticos se habían centrado en el control de la producción de H₂S, pero las soluciones propuestas (p. ej., la reducción de la actividad sulfito reductasa) tenían la desventaja de incrementar mucho la producción de SO₂ (Cordente et al. 2009 y Linderholm et al. 2008). Posteriormente, con el método QTL, se pudieron optimizar muchas otras levaduras enológicas, usando el mismo procedimiento, puesto que un número importante de levaduras enológicas en el mercado tienen por lo menos uno de estos defectos. Ahora, la levadura Lalvin ICV oKay® obtenida con este método muestra cualidades excepcionales. Todas las pruebas realizadas con la levadura Lalvin ICV oKay® a nivel mundial evidencian que su producción de SO₂, H₂S y acetaldehído es casi nula, mostrando los vinos resultantes todo su potencial aromático y respetando el bajo contenido de SO₂ que se les exige para los vinos en el mercado actual.

Referencias y bibliografía

Ambroset, C., M. Petit, C. Brion, I. Sanchez, P. Delobel, C. Guérin, H. Chiapello, P. Nicolas, F. Bigey, S. Dequin, y B. Blondin. 2011. Deciphering the Molecular Basis of Wine Yeast Fermentation Traits Using a Combined Genetic and Genomic Approach. *G3: Genes/Genomes/Genetics*. 1(4):263-281.

Bely, M., J. M. Sablayrolles, and P. Barre. 1990. Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(4):319-324.

Casalone, E., C. M. Colella, S. Daly, E. Gallori, L. Moriani, and M. Polsinelli. 1992. Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 22(6): 435-440.

Cordente, A. G., A. Heinrich, I. S. Pretorius, and J. H. Swiegers. 2009. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Research*. 9(3):446-459.

Deutschbauer, A. M., and R. W. Davis. 2005. Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast. *Nat Genet*. 37(12):1333-1340.

Donalies, U. E., and U. Stahl. 2002. Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of *MET14* and *SSU1*. *Yeast*. 19(6):475-484.

Eschenbruch, R. 1974. Sulfite and Sulfide Formation during Winemaking – A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 25(3):157-161.

Eschenbruch, R., and P. Bonish. 1976. The influence of pH on sulphite formation by yeasts. *Archives of Microbiology*. 107(2):229-231.

Granès, D., L. Pic-Blayteron, J. Negrel, and C. Bonnefond. 2010. Method for a Common Language, Quantitative Descriptive Sensory Analysis. *Practical Winery and Vineyard Journal*. Sept./Oct. 2010.

Hansen, J., and M. C. Kielland-Brandt. 1996. Inactivation of *MET2* in brewer's yeast increases the level of sulfite in beer. *Journal of Biotechnology*. 50(1):75-87.

Linderholm, A. L., C. L. Findleton, G. Kumar, Y. Hong, and L. F. Bisson. 2008. Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(5):1418-1427.

- Marullo, P., M. Aigle, M. Bely, I. Masneuf-Pomarede, P. Durrens, D. Dubourdieu, and G. Yvert. 2007. Single QTL mapping and nucleotide-level resolution of a physiologic trait in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Research*. 7(6):941-952.
- Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, and A. Lonvaud. 1998. L'emploi du dioxyde de soufre dans le traitement des moûts et des vins. *Traité d'oenologie*. Dunod/Lavigne.
- Rosignol, T., L. Dulau, A. Julien, and B. Blondin. 2003. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*. 20(16):1369-1385.
- Thomas, D., and Y. Surdin-Kerjan. 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(4):503-532.
- Thornton, R. J. 1985. The Introduction of Flocculation into a Homothallic Wine Yeast. A Practical Example of the Modification of Winemaking Properties by the Use of Genetic Techniques. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(1):47-49.
- Wainwright, T. 1970. Hydrogen sulphide production by yeast under conditions of methionine, pantothenate or vitamin B6 deficiency. *Journal of General Microbiology*. 61(1):107-119.
- Yoshida, S., J. Imoto, T. Minato, R. Oouchi, Y. Kamada, M. Tomita, T. Soga, and H. Yoshimoto. 2011. A novel mechanism regulates H₂S and SO₂ production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 28(2):109-121.