

Andrea Susana VARGAS TRINIDAD

**Evaluación del shock térmico sobre la viabilidad/vitalidad de
Saccharomyces cerevisiae y sus consecuencias en la
fermentación alcohólica**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

dirigido por Dr. Albert Mas

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona
1 de Setiembre de 2017**

TITULO DEL TRABAJO:

Evaluación del shock térmico sobre la viabilidad/vitalidad de *Saccharomyces cerevisiae* y sus consecuencias en la fermentación alcohólica

Andrea Vargas*, Braulio Esteve-Zarzoso y Albert Mas

Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.

(*) andreavargas2013@gmail.com

ABSTRACT

Stuck or sluggish alcoholic fermentations are a recurring oenological problem in winemaking. The aim of this study was to contribute to the prevention of stuck and sluggish oenological fermentations through the early detection of predisposing thermal conditions, evaluating the combined effect of heat shock with other factors such as the variability of *Saccharomyces* strains and the nutrition of musts. Microvinifications were performed on synthetic must inoculated with two commercial strains of *S. cerevisiae*, PDM and ARM. Two thermal shocks (36°C and 40°C) were assessed for 16 hours on the third day of fermentation. In order to evaluate the effect of nutrition of musts, 3 hours before the shock, 200 mg/L of ammonium in the form of diammonium phosphate was added. Fermentation kinetic was monitored through the daily measuring of density whereas viability/vitality were controlled by Flow Cytometry with fluorescent dyes. Heat shocks affected the fermentative kinetics with different intensity depending on the temperature, the nutrition and the *S. cerevisiae* strain evaluated. No complete arrest in fermentation was observed, however sluggish fermentations were detected in some of the conditions assessed. This effect was higher in the heat shock of 40°C, PDM was more sensitive, according to the analysis of viability and vitality. Nourished fermentations culminated earlier in all cases. It is necessary to extend the study to better understand the effect of high temperatures and prevent problems in the wine industry.

Keyword: wine, stuck fermentation, nitrogen and flow cytometry.

RESUMEN

Las paradas y enlentecimientos de las fermentaciones alcohólicas enológicas son un problema recurrente en la elaboración del vino. El objetivo de este estudio fue contribuir a la prevención de paradas o enlentecimientos de fermentaciones enológicas mediante la detección temprana de condiciones térmicas predisponentes, evaluando el efecto combinado del shock térmico con otros factores como la variabilidad de cepas de *Saccharomyces* y la nutrición de los mostos. Microvinificaciones fueron realizadas en mosto sintético inoculado con dos cepas comerciales de *S. cerevisiae*, PDM y ARM. Al tercer día de inicio de las fermentaciones se realizó un shock térmico (36°C y 40°C) durante 16 horas. Para evaluar el efecto de la nutrición de los mostos, 3 horas antes del shock, se adicionó 200 mg/L de amonio en forma de fosfato diamónico. La cinética de fermentación fue controlada mediante la disminución de la densidad y la viabilidad/vitalidad por Citometría de Flujo con tinción de fluoróforos. Se observó que los shocks térmicos afectaron la cinética fermentativa con diferente intensidad dependiendo de la temperatura, la nutrición y la cepa de *S. cerevisiae* evaluada. No se observó ninguna parada de fermentación, pero si enlentecimientos. Este efecto fue mayor ante el shock térmico de 40°C, siendo PDM más sensible, lo cual se evidencio en el análisis de los porcentajes de viabilidad y vitalidad. Las fermentaciones nutridas culminaron antes en todos los casos. Es necesario ampliar el estudio para conocer mejor el efecto de las altas temperaturas y prevenir problemas en la industria vitivinícola.

Palabras clave: vino, paradas de fermentación, nitrógeno y Citometría de flujo.

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica es considerada la etapa más importante en el proceso de elaboración de los vinos. Este proceso consiste en la transformación de azúcares propios del mosto de uvas (glucosa y fructuosa) en alcohol etílico y dióxido de carbono por acción de las levaduras, principalmente del género *Saccharomyces*. Durante la fermentación, las levaduras experimentan diversas etapas de crecimiento. Una etapa inicial de adaptación al medio, seguida de un crecimiento exponencial hasta alcanzar una densidad celular, luego una etapa estacionaria donde sucede el 60% de la fermentación (Bisson, 2005). Con el avance de la fermentación, las levaduras afrontan diferentes situaciones de estrés que inducen cambios fisiológicos y moleculares. En el contexto de una fermentación alcohólica, un estrés que exceda a la capacidad de adaptación de la levadura seguramente conducirá a una parada en la fermentación. Por esto, es importante destacar que en algunas condiciones la levadura priorizará mantenerse viable a fermentar, produciendo un enlentecimiento de la fermentación o una total detención de la misma (Bisson, 2005).

Una parada de fermentación o fermentación incompleta fue definida, como aquellas que presentan mayor concentración de azúcares residuales que lo esperado. Y los enlentecimientos de fermentación se refieren a una baja velocidad de consumo de azúcares por las levaduras (Bisson, 1999). Se han descrito diversos factores que pueden generar una parada o enlentecimiento de las fermentaciones alcohólicas en la industria del vino; así como se han propuesto estrategias para la reactivación y para la predicción de este problema enológico (Bisson, 1999; Blateyron & Sablayrolles, 2001; Cavazza y cols., 2004; Malherbe y cols., 2007; Emparán y cols., 2012; Urtubia y cols., 2012). Estas fermentaciones problemáticas encarecen el proceso y aunque en algunos casos pueda ser revertido, la calidad del vino se ve afectada (Bisson, 1999, Bisson, 2005).

A pesar de los numerosos estudios, los autores concluyen que las causas pueden ser multifactoriales y que a pesar de que algunos mostos pueden presentar mayor riesgo de fermentaciones detenidas, no necesariamente las fermentaciones serán anormales (Malherbe y cols., 2007). Los cambios bruscos de temperatura que ocurren durante la fermentación no han sido estudiados en profundidad como factores desencadenantes de las fermentaciones problemáticas. Una elevación brusca de la temperatura generalmente se relaciona con el metabolismo de las levaduras y se produce en los primeros días de la fermentación (Ribéreau-Gayon, y cols., 2006). La magnitud de este cambio, que desencadena respuestas celulares que conducen a un enlentecimiento o detención de la fermentación no ha sido evaluada en profundidad (Bisson, 1999).

Las levaduras consumen nitrógeno del mosto que influye en su metabolismo y crecimiento, la velocidad de fermentación y las propiedades organolépticas del vino. La deficiencia de nitrógeno ha sido descrita como una de las principales causas de paradas o enlentecimiento de las fermentaciones alcohólicas, siendo una práctica enológica habitual la nutrición de los mostos (Bisson, 1999). Se ha estudiado el tiempo y tipo de fuente de nitrógeno más adecuado para suplementar los mostos y asegurar la biomasa y la culminación de la fermentación (Sablayrolles y cols., 1996; Beltran y cols., 2005; Martínez-Moreno y cols., 2012). Siendo el amonio la fuente nitrogenada preferida para la producción de biomasa, cuando la adición se realiza en la primera mitad de la fermentación (Beltran y cols., 2005). Por otro lado, es importante conocer la cantidad y calidad del nitrógeno inicial en los mostos, el cual se relaciona con la variedad de las uvas y las condiciones de vendimia, que además puede ser alterado por las prácticas enológicas. Un incremento innecesario de nitrógeno puede ocasionar consecuencias perjudiciales para el vino como son la producción ácido acético y precursores de carbamato de etilo y aminos biogénicas, así como inestabilidad microbiológica del vino (Ribéreau-Gayon y cols., 2006; Gutiérrez y cols., 2012).

El estado fisiológico de las levaduras puede definirse mediante los conceptos de viabilidad y vitalidad. La viabilidad de las levaduras hace referencia a un estado fisiológico suficiente para asegurar su supervivencia e incluye controles de la permeabilidad de la membrana celular. (Zhang & Fang, 2004; Login y cols., 2017). La vitalidad es referida a las actividades metabólicas que son funciones esenciales para la vida de la levadura. En la actualidad se dispone de técnicas que permiten evaluar estas dos características mediante la tinción con diversos fluoróforos y pueden ser analizadas por microscopía de fluorescencia, o por citometría de flujo (Chan y cols., 2012). La citometría de flujo ha comenzado a ser utilizada en enología para el seguimiento de las fermentaciones alcohólicas así como para conocer el estado fisiológico de las levaduras (Hewitt & Nebe-Von-Caron, 2001; Díaz y cols., 2010; Guzzon & Larcher, 2015; Login y cols., 2017). Por otro lado, se propone el uso de Ioduro de Propidio (IP) para evaluar la integridad de membrana, ya que esta molécula solo ingresa a la célula cuando las membranas están dañadas. Se considerarán células viables, aquellas que no se tiñan con IP, aunque la ausencia de tinción con IP no implica la capacidad para multiplicarse de las levaduras. Se propone el uso de 5-carboxifluoresceína diacetato, éster acetoximetil (CFDA,AM) como indicador de vitalidad celular. En este caso, CFDA,AM es una molécula que puede entrar a todas las células y que sólo es capaz de fluorescer una vez que es clivada por esterasas intracelulares inespecíficas. De esta manera la fluorescencia se correlaciona con la vitalidad celular (Login y cols., 2017).

El objetivo principal de este estudio es contribuir a la prevención de paradas o enlentecimiento de fermentaciones enológicas mediante la detección temprana de condiciones térmicas predisponentes. Se plantea evaluar si una elevación brusca de la temperatura (shock térmico) de manera individual o combinada con otros factores (nutrición de mostos, diferentes cepas de levaduras) produce una alteración en la cinética de la fermentación y en la relación viabilidad/vitalidad de las células pudiendo conducir a un enlentecimiento o a una detención completa de la misma.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Levaduras y precultivo

Se usaron dos cepas enológicas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae*: Pasteur Prise de Mousse (PDM) y la cepa ARM, ambas de la compañía AGROVIN (Ciudad Real, España). La cepa PDM ha sido descrita como de baja demanda de nitrógeno. Mientras que la cepa ARM es considerada de elevada demanda de nitrógeno.

PDM es comercializada por Lallemand (Montreal, Canadá) como EC1118, y ARM es comercializada como EP2 por la compañía Maurivin.

Con la finalidad de generar el precultivo de las levaduras, PDM y ARM, se sembraron en confluencia 8 placas de cultivo de medio YPD y fueron incubadas durante 72 horas a 28°C. Se inocularon las colonias en una botella de vidrio con 100 mL de medio YPD líquido (Glucosa 4%, extracto de levadura 1% y peptona 2%) para cada levadura. Luego, se incubaron las botellas durante 4 horas a 28°C con agitación a 120 RPM. Utilizando la Cámara de Neubauer, se realizaron recuentos para determinar la concentración del cultivo. El inóculo inicial fue de 2×10^6 células/mL.

2.2 Fermentaciones, shocks térmicos y nutrición

Se realizaron microvinificaciones usando mosto sintético (MS) descrito por Riou y cols. (1997) con algunas modificaciones. La concentración final de azúcares se modificó a 240 g/L (120 g/L de Glucosa y 120 g/L de Fructosa); la concentración final de Nitrógeno se ajustó a 140 mg/L (55 mg N/L como Cloruro de amonio y 85 mg N/L como aminoácidos); y se adicionaron factores de anaerobiosis. Las fermentaciones se llevaron a cabo en botellas de vidrio de 500 mL que contenían 300 mL de mosto sintético estéril (pH 3.3), y se realizaron por triplicado a 25°C con una agitación diaria. Se monitoreó diariamente el avance de la fermentación midiendo la densidad con el densímetro Mettler Toledo, PortableLab™. Se consideró que la fermentación culminó cuando los azúcares totales fueron menores que 4 g/L, este valor se determinó usando el Kit comercial Glucosa-Fructosa de Roche®.

El diseño experimental se muestra en la Figura 1, el cual incluye la evaluación de dos cepas de levaduras, dos condiciones de nutrición y dos temperaturas para el shock térmico, más un tratamiento control sin shock térmico.

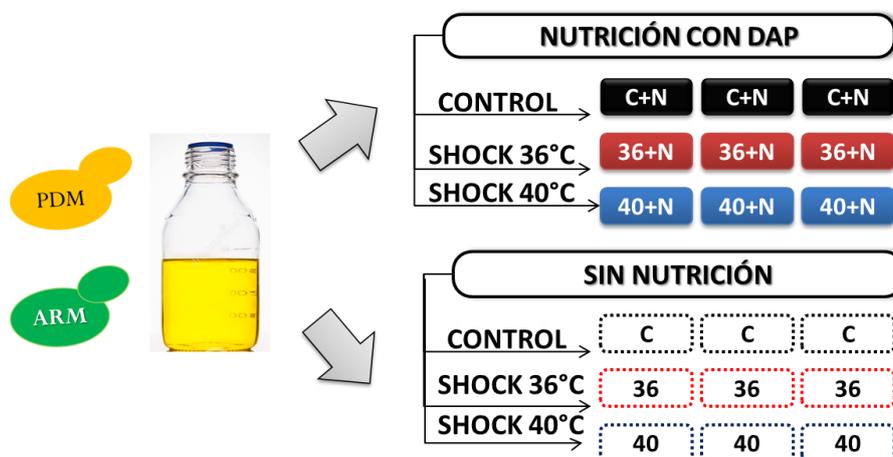


Fig. 1. Diseño experimental de las condiciones evaluadas en el ensayo.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la nutrición de los mostos, 3 horas antes del shock térmico se adicionó 200 mg/L de amonio en forma de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (DAP), mediante el uso de la solución estéril de 220 g/L de DAP.

El shock térmico se realizó mediante un aumento de la temperatura al tercer día de fermentación alcohólica (densidad promedio 1072 +/- 5) mediante la colocación de las botellas en baño de agua termostatzado, a 36°C o 40°C. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se mantuvo durante 16 horas. Luego, las botellas se acondicionaron a 25°C donde continuaron el proceso fermentativo hasta final.

2.3 Evaluación de la viabilidad y vitalidad por citometría de flujo.

La viabilidad y vitalidad se evaluaron en los siguientes días de la fermentación: Día 2 de fermentación (previo al shock), día 5 (después del shock), día 7, y el día en que la fermentación terminó en cada tratamiento. Se tomó 1 mL del mosto en fermentación en condiciones de esterilidad, y se realizaron diluciones decimales en buffer fosfato salino (PBS) estéril (pH 7.4). A un mililitro de las muestras diluidas que contenían una concentración de 10^7 células/mL aproximadamente, se le adicionó 1 μL de IP (20 mM, Molecular Probes™) y se incubó durante 10 minutos a 25°C. En otro tubo, por separado se adicionó 1 μL CFDA, AM (10 mg/mL en DMSO, Molecular Probes™) y se incubó por 30 minutos. Las tinciones fueron homogeneizadas y posteriormente analizadas por citometría de flujo.

Se utilizó el citómetro de flujo CyFlow Space (Partec, Alemania) equipado con un láser azul que emite a 488 nm. Mediante el uso de 4 filtros, se consideraron las señales: dispersión frontal de la luz (FSC); dispersión de la luz a 90° (SSC); y dos señales de fluorescencia, la primera con filtro 530 nm para detectar la fluorescencia verde (canal FL1) y la segunda con filtro 630 nm para colectar fluorescencia roja (canal FL2). Se colectaron y analizaron los datos usando el programa FloMax®. Las poblaciones de levaduras, PDM y ARM, se identificaron y delimitaron en el gráfico de puntos FSC vs SSC. Mientras que la diferenciación entre levaduras viables y no viables, se realizó en el histograma FL2 vs recuento, y entre levaduras vitales y no vitales en el histograma FL1 vs recuento. Se promediaron los porcentajes de levaduras viables y vitales de cada triplicado de los tratamientos y se analizaron vs sus controles respectivos. Además, se determinaron las desviaciones estándar de los promedios.

Paralelamente a modo de control de viabilidad de las células, se realizó una siembra en placa al finalizar el shock térmico. Para ello se tomó 1 mL de cada fermentación en condiciones de esterilidad y se realizaron diluciones sucesivas en buffer PBS estéril. Luego, se sembró en superficie en placas YPD y se incubó a 28°C durante 72 horas. Se promediaron los logaritmos decimales del recuento de UFC/mL y se determinaron las desviaciones estándar de los promedios

3. RESULTADOS

3.1 Cinética fermentativa y efecto del shock térmico

El objetivo de este estudio fue estudiar el efecto de un shock térmico asociado a la nutrición con nitrógeno sobre la cinética de fermentación alcohólica conducida por levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se estudiaron dos temperaturas de shock térmico: 36°C y 40°C, además se incluyó una condición control, la cual fue conducida a 25°C. Con respecto a la cinética fermentativa observamos que las fermentaciones control, en la mayoría de los casos, culminaron antes que las fermentaciones sometidas a los shocks térmicos, en pocas fermentaciones terminaron en simultáneo. La cinética fermentativa de ambas levaduras, PDM y ARM, fue diferente. Las fermentaciones llevadas a cabo por la levadura PDM tuvieron una duración de 14 días independientemente de la nutrición (C+N y C). Mientras que las dos fermentaciones controles con la levadura ARM mostraron diferencias para la misma levadura, tal como se muestra en la figura 3A, donde se observa que la nutrición no influye en la cinética fermentativa, la fermentación sin nutrir culminó un día después de la nutrida (18 y 17 días). Y en el caso de la figura 3B, la fermentación nutrida (C+N) culminó a los 10 días mientras que la sin nutrir (C) a los 14.

Se observó que los shocks térmicos de 36°C y 40°C aplicados al tercer día de iniciada la fermentación (densidad promedio 1072 +/- 5) afectaron la cinética de fermentación con diferente intensidad dependiendo de la temperatura, la nutrición y la cepa de *S. cerevisiae* evaluada. La magnitud del efecto de enlentecimiento de la fermentación fue mayor cuando se aplicó el shock térmico a 40°C que el efecto provocado a 36°C. No se observó una parada de fermentación en ninguno de los casos. En todos los tratamientos las fermentaciones llegaron a fin, con una densidad menor a 997 (Figura 2 y 3) y una concentración de azúcar total residual inferior a 4 g/L.

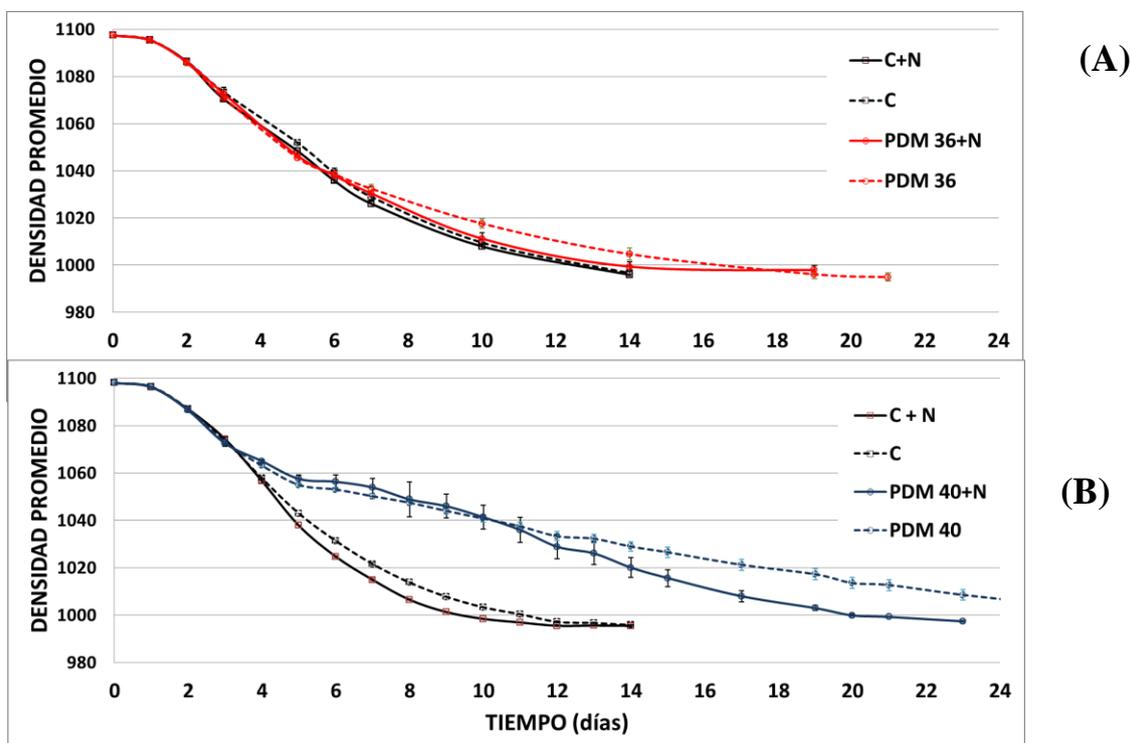


Fig. 2. Seguimiento de la fermentación de la levadura PDM sometido a un shock térmico de 36°C (A) y 40°C (B). C+N: control nutrido. C: control sin nutrir. Las barras de error representan la desviación estandar ($n=3$).

De las dos cepas enológicas estudiadas (PDM y ARM), la cepa PDM fue más sensible a los shocks térmicos, mostrando un enlentecimiento en la cinética de fermentación desde la aplicación del shock. En el caso del shock térmico de 36°C, se observó un enlentecimiento leve de la cinética fermentativa, que resultó en una demorada finalización de la fermentación en 7 (*PDM 36*) y 5 (*PDM 36+N*) días respecto de sus controles sin (*C*) y con nutrición (*C+N*) respectivamente (Figura 2A). El shock térmico de 40°C produjo un efecto marcado en la velocidad de la fermentación posterior al shock, produciendo un retraso en la finalización de 22 (*PDM 40*) y 9 (*PDM 40+N*) días en los tratamientos sin y con nutrición respectivamente en relación a sus controles (Figura 2B). Las fermentaciones más afectadas mostraron una duración de hasta 36 días (*PDM 40*, datos no mostrados en la Fig. 2A).

En el caso de la cepa ARM, un shock térmico de 36°C no produjo efecto marcado sobre la cinética fermentativa, independientemente de la nutrición de los mostos (Figura 3A), mientras que el shock térmico de 40°C produjo un enlentecimiento de la fermentación, las cuales finalizaron 11 (*ARM 40*) y 10 (*ARM 40+N*) días después que sus controles sin (*C*) y con nutrición (*C+N*) respectivamente (Figura 3B).

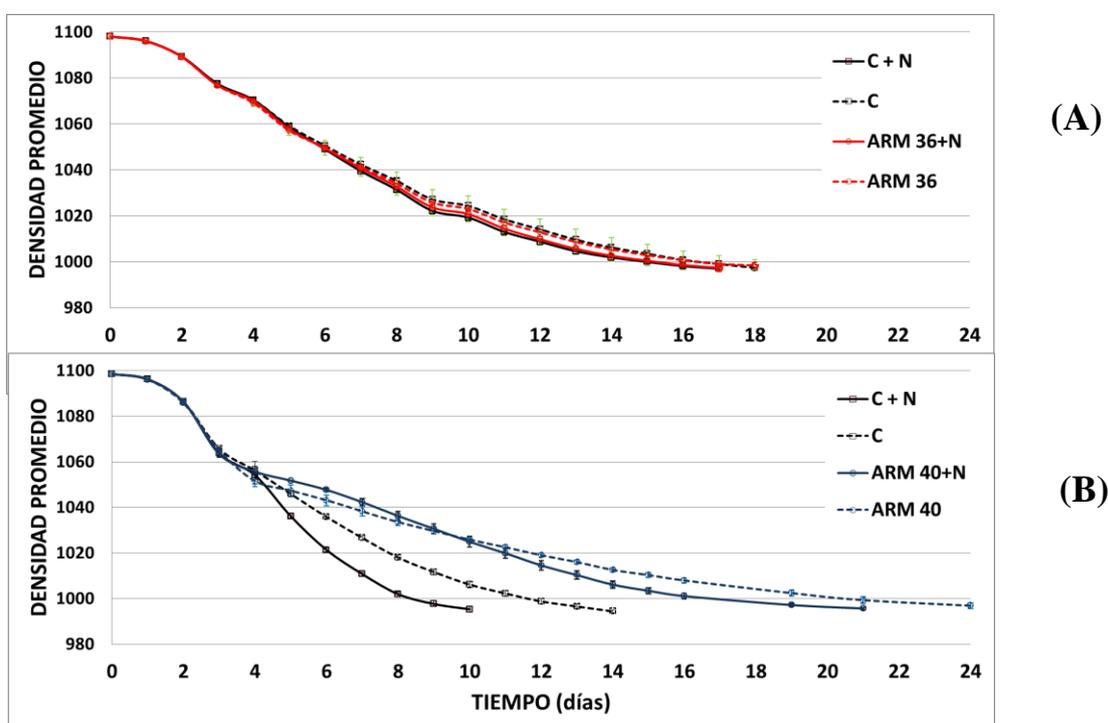


Fig. 3. Seguimiento de la fermentación de la levadura ARM sometido a un shock térmico de 36°C (A) y 40°C (B). C+N: control nutrido. C: control sin nutrir. Barras de error representan la desviación estandar ($n=3$).

En general se observó que, ante el shock térmico de 40°C, ambas cepas mostraron un enlentecimiento en la cinética de fermentación, siendo este efecto más intenso en el caso de PDM. Para poder cuantificar el efecto de cada tratamiento de manera comparable, en la Figura 4 se muestra la densidad relativa (densidad del tratamiento con shock térmico / densidad del control respectivo) para ambas cepas de levaduras. Cuando los valores mostrados son mayores a 1, indica que las muestras sometidas al shock térmico presentaron una densidad mayor al control para cada uno de los días de fermentación evaluados. En la Figura 4, se observa que la magnitud de cambio en la densidad relativa fue mayor en la cepa PDM que en la cepa ARM, indicando que la primera fue más sensible al shock térmico que ARM independientemente de la nutrición de los mostos.

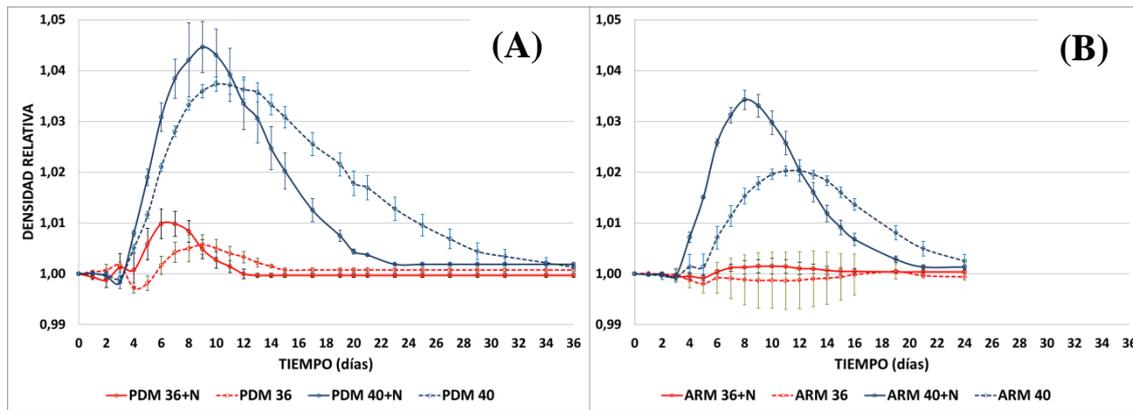


Fig. 4. Seguimiento de las densidades relativas (densidad tratamiento shock térmico / densidad del control respectivo) de las levaduras PDM (A) y ARM (B), para cada shock térmico. Barras de error representan la desviación estandar ($n=3$).

El efecto del shock térmico en los tratamientos que fueron nutridos fue diferente al de los tratamientos sin nutrición. Los tratamientos que recibieron nutrición antes del shock térmico fueron más afectados durante los primeros días posteriores al shock térmico que los tratamientos no nutridos. Este efecto temprano se observó para ambas temperaturas aplicadas (36°C y 40°C) para PDM, y a 40°C para la cepa ARM (Figura 4). Sin embargo, este marcado efecto inicial ante el shock no impidió que la fermentación culminara, inclusive antes que las fermentaciones no nutridas. Por otro lado, los tratamientos no nutridos, mostraron un efecto menor y más retardado de enlentecimiento ante el shock térmico respecto a los tratamientos nutridos, pero las fermentaciones se mantuvieron con una cinética enlentecida, finalizando la fermentación en días posteriores a los tratamientos nutridos (Figura 4).

3.2 Efecto del shock térmico en la viabilidad y vitalidad de las levaduras.

Con el objeto de conocer el efecto del shock térmico sobre la viabilidad y vitalidad de las poblaciones de ambas cepas de *S. cerevisiae* se realizaron mediciones mediante citometría de flujo utilizando diferentes tinciones.

Se incluye dentro de la categoría “levaduras viables” (IP -), aquellas que presentaron sus membranas íntegras y por lo tanto no se tiñeron con yoduro de propidio. Las poblaciones de levaduras se observan en el histograma FL2 vs Recuentos (*counts*) como picos azules: IP- (viables) a la izquierda e IP+ (no viables) a la derecha, además en el gráfico de puntos FL1 vs FL2 como nube IP- inferior e IP+ superior. En la categoría “levaduras vitales”, se consideran aquellas que mostraron actividad esterasa y que al ser teñidas con CFDA, AM generan fluorescencia. Las poblaciones de levaduras se observan en el histograma FL1 vs Recuentos (*counts*) como picos verdes: CFDA+ (vitales) a la derecha y CFDA- (no vitales) a la izquierda, además en el gráfico de puntos FL1 vs FL2 como nubes CFDA+ oblicua a la derecha y CFDA- circular a la izquierda, ver Figura 5.

3.2.1 Levadura PDM

Ante el shock térmico de 36°C, se observó que los tratamientos nutridos mostraron una mayor viabilidad a lo largo de la fermentación, mientras que los tratamientos no nutridos presentaron menores porcentajes de viabilidad en los estadios de fermentación posteriores al shock térmico (Figura 6A). Se observó una disminución en la vitalidad de las células sometidas al shock térmico en ambos tratamientos (con y sin nutrición), siguiendo una tendencia de disminución de la vitalidad en el tiempo (Figura 6B).

En los tratamientos de shock térmico a 40°C, se observó una disminución significativa de la viabilidad y consecuentemente la vitalidad de las células en los días posteriores al shock térmico, donde las muestras nutridas fueron más sensibles, mostrando una reducción del 90.9% en la viabilidad respecto al mismo día de su respectivo tratamiento control. Sin embargo, se observó que las células que fueron nutridas recuperaron gradualmente la viabilidad y vitalidad en el tiempo, aunque siempre en menor porcentaje que su tratamiento control, mientras que las poblaciones de células no nutridas mantuvieron su viabilidad, pero mostraron un descenso en los porcentajes de células vitales a medida que avanzó la fermentación (Figura 6 C y D).

El recuento en placa YPD nos permitió evaluar el efecto de los shocks térmicos inmediatamente después de finalizadas las 16 horas (Figura 8A). Se observó disminución de la viabilidad, siendo mayor la reducción bajo el efecto del shock térmico de 40°C en comparación al de 36°C.

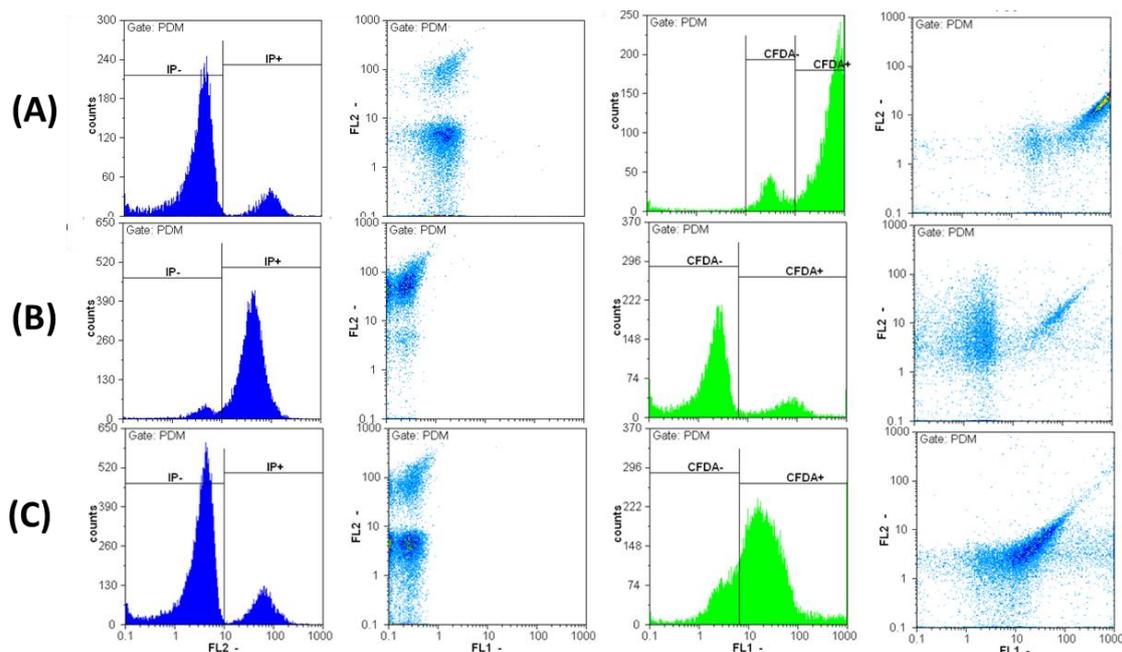


Fig. 5. Cambio en la viabilidad de la levadura PDM con nutrición. A: día 2, antes del shock térmico. B: día 5, después del shock térmico. C: día 5, control sin shock térmico.

3.2.2 Levadura ARM

En los tratamientos con un shock térmico a 36°C, se observaron similares porcentajes de viabilidad y vitalidad a lo largo de las fermentaciones con y sin nutrición con respecto a sus controles. Este hecho era esperable, ya que esta cepa no mostró cambios en la cinética fermentativa ante el shock térmico a 36°C (Figura 6 A y B).

En los tratamientos con shock térmico a 40°C, se observó la disminución de la viabilidad y vitalidad de las células en todas las fermentaciones (Figura 6 C y D). Las poblaciones viables de las muestras nutridas se mantuvieron constantes desde el shock hasta el fin de la fermentación, mientras que las células no nutridas mostraron un descenso progresivo de la viabilidad hacia el final de la fermentación (Figura 6C).

La disminución de la viabilidad fue también comprobada mediante el recuento en placa de YPD, tal como muestra la Figura 8B donde se observa una mayor reducción de las células viables bajo el efecto del shock térmico de 40°C en comparación al de 36°C.

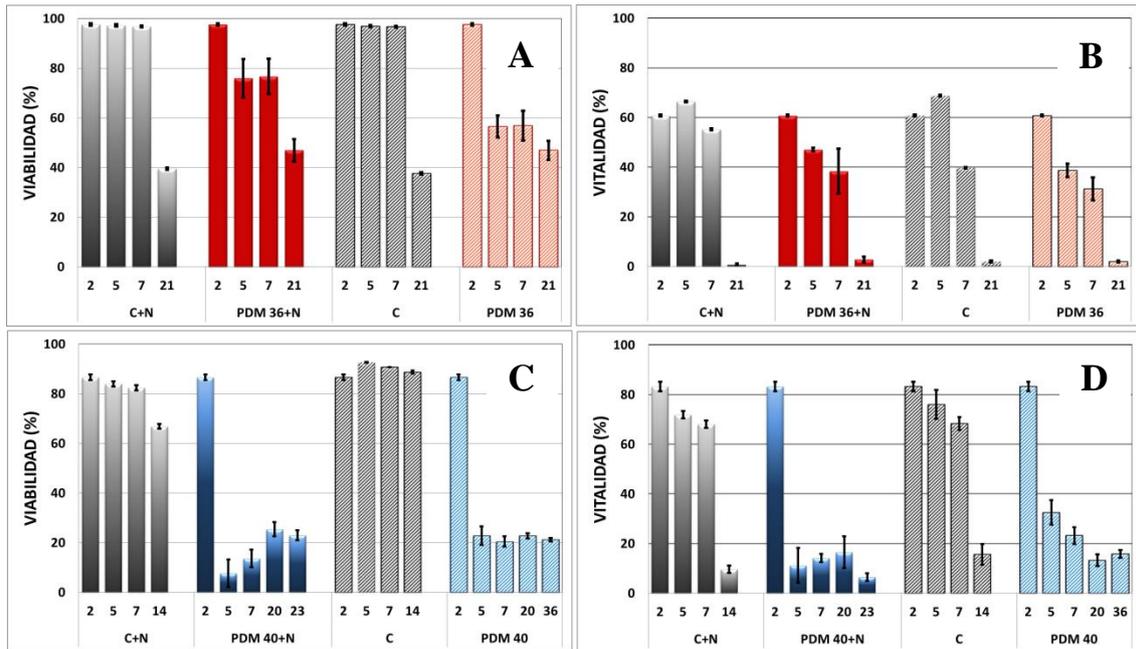


Fig. 6. Cambios en viabilidad (izquierda) y vitalidad (derecha) a lo largo de las fermentaciones de la levadura PDM, con el shock a 36°C (A y B) y con el shock a 40°C (C y D). Barras de error representan la desviación estandar ($n=3$).

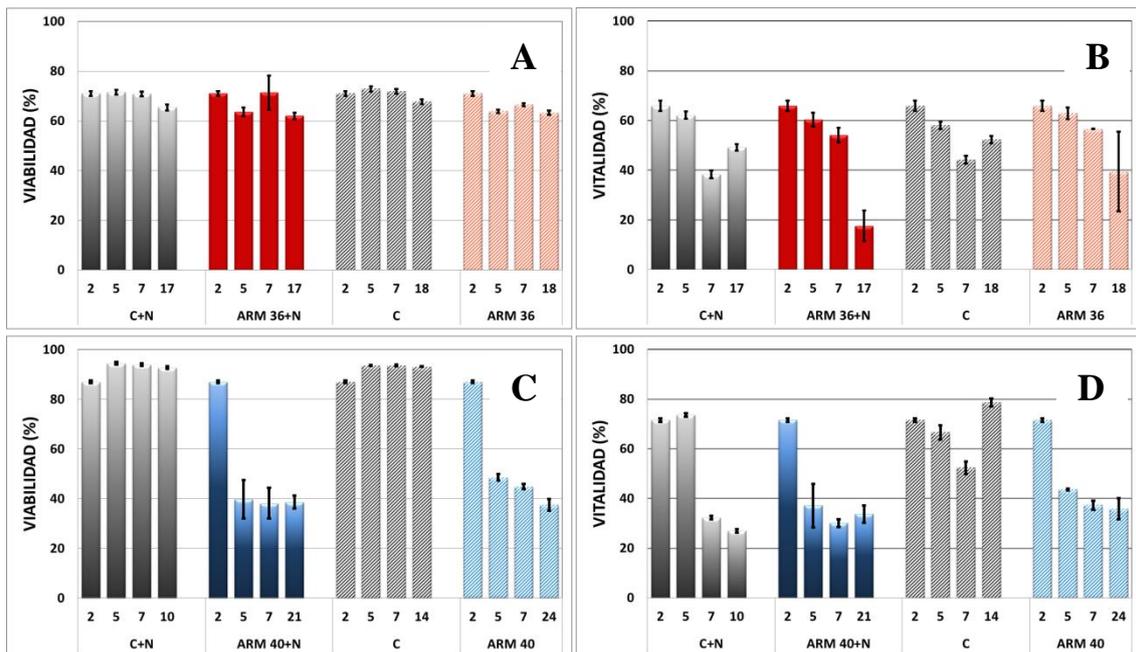


Fig. 7. Cambios en viabilidad (izquierda) y vitalidad (derecha) a lo largo de las fermentaciones de la levadura ARM, con el shock a 36° (arriba) y con el shock a 40° (abajo). Barras de error representan la desviación estandar ($n=3$).

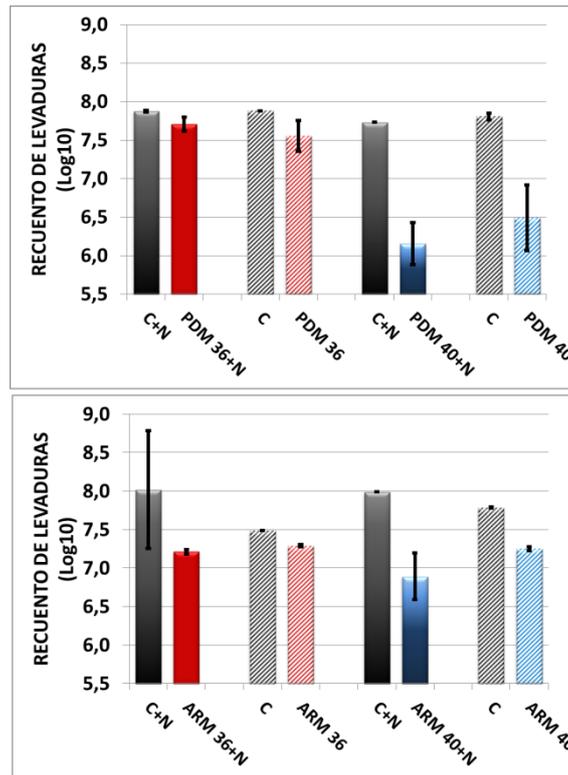


Fig. 8. Comparación del logaritmo de los recuentos en placa de medio YPD de las levaduras PDM y ARM al finalizar el shock térmico correspondiente. Las barras de error representan la desviación estandar ($n=3$).

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar si un shock térmico de manera individual o combinada con otros factores (nutrición de mostos, diferentes cepas de levaduras) produce una alteración en la cinética de la fermentación y en la relación viabilidad/vitalidad de las células pudiendo conducir a un enlentecimiento o a una detención completa de la misma.

Bisson (1999), define una parada de fermentación como aquella que presenta una concentración de azúcar residual superior a 4 g/L, y una fermentación enlentecida a la que tarda más que las fermentaciones en promedio para consumir los azúcares del mosto, inclusive meses. Se han descrito diferentes causas de las paradas y enlentecimientos de las fermentaciones alcohólicas. En este sentido, el efecto del shock térmico (incremento de la temperatura) sobre las levaduras responsables de la fermentación ha sido poco estudiado.

El incremento de la temperatura durante estadíos tempranos de la fermentación puede asociarse a la elevada actividad metabólica de las levaduras en esta etapa del proceso. Este fenómeno se ve incrementado por la escasa capacidad de refrigeración que pueden presentar algunas bodegas que fermentan grandes volúmenes de mosto. Para subsanar este problema, las bodegas, realizan remontajes diarios con la finalidad de homogeneizar la temperatura dentro del tanque o pileta, sin embargo esto podría resultar insuficiente. La temperatura que se alcanza en el interior de los mostos en fermentación puede mantenerse elevada durante un determinado periodo el cual podría resultar crítico para el normal desarrollo de las fermentaciones. Por otro lado, este fenómeno se puede ver agravado por la temperatura con la cual la uva es cosechada, favorecido además por el tiempo de traslado y espera desde la vendimia hasta el ingreso a bodega. Se sabe que a consecuencia del cambio climático, las temperaturas ambientales se ven incrementadas, pudiéndose contarse con días (más de 35°C) y noches cálidas, cosechándose uvas calientes (más de 30°C), así como de mayor grado azucarino. Para la industria enológica, regular la temperatura del mosto en el menor tiempo posible para que permita a la levadura desarrollarse adecuadamente representa un reto. Aunque existan más y mejores controles de las fermentaciones, se siguen reportando paradas o enlentecimientos de fermentaciones alcohólicas en la industria enológica. En un informe del Instituto de Investigación Australiano del Vino (AWRI), se reporta que durante la vendimia del 2008 en Australia, se duplicaron las consultas sobre las paradas de fermentación. Este informe relaciona este fenómeno a la ola de calor en el sur de Australia durante ese año, donde se registraron temperaturas ambientales superiores a 40°C al momento del ingreso de la uva a la bodega, y a la incapacidad de los sistemas de refrigeración de muchas bodegas para enfriar adecuadamente el mosto (Coulter, 2008). Por lo que es importante conocer el efecto de altas temperaturas sobre la cinética y viabilidad/vitalidad de las levaduras durante las fermentaciones alcohólicas. En nuestro estudio se evaluó el efecto de un incremento de temperatura prolongado durante 16 horas, y se analizaron dos temperaturas 36°C y 40°C al tercer día de iniciada la fermentación (densidad promedio 1072 +/- 5).

Por otro lado, otros autores estudiaron el efecto de estrés térmico a 35°C sobre la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* VRB (Lallemand). En este trabajo, la levadura fue inoculada en mosto pasteurizado, y las fermentaciones en su totalidad fueron conducidas a 29°C (control) y 35°C (estrés térmico: F35). Se observó que el consumo de azúcares durante los primeros 4 días de la fermentación fue similar entre el control y F35. El control finalizó la fermentación al consumir el 99% de los azúcares del mosto (azúcar residual: 1.6 g/L). Mientras que F35 no logró fermentar todos los azúcares del mosto (solo 90%) observándose fermentaciones detenidas con azúcar residual de 20 g/L. Los autores explican que las células bajo estrés térmico incrementan el flujo pasivo de protones hacia el citoplasma, descendiendo el pH intracelular contribuyendo a la reducción de la cinética fermentativa (Ancín-Azpilicueta y cols., 2012). Nuestros resultados coinciden con la tendencia observada en este estudio, en el que las fermentaciones alcohólicas conducidas a temperaturas superiores a las recomendadas (36°C y 40°C) experimentarían problemas en su cinética fermentativa. Al ser menor la duración del estrés térmico (16 horas) en nuestro estudio, nosotros no observamos detención o parada de

ninguna fermentación, sin embargo si se evidenciaron enlentecimientos en la mayoría de las fermentaciones.

La compañía Agrovin describe que la cepa PDM se emplea con éxito en casos de paradas de fermentación (Agrovin, 2014) a diferencia de ARM (Agrovin, 2016); y las temperaturas de trabajo recomendadas no superan los 25°C para ambas levaduras. De forma contraria, en nuestro estudio observamos que PDM fue más sensible a los shocks térmicos, inclusive algunas fermentaciones duraron 36 días, en comparación a la cepa ARM (24 días).

Por otro lado, se han propuesto diferentes estrategias de reactivación de las fermentaciones enlentecidas y detenidas (Cavazza y cols., 2004; Maisonnave y cols., 2013). Al disminuir la velocidad de fermentación por parte de las levaduras inoculadas, la microbiota nativa (levaduras y bacterias) consumen los azúcares y nutrientes del mosto, y producen compuestos indeseables en el vino (Lonvaud-Funel, 1999). En la industria enológica no se espera pacientemente a que las fermentaciones paradas y enlentecidas culminen, ya que al detectar un enlentecimiento en los controles diarios de los tanques de fermentación, se evalúa de inmediato las posibles correcciones. Por lo que, las fermentaciones enlentecidas observadas en nuestro trabajo, de hasta 36 días de duración (*PDM 36*), no se observarían en las bodegas, debido a que no se esperaría a que la fermentación culminé por sí sola sin ninguna medida correctiva.

La deficiencia de nitrógeno es una de las principales causas de las paradas o enlentecimientos de las fermentaciones alcohólicas (Bisson, 1999). Existe una relación directa entre la deficiencia de nitrógeno con una menor producción de biomasa y por ende una menor tasa fermentativa (Varela y cols., 2004). Además el nitrógeno presente en el mosto favorece la vitalidad de las levaduras porque permite el adecuado recambio de sus proteínas y enzimas durante la fase estacionaria, así como la activación de los transportadores y enzimas implicados en la fermentación alcohólica.

La suplementación con fuentes nitrogenadas a los mostos es una práctica enológica habitual para evitar las consecuencias de la deficiencia de nitrógeno, y se realiza sin conocer la concentración inicial de nitrógeno del mosto. Además, se ha estudiado el momento y fuente nitrogenada adecuada para nutrir los mostos. La fuente más usada son las sales amonio, pero la adición exclusiva de este compuesto puede desequilibrar la relación natural entre la composición inorgánica y orgánica, de esta manera el consumo promedio de aminoácido podría verse afectado (Beltran y cols., 2005). En el presente estudio, el mosto sintético inicial contenía 140 mg N/L, y para la nutrición de los mostos se utilizó DAP al tercer día de iniciada la fermentación (densidad promedio 1072 +/- 5). Nuestros resultados coinciden con la tendencia antes descrita, ya que en general la nutrición nitrogenada de los mostos favorece el avance de la fermentación. Este efecto fue mejor evidenciado ante el shock térmico de 40°C, donde las fermentaciones nutridas culminaron en menor tiempo en comparación a los tratamientos no nutridos.

Es relevante conocer la demanda de nitrógeno de cada levadura, así como la concentración de nitrógeno en el mosto a fermentar para evitar suplementar innecesariamente. Se ha visto que el consumo de nitrógeno de las cepas PDM y ARM es diferente. Gutiérrez y cols. (2013) estudiaron 4 cepas del género *Saccharomyces* en fermentaciones alcohólicas, utilizando mosto sintético con 3 concentraciones iniciales de nitrógeno (60, 140 y 300 mg N/L) y 200 g/L de azúcares (glucosa y fructuosa) en agitación. En las fermentaciones con 140 mg N/L, se observó que PDM consumió el nitrógeno en 48 horas, mientras que ARM lo hizo en 72 horas. Al comparar las fermentaciones con diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno, se evidenció que la levadura PDM fue consumiendo el nitrógeno progresivamente y más rápido, mientras que ARM aumentó considerablemente el consumo de nitrógeno a partir de las 24 horas. En ambas levaduras, al tercer día de iniciada la fermentación se consumió la totalidad de nitrógeno del medio. Por otro lado, en otro trabajo se estudió el requerimiento específico de nitrógeno para estas levaduras. Se determinó que la levadura PDM es altamente demandante de nitrógeno lo

que le permite tener un mejor rendimiento en la fermentación (Gutiérrez y cols., 2012). Asimismo en este estudio evaluaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno, observando que las cuatro levaduras mostraron mejor desarrollo de la fermentación con la adición de arginina, y peor comportamiento cuando se empleó amonio (Gutiérrez y cols., 2012). Nuestros resultados son iguales a lo previsible en los trabajos de Gutiérrez y cols. (2012 y 2013). Las cepas estudiadas respondieron diferente al shock térmico dependiendo de la nutrición. Siendo PDM más dependiente de la nutrición nitrogenada que ARM. La dependencia de PDM se manifiesta en la cinética fermentativa y en el análisis de la viabilidad y vitalidad de las levaduras durante las fermentaciones. Por otro lado, la respuesta a los shocks térmicos de ARM no muestra grandes diferencias entre los tratamientos nutridos y no nutridos, debido a su menor demanda de nitrógeno. Por lo que, consideramos que la levadura ARM no necesitaría ser nutrida con DAP.

Pizarro y cols. (2008) observaron que las diferencias en la temperatura tienen un gran efecto en el metabolismo del nitrógeno y la respuesta al shock térmico por altas temperaturas. Se conoce que la deficiencia de nitrógeno y las altas temperaturas son dos causas que generan problemas en la cinética fermentativa (Bisson, 1999; Ancín-Azpilicueta y cols., 2012); sin embargo, ha sido poco estudiado el efecto combinado de la nutrición de los mostos y los shocks térmicos (altas temperaturas). En otro estudio se ha analizado la relación de las elevadas temperaturas y el consumo de compuestos nitrogenados. En este caso, se ha observado que el consumo de estos compuestos es menor cuando la fermentación es conducida a 35°C. Esto podría deberse al efecto de la temperatura elevada sobre la bicapa lipídica, ya que las permeasas encargadas de internalizar a los compuestos nitrogenados al citoplasma son altamente sensibles al calor. De esta forma, las altas temperaturas conllevan a un menor consumo de nitrógeno (Ancín-Azpilicueta y cols., 2012). Se ha estudiado que la cinética fermentativa se encuentra relacionada directamente a la concentración de nitrógeno del mosto (Varela y cols., 2004). Además se conoce que las causas de las fermentaciones lentas y detenidas pueden ser multifactoriales (Malherbe y cols., 2007). En nuestro trabajo, la nutrición de los mostos se realizó 3 horas antes de iniciado los shocks térmicos. Siendo nuestros resultados coincidentes con la tendencia antes descrita; debido a que ambas levaduras mostraron enlentecimiento en la cinética de fermentación ante el shock térmico de 40°C. Este enlentecimiento podría ser provocado por la disminución del consumo de compuestos nitrogenados a la largo de la fermentación a causa del incremento de la temperatura, además este efecto sería incrementado por las altas temperaturas *per se*.

Conforme avanza la fermentación, las levaduras se enfrentan a un medio hostil por el agotamiento de los nutrientes, el aumento de la concentración de etanol, la disminución del pH y de la relación glucosa/fructosa, entre las más importantes (Ribéreau-Gayon y cols., 2006). Este medio obliga a las levaduras a adaptarse. Si la magnitud del estrés supera la capacidad de adaptación de las levaduras, ésta priorizará mantenerse viable a fermentar (lo que incrementaría la hostilidad del medio) conduciendo a una parada de fermentación (Bisson, 2005). Por lo que, reviste importancia conocer el estado fisiológico de la levadura a lo largo de la fermentación mediante técnicas que nos permitan evaluar su viabilidad y la vitalidad. Siendo la citometría de flujo asociada a las tinciones con fluoróforos una técnica que en pocos minutos puede revelarnos el estado fisiológico de las levaduras en suspensión responsables de la fermentación alcohólica (Login y cols., 2017). Por otro lado, otros autores observaron que la viabilidad (integridad de membrana celular) no disminuye durante los primeros 11 días de fermentación alcohólica; la viabilidad fue analizada por citometría de flujo asociada a la tinción con IP y se utilizó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* T73 de Lallemand (Lerena y cols., 2016). Además, se conoce que durante las paradas de fermentación, las levaduras pueden mantenerse altamente viables, por lo que el consumo de azúcares continúa aunque a una velocidad muy reducida (Bisson, 2005). En este estudio, se evaluó el efecto del shock térmico y la nutrición sobre la viabilidad y vitalidad de las levaduras, mediante el uso de la citometría. En nuestro caso se pudo observar que las respuestas de las levaduras en las fermentaciones control fueron parecidas a lo descrito anteriormente. En las fermentaciones control, se observó que la viabilidad, y en menor

porcentaje la vitalidad, permanece constante al menos los primeros 7 días de análisis, independientemente de la cepa y la nutrición. Mientras que las fermentaciones sometidas a los shocks térmicos evidenciaron una disminución en la viabilidad y vitalidad de las levaduras; dependiendo de la temperatura del shock térmico, la cepa y la nutrición. Del mismo modo, fue predecible que las dos cepas mostrarán diferencias en la viabilidad y vitalidad dependiendo de la nutrición, ya que la levadura PDM es más demandante de nitrógeno (Gutiérrez y cols., 2012).

Al usar los fluoróforos IP y CFDA asociados al análisis por citometría de flujo, podemos llegar a conocer las poblaciones viables y vitales; y la diferencia de las mismas nos representará las poblaciones de levaduras viables no cultivables (VNC). Mientras que el recuento en placa de las unidades formadoras de colonia (UFC) nos permite conocer solo las poblaciones viables, aquellas que son capaces de multiplicarse. Por lo que, en nuestro estudio, se evidenció que el análisis de viabilidad presenta una similar tendencia entre la medida por citometría de flujo y por recuento en placa.

Curiosamente, en nuestro estudio, se observó que el efecto inmediatamente después del shock térmico (día 5) a 40°C provoca una mayor disminución de la viabilidad y vitalidad de las fermentaciones nutridas; sin embargo, las fermentaciones nutridas culminan antes que las sin nutrir. Este comportamiento puede explicarse al considerar que la nutrición de los mostos fomenta la producción de biomasa (Varela y cols., 2004), por lo que la fase exponencial se extendería por más tiempo. Mientras que las levaduras no nutridas al momento de realizarse el shock térmico, se encuentran iniciando la fase estacionaria. Esto significaría que las dos poblaciones de levaduras (con y sin nutrición) se encontrarían en diferentes fases del crecimiento. Además, se ha descrito que las levaduras son particularmente sensibles al calor en su fase exponencial, y cuando la temperatura supera los 30°C aproximadamente, las levaduras empezarían a estresarse, afectando su viabilidad, produciendo más acidez volátil durante la fermentación y siendo más propensas a una parada de fermentación (Ribéreau-Gayon y cols., 2006).

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo demuestra que una elevación de la temperatura en estadios tempranos de la fermentación tiene consecuencias sobre la viabilidad y vitalidad de las levaduras y en la cinética fermentativa. Este efecto es dependiente de la magnitud del aumento térmico, la nutrición de los mostos y de la cepa que este fermentando. Los shocks térmicos generaron enlentecimientos en la cinética fermentativa de hasta 36 días, que podrían considerarse paradas de la fermentación, si bien las levaduras fueron capaces de finalizar la fermentación, el tiempo de espera es demasiado largo para la industria, la cual seguramente iniciaría acciones de reactivación de la fermentación con anterioridad.

El efecto combinado del shock térmico y la nutrición fue estudiado, y se observó que el efecto de la nutrición de los mostos depende de la demanda de nitrógeno de cada levadura. Es importante conocer la concentración de nitrógeno inicial y la cepa utilizada, para evaluar la concentración adecuada a nutrir. La nutrición permite a las fermentaciones sometidas a un shock térmico, culminar antes que una fermentación sin nutrición.

El equipo de trabajo espera ampliar el estudio del efecto del shock térmico en las fermentaciones alcohólicas, comparando más cepas enológicas. Previamente, se prevé conocer la demanda de nitrógeno, la adecuada fuente y concentración de nitrógeno para cada cepa. Además, conocer el efecto del shock térmico en la expresión de genes y así determinar posibles marcadores para identificar previamente una fermentación con riesgo de parada o enlentecimiento de fermentación.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado en el grupo de investigación Biotecnología Enológica de la Universidad Rovira i Virgili a quienes se les agradece la disposición.

BIBLIOGRAFIA

Agrovin (2014). Ficha Técnica levadura PDM viniform, seguridad fermentativa y toma de espuma, EP 834 Rev.:1.

Agrovin (2016). Ficha técnica levadura viniform FLORA, EP 836 Rev.:3.

Ancín-Azpilicueta C., Barriuso-Esteban B., Nieto-Rojo R., & Aristizábal-López N. (2012). SO₂ protects the amino nitrogen metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under thermal stress. *Microbial Biotechnology*, 5(5), 654-662.

Beltran G., Esteve-Zarzoso B., Rozes N., Mas A., & Guillamon J.M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 996–1002.

Bisson L. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal Enology Viticulture*, 50, 107-109.

Bisson L. (2005). Fermentaciones ralentizadas o detenidas. *Revista de internet de viticultura y enología*. 10(2), 1-16. www.infowine.com

Blateyron L., & Sablayrolles J. M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 184–189.

Cavazza A., Poznanski E., & Trioli G. (2004). Restart of Fermentations of Simulated Stuck Wines by Direct Inoculation of Active Dry Yeasts. *American Journal Enology Viticulture*, 55, 160-167.

Chan L.L., Kury A., Wilkinson A., Berkes C., & Pirani A. (2012). Novel image cytometric method for detection of physiological and metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 1615-1623.

Coulter A. (2008). Vintage 2008 – A heat wave and stuck fermentation. AWRI Technical Review, 175, 14-23.

Díaz M., Herrero M., García L., & Quirós C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 385-407.

Emparán M., Simpson R., Almonacid S., Teixeira A., & Urtubia A. (2012). Early recognition of problematic wine fermentations through multivariate data analyses. *Food Control*, 27, 248-253.

Gutiérrez A., Chiva R., Beltran G., Mas A., & Guillamon J.M. (2013). Biomarkers for detecting nitrogen deficiency during alcoholic fermentation in different commercial wine yeast strains. *Food Microbiology*, 34, 227-237.

Gutiérrez A., Chiva R., Sancho M., Beltran G., Arroyo-López F.N. & Guillamon J.M. (2012). Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiology*, 31, 25-32.

Guzzon R. & Larcher R. (2015). The application of flow cytometry in microbiological monitoring during winemaking: two case studies. *Annals of Microbiology*, 65, 4, 1865–1878.

Hewitt C.J. & Nebe-Von-Caron G. (2001). An Industrial Application of Multiparameter Flow Cytometry: Assessment of Cell Physiological State and Its Application to the Study of Microbial Fermentations. *Cytometry*, 44(3),179-87.

Lerena M.C., Vargas Trinidad A., Mercado L.A., Sturm M. E., & Combina M. (2016). Application of flow cytometry in the monitoring of populations of yeasts during alcoholic fermentations. *Libro de Resúmenes del 39° Congreso Mundial de la Vña y el Vino* (pp. 452-454). Río Grande del Sur.

Login C., Petitgonnet C., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2017). Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology*, 62, 221-231.

Lonvaud-Funel A., (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, 317–331.

Maisonnave P., Sanchez I., Moine V., Dequin S., & Galeote V. (2013). Stuck fermentation: development of a synthetic stuck wine and study of a restart procedure. *International Journal of Food Microbiology*, 163 (2-3), 239-47.

Malherbe S., Bauer, F., & Du Toit, & M. (2007). Understanding Problem Fermentations – A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 28(2), 169-186.

Martínez-Moreno R., Morales P., Gonzalez R., Mas A., & Beltran G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Research*, 12, 477-485.

Pizarro F., Jewett M., Nielsen J., & Agosin E. (2008). Growth Temperature Exerts Differential Physiological and Transcriptional Responses in Laboratory and Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6358-6368.

Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B., & Lonvaud A. (2006). Cytology, taxonomy and ecology of grape and wine yeasts. En: *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications* (pp. 1–52), Segunda edición. Chichester: John Wiley& Sons Ltd.

Riou C., Nicaud J.M., Barre P., & Gaillardin C. (1997). Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast*, 13, 903-915.

Sablayrolles J.M., Dubois C., Manginot C., Roustan J.L. & Barre P. (1996). Effectiveness of Combined Ammoniacal Nitrogen and Oxygen Additions for Completion of Sluggish and Stuck Wine Fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(4), 377-381.

Urtubia A., Hernández G., & Roger J.M. (2012). Detection of abnormal fermentations in wine process by multivariate statistics and pattern recognition techniques. *Journal of Biotechnology*, 159, 336-341.

Varela C., Pizarro F., & Agosin E. (2004). Biomass Content Governs Fermentation Rate in Nitrogen-Deficient Wine Musts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3392-400.

Zhang T. & Fang H. (2004). Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using BacLight. *Biotechnology Letters*, 26, 989-992.