

Caracterización del magnesio en el desempeño organoléptico de una levadura vínica

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

AUTOR: IÑIGO IRUSTA RICART

**DIRIGIDO POR: RICARDO ROMÁN CORDERO OTERO
MONTSE POBLET**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TARRAGONA
SEPTIEMBRE DE 2018

RESUMEN

Existe un debate no resuelto sobre el papel del magnesio como regulador de las funciones biológicas en el metabolismo de las levaduras, en oposición al papel bien conocido del calcio. Los hallazgos realizados hasta ahora asignan un papel cada vez más complejo e importante al magnesio ya que su disponibilidad en el cultivo celular y los medios de fermentación puede influir en el crecimiento y el metabolismo de las células. Revisado varios ensayos de fermentación con diferentes levaduras vínicas para, cuantificar y destacar los importantes roles desempeñados por el magnesio y su antagonismo con el calcio. En este trabajo ponemos en evidencia que el efecto del magnesio es cepa dependiente, actuando en la cinética fermentativa y en la producción de metabolitos celulares. Participando de esta manera en un nuevo punto de vista biotecnológico de las levaduras vínicas.

Palabras clave: Papel del magnesio, Fermentación, Crecimiento, Metabolitos, Levaduras vínicas,

ABSTRACT

There is an unresolved debate about the role of magnesium as a regulator of biological functions in the metabolism of yeast, as opposed to the well-known role of calcium. The findings so far assign an increasingly complex and important role to magnesium since its availability in cell culture and fermentation media can influence the growth and metabolism of cells. The reviewed several trials of fermentation with different wine yeasts highlights the important roles played by magnesium and its antagonism with calcium. In this work, we show that the effect of magnesium is dependent strain, acting on the fermentative kinetics and in the production of cellular metabolites. Participating in this way, in a new biotechnological point of view of wine yeasts.

Keywords: Role of magnesium, Fermentation, Growth, Metabolites, Wine yeasts

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Nutrición mineral	4
1.2. Magnesio.....	6
1.2.1. El magnesio en la fermentación alcohólica	8
1.2.2. Metabolitos	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Estudio iónico	12
2.2. Cepas de levadura y condiciones de crecimiento.....	12
2.3. Condiciones de fermentación.....	13
2.4. Análisis de los principales productos de fermentación	13
2.5. Determinación de los ácidos grasos	14
2.6. Análisis de sustancias volátiles	14
2.7. Análisis estadístico	15
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
3.1. Detección de iones	16
3.2. Crecimiento de levadura	17
3.3. Rendimiento de fermentación	18
3.4. Principales productos de fermentación.....	19
3.5. Composición en ácidos grasos de las células de levadura.....	20
3.6. Compuestos aromáticos	21
4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	23
5. BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nutrición mineral

Los nutrientes minerales son elementos químicos esenciales para el crecimiento y la vitalidad de la célula de levadura y en los últimos años ha aumentado el interés sobre el papel que juegan. Estos nutrientes minerales, aunque en concentraciones micromolares, son activadores y moduladores esenciales de numerosas actividades biológicas fundamentales para el rendimiento y la supervivencia de la levadura, aunque un exceso pueda resultar tóxico (Udeh y Kgatla, 2013). Por ejemplo, las células de levadura necesitan metales para mantener su integridad estructural, las interacciones célula-célula, la expresión génica, la división y el crecimiento celular, los mecanismos de absorción de nutrientes, la acción enzimática en el metabolismo, la osmorregulación y el mantenimiento de energía y supervivencia celular. Además, las células de levadura necesitan los metales como protectores del estrés ambiental. En la Tabla 1 se detallan los metales y sus concentraciones requeridas para el crecimiento celular y la reproducción de *Saccharomyces cerevisiae*. Las cifras citadas son aproximadas ya que los requisitos precisos de metal diferirán dependiendo de las condiciones de cultivo.

Tabla 1. Metales requeridos por de la levadura *S. cerevisiae* 1118

Iones metálicos	Concentración suministrada al medio de crecimiento	Funciones celulares principales
Macroelementos		
K	2-4 mM	Osmorregulación, actividad enzimática
Mg	2-4 mM	Actividad enzimática, división celular
Microelementos		
Mn	2-4 µM	Cofactor enzimático
Ca	<1 µM	Mensajero secundario, floculación de la levadura
Cu	1.5 µM	Pigmentos redox
Fe	1-3 µM	Hemoproteínas, citocromos
Zn	4-8 µM	Actividad enzimática, estructura proteica
Ni	~10 µM	Actividad ureasa
Mo	1.5 µM	Metabolismo del nitrato, vitamina B12
Co	0.1 µM	Cobalamina, coenzimas

El potasio, el magnesio, el calcio y el zinc son nutrientes catiónicos que desempeñan funciones estructurales y esenciales en las células de levadura y son particularmente importantes en los procesos de fermentación. El magnesio es el catión divalente intracelular más abundante en todas las células vivas y es absolutamente esencial para el crecimiento de la levadura. Las células deficientes en magnesio no completarán la

mitosis, y ningún otro metal puede sustituirle en esta función. Desde hace tiempo se le atribuye al calcio un papel fundamental como segundo mensajero de estímulos externos en células eucariotas. Cambios mínimos en las concentraciones de calcio intracelular desencadenan en el inicio de eventos clave tales como la mitosis. Sin embargo, estos cambios en el calcio son extremadamente pequeños, y los niveles de calcio libre intracelular se mantienen a niveles muy bajos ($\leq$ micromolares). Esto, a su vez, significa que los requisitos de calcio para la división celular y el crecimiento también son muy bajos. Para el crecimiento de la levadura, deberíamos considerar el calcio como un metal traza. El calcio se une a las paredes celulares de la levadura y juega un papel clave en la floculación, que es importante en las fermentaciones de elaboración de la cerveza. El calcio también antagoniza la absorción de magnesio y puede bloquear los procesos metabólicos esenciales dependientes del magnesio (Walker, 2004). La relación entre el calcio y el magnesio es compleja y una propuesta para explicar su antagonismo biológico es que el calcio supera al magnesio en afinidad por la unión al ATP y a los ácidos nucleicos. La relevancia fisiológica de esta propuesta es cuestionada debido a que los niveles de ion Mg^{2+} intracelular son superiores a los de Ca^{2+} . En particular, niveles altos de Ca^{2+} puede inhibir la unión de la superficie celular y la membrana transporte de Mg^{2+} y adicionalmente puede inhibir Actividad de ATPasa dependiente de magnesio, que es la principal fuerza motriz para la translocación de nutrientes y la célula posterior crecimiento. Las células simplemente no necesitan altos niveles de Ca^{2+} para crecer. De hecho, los niveles altos pueden ser seriamente perjudicial para el crecimiento celular y la cultura viabilidad. Por otra parte, se ha sugerido que una de las principales funciones biológicas del magnesio es modular la unión y la actividad del calcio. Además, en relación con las concentraciones de estos iones, la relación entre magnesio y calcio en los procesos de fermentación debe garantizar que los niveles de magnesio sean lo suficientemente altos para prevenir su posible déficit y que los niveles de calcio sean lo suficientemente bajos para evitar la competencia con el magnesio. Los medios de laboratorio generalmente presentan una relación suficientemente alta de Mg:Ca, pero desafortunadamente, muchos medios de fermentación industrial pueden tener un equilibrio incorrecto de magnesio y calcio, con relaciones de concentración relativa más favorables al calcio, lo cual resulta en una fermentación poco eficiente. Del mismo modo, en fermentaciones de mosto de malta, se ha demostrado que no hay magnesio libre disponible para la levadura, tal vez debido a la ya mencionada presencia de iones Ca^{2+} que reduce la capacidad de las levaduras para absorber y utilizar

magnesio. Por otra parte, también se han observado estos efectos perjudiciales en fermentaciones de glucosa. Pueden realizarse tres enfoques para contrarrestar los efectos inhibidores del exceso Ca^{2+} encontrado comúnmente en los medios de fermentación: quelación específica, precipitación después de la acidificación (como CaSO_4 insoluble) o suplementos de ion Mg^{2+} para elevar la relación Mg:Ca (Walker, 1994).

Otros oligoelementos como el hierro, zinc, níquel, cobre, cobalto, manganeso y molibdeno se requieren como estabilizadores estructurales en metaloenzimas, pigmentos redox, hemoproteínas y vitaminas, y, como cofactores esenciales. Algunos de estos metales, como es el caso del zinc, se unen a sitios activos catalíticos de los enzimas. En las fermentaciones alcohólicas, el zinc es particularmente importante por su papel como activador de la Zn-metaloenzima etanol deshidrogenasa alcohólica terminal. Los medios deficientes en zinc pueden conducir a fermentaciones lentas o incompletas, y esto se ha reconocido durante mucho tiempo como un problema en la industria cervecera (Walker, 2004).

La nutrición mineral de las levaduras es de vital importancia, comprendiendo el pre-acondicionamiento de las células a medios ricos en metales o bien la suplementación del medio de fermentación con metales. Para comprender este proceso de nutrición, se requiere del estudio de la homeostasis de los metales, su papel en la fisiología celular e influencia en los procesos de fermentación (Udeh y Kgatla, 2013).

1.2. Magnesio

El magnesio es el segundo elemento más abundante en las células, siendo superado únicamente por el potasio (Walker, 2004). Este metal constituye aproximadamente el 0.3% del peso seco de la levadura y su rol fisiológico intracelular es de cofactor para más de 300 enzimas de vías metabólicas y bioenergéticas, y para mantener la integridad estructural de las membranas en células y orgánulos (Walker, 1994, Walker, 2004). El mantenimiento de la integridad celular incluye la estabilización de las estructuras de ácidos nucleicos, polinucleótidos, cromosomas, polisacáridos y lípidos (Udeh y Kgatla, 2013).

Se ha reconocido a nivel mundial que la privación de magnesio en la mayoría de las células vivas conlleva a la pérdida del estado conformacional de la célula (Walker, 1994) lo cual implica que el metal tiene una importante función estructural. Además, la dependencia estricta de magnesio por parte de las enzimas de transferencia de fosfato,

particularmente las que involucran ATP, y de las enzimas que participan en la síntesis, expresión y traducción de información genética, hacen resaltar la esencialidad biológica de este metal (Walker, 2004). El magnesio también está implicado en el metabolismo de los lípidos, donde influye en la actividad de la lipoproteína lipasa. Teniendo en cuenta las diversas funciones de los iones de Mg^{2+} en la fisiología de la levadura, es de primordial importancia comprender su regulación u homeostasis, que incluye la localización, compartimentación, secuestro y la posterior liberación del ion metálico por proteínas de transporte de membrana específicas presentes en orgánulos intracelulares de las levaduras. Esta regulación que se cree independiente de la energía metabólica se produce en dos fases: la quimisorción y la bioacumulación (Udeh y Kgatla, 2013). La quimisorción de magnesio, que es la primera fase de su captación o transporte, depende de la aptitud fisiológica de la pared celular de la levadura. Esta consiste principalmente en β -1,3 glucano, manoproteínas, β -1,6-glucano y quitina que sirven como sitio de unión para el magnesio debido a la presencia de grupos aniónicos presentes en la capa externa de la pared celular. En condiciones de agotamiento, los iones Mg^{2+} se unen activamente a los grupos aniónicos y posteriormente se internalizan por la acción de las proteínas de transporte cargadas negativamente (ALR1 y ALR2) (Udeh y Kgatla, 2013). La bioacumulación es la segunda fase del transporte de magnesio e implica su absorción través de la pared celular y las membranas citoplasmáticas en el citosol de la célula de levadura. Las membranas de las levaduras: plasmáticas, mitocondriales y, las más importantes, las vacuolares; constituyen para el magnesio reservorios regulados mediante transportadores. La acumulación intracelular de magnesio está principalmente mediada por las principales proteínas de transporte de Mg^{2+} , Alr1p y Alr2p, que están codificadas por los genes *ALR1* y *ALR2*. Estas proteínas de membrana se expresan a baja concentración de iones Mg^{2+} en la pared celular.

Los iones Mg^{2+} generalmente son secuestrados por polifosfatos intracelulares, ARN y ATP, dejando una cantidad mínima de iones de Mg^{2+} en forma libre, disponibles para procesos bioquímicos tales como activación enzimática, regulación del pH intracelular, osmorregulación, vías de transducción de señales y estabilización de proteínas y membranas (Udeh y Kgatla, 2013). La constancia de los niveles de ion Mg^{2+} citosólico en levaduras se mantiene principalmente a través de un sistema de acumulación vacuolar. En levaduras el magnesio se halla en concentraciones 30 veces superiores en las vacuolas respecto al citoplasma.

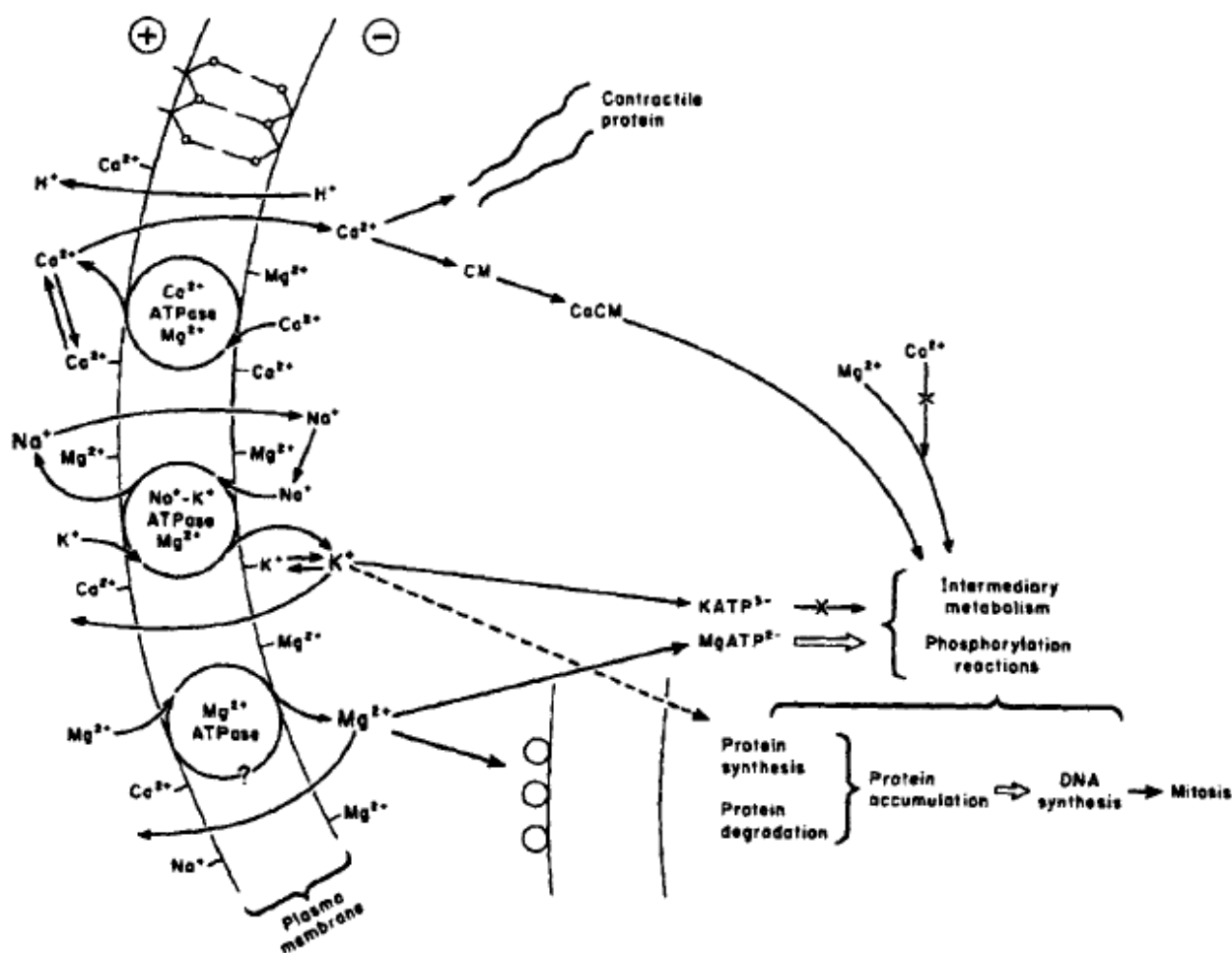


Figura 1. Modelo para el papel de Mg^{2+} y Ca^{2+} en la regulación del metabolismo celular y la proliferación (Walker, 1994)

1.2.1. El magnesio en la fermentación alcohólica

Como se ha mencionado anteriormente, hasta ahora se le ha prestado poca atención al magnesio a pesar de ser un elemento de vital importancia en la nutrición de microorganismos industriales y de tiene un gran papel en los procesos de fermentación. Todavía no está del todo claro, por ejemplo, si las materias primas de fermentación industrial están totalmente optimizadas en términos de su composición de iones metálicos a pesar de que su presencia está estrechamente relacionada con la fermentación (Walker, 1994). Para el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos primarios, el magnesio suministrado en concentraciones milimolares actúa de una manera generalmente beneficiosa. Esto se debe a las altas demandas de este metal para el crecimiento celular y para la actividad de numerosos enzimas tales como: piruvato quinasa, la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa, la fosfoglicerato quinasa y la enolasa, las cuales muestran un requerimiento absoluto de iones de magnesio (Udeh y

Kgatla, 2013). Además, también tiene un papel fundamental en las vías metabólicas de las células como por ejemplo la glucólisis, una ruta catabólica común en muchas fermentaciones, la cual no funcionaría sin el suficiente magnesio disponible (Walker, 2004). También se ha relacionado un rango estrecho y constante de cantidades de magnesio con un aumento de la tasa de fermentación y producción de etanol por las levaduras alcanzándose un mayor rendimiento en condiciones oxigenadas (Udeh y Kgatla, 2013). La insuficiencia de magnesio se ha relacionado con la sobreproducción de ciertos metabolitos durante las fermentaciones y, por el contrario, la adición de magnesio también puede estimular la producción de metabolitos (Walker, 1994).

1.2.2. Metabolitos

Ácidos grasos

La mayor parte de lípidos que constituyen la membrana de las levaduras, son los ácidos grasos, fosfolípidos, esteroides y esfingolípidos. En todos los tipos de células, los lípidos neutros son necesarios para la formación de la membrana y, además, sirven como reserva de energía. La fosfatidilcolina es el principal constituyente lipídico del sistema endomembranoso en *S. cerevisiae*, y constituye hasta el 33% de los fosfolípidos totales (Rodríguez-Porrata et al., 2010). En *S. cerevisiae* la síntesis de ácidos grasos insaturados y ergosterol requieren oxígeno (Borrull et al., 2016). En cuanto a las funciones de reserva de los lípidos, *S. cerevisiae* sintetiza triacilglicérol y ésteres de éster y se almacenan en partículas de monocapa de fosfolipidoproteína (Rodríguez-Porrata et al., 2010).

Las levaduras están sometidas a condiciones muy estresantes cuando se fermenta el mosto de uva y se requiere un esfuerzo extra por parte de las células para su supervivencia y realizar la fermentación. El medio sufre cambios; los niveles de etanol y otros sustratos secundarios, como los ácidos grasos de cadena media, aumentan, mientras que por otra parte disminuyen el contenido de nutrientes y los niveles de nitrógeno. Los principales ácidos grasos de cadena media, octanoico (C8) y decanoico (C10), son producidos durante la fermentación alcohólica bajo condiciones hipóxicas por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estos subproductos de la síntesis de lípidos son tóxicos por sí mismos y se consideran inhibidores de la fermentación en presencia de etanol a pH ácido (Borrull et al., 2015).

El magnesio juega un papel muy importante en la biosíntesis de lípidos y también interviene en el mantenimiento de la integridad celular al estabilizar las estructuras lipídicas. En relación con esto último, el magnesio influye en la tolerancia de las células de levadura al etanol actuando sobre fosfolípidos y esteroides (Walker, 1994).

Sustancias volátiles

El vino es una mezcla química y biológica compleja en la que los microorganismos desempeñan un papel fundamental. La química del sabor de la uva y el vino ha sido ampliamente estudiada a fin de analizar los numerosos compuestos volátiles que contribuyen al aroma. El sabor del vino comprende los atributos visuales, el gusto y el aroma (olor), siendo este último el principal contribuyente a la percepción general del sabor. Dependiendo de su origen los compuestos aromáticos del vino se pueden dividir en: uva (aromas varietales o primarios), fermentaciones alcohólica y maloláctica (aromas fermentativos o secundarios) y condiciones de almacenamiento y envejecimiento y (aromas de envejecimiento o terciarios). Los principales componentes de aroma de fermentación son etanol, alcoholes superiores y ésteres. Las vías que conducen a la formación de compuestos que contribuyen al sabor general del vino, como la vía de Ehrlich para alcoholes superiores, o las enzimas responsables de la formación de ésteres, se han estudiado principalmente en especies del género *Saccharomyces*. La fermentación del vino va acompañada de la formación de los alcoholes alifáticos y aromáticos conocidos como alcoholes superiores. Los principales alcoholes alifáticos incluyen propanol, alcohol isoamílico, isobutanol y alcohol amílico activo; y los principales alcoholes aromáticos consisten en alcohol 2-feniletílico y tirosol. Las concentraciones totales de alcohol más altas oscilan entre 140 y 420 mg/L, donde las concentraciones por debajo de 300 mg/L aportan un nivel deseable de complejidad al vino, mientras que las concentraciones que exceden este nivel pueden tener un efecto perjudicial. Cuantitativamente, los principales alcoholes superiores en el vino son isobutanol (9,2 mg/L), feniletanol (6,1 mg/L) e isoamilalcohol (1,41 mg/L), estando los otros compuestos típicamente presentes en concentraciones por debajo de sus umbrales sensoriales. El uso de diferentes cepas de levadura para la fermentación del vino contribuye a variaciones significativas en los niveles más altos de alcohol en el vino. La concentración de aminoácidos en el mosto también influye en la producción total de alcoholes superiores, ya que los aminoácidos actúan como precursores de estos.

Los ésteres volátiles tienen un mayor impacto sobre el aroma del vino en comparación con los alcoholes superiores, aunque los ésteres están presentes en pequeñas cantidades, en órdenes de pocos mg/L, y su concentración disminuye por hidrólisis química durante el envejecimiento. Estos compuestos se perciben genéricamente como afrutados o florales. Sin embargo, si están presentes en cantidades demasiado altas, pueden enmascarar aromas varietales, disminuyendo la complejidad aromática del vino (los vinos que contienen más de 90 mg/L de acetato de etilo o 200 mg/L de ésteres totales son considerado defectuoso). Hay dos clases principales de ésteres formados en el vino: los ésteres de etilo de ácidos grasos y los ésteres de acetato de alcoholes superiores. Los ésteres etílicos se forman entre etanol y ácidos grasos o ácidos orgánicos no volátiles y contribuyen al aroma con olores que recuerdan a cera de velas o a jabón. Los ésteres de acetato que tienen mayor importancia para el aroma del vino, derivan de la conjugación de un alcohol con un ácido. Además del etanol, los alcoholes comunes que se pueden encontrar en los ésteres derivan de la degradación de aminoácidos a través de la vía Ehrlich, como se indicó anteriormente. Los más importantes son el acetato de isobutilo (aroma afrutado), el acetato de isoamilo (banana) y el acetato de 2-feniletilo (aroma floral), que resultan de la esterificación de sus correspondientes alcoholes superiores: isobutanol (derivado del aminoácido valina), alcohol isoamílico (derivado de leucina) y 2-feniletanol (derivado de fenilalanina), respectivamente. Entre los metabolitos volátiles liberados por las levaduras involucradas en el aroma del vino, también se encuentran los compuestos azufrados, que son de gran importancia por su influencia en las propiedades organolépticas del vino debido a sus umbrales de detección muy bajos. Los compuestos de azufre tienen una considerable diversidad, mostrando diferentes propiedades sensoriales dependiendo de la posición del átomo de azufre en la molécula y de su concentración. Aunque la mayoría de estos compuestos de azufre contribuyen negativamente a la calidad del vino, algunos de ellos tienen un efecto positivo sobre sus propiedades aromáticas. Estos compuestos pueden tener su origen en: el proceso no enzimático que incluye reacciones químicas (como fotoquímicas) de compuestos de azufre durante la vinificación y el almacenamiento, o bien, en el proceso enzimático que incluye las degradaciones de los aminoácidos azufrados durante la fermentación por levaduras y por bacterias lácticas (Belda et al., 2017).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Estudio iónico

Durante el estudio se han analizado los iones relevantes en mosto de uva: Fe, Cu, Mg, Na, K, Ca y Zn mediante la cuantificación de la técnica ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente). Esta técnica de análisis inorgánico que ha sido desarrollada por el servicio técnico de la Universidad Rovira i Virgili es capaz de cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica.

Las muestras utilizadas en el estudio iónico están formadas por una población de $1 \cdot 10^8$ células/mL y han sido cultivadas en medios ricos bajo condiciones aerobias no restrictivas. Una vez centrifugado el *pellet*, el sobrenadante libre de células ha sido analizado por separado.

2.2. Cepas de levadura y condiciones de crecimiento

Saccharomyces cerevisiae EC 1118 ha sido la cepa utilizada principalmente en este estudio. Sin embargo, antes de su selección se realizaron distintos ensayos con otras cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* y otras levaduras no *Saccharomyces* como *Schizosaccharomyces pombe* y *Starmerella bacillaris* utilizadas actualmente en cultivos mixtos de forma secuencial. La Tabla 2 resume las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este estudio.

Tabla 2. Listado de cepas *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Denominación en el texto
<i>S. cerevisiae</i> 1118	Sc1
<i>S. cerevisiae</i> DV10	Sc2
<i>S. cerevisiae</i> Sirah	Sc3
<i>S. cerevisiae</i> CSM	Sc4

Los experimentos de microvinificación se han llevado a cabo empleando mosto de uva sintético (MS) preparado de acuerdo con Riou et al. (1997), utilizando $\text{PO}_4(\text{NH}_4)_2$ como fuente de nitrógeno y con concentraciones variables de CaCl_2 y MgSO_4 en la solución de minerales a fin de comprobar el efecto de los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} sobre la fermentación.

2.3. Condiciones de fermentación

Las cepas de levadura se han precultivado aeróbicamente en YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa) a unas 150 rpm y 28°C durante aproximadamente 24 h hasta alcanzar la última fase exponencial. Las inoculaciones se han realizado en botellas de vidrio de 250 mL de capacidad que contienen 150 mL de medio MS y se han tapado con cierres que permiten la fuga del dióxido de carbono. Los inóculos de levadura iniciales ($1 \cdot 10^8$ células/mL) se han cultivado estáticamente a 28°C. Las fermentaciones se han realizado por quintuplicado sin agitación para cada una de las concentraciones de magnesio. El progreso de la fermentación se ha controlado diariamente mediante pesadas cada 24 h para determinar la pérdida de peso de cada una de las muestras. Una vez estabilizadas las fermentaciones, para cada condición se han seleccionado las muestras que presentan una menor desviación de pérdida de peso respecto al promedio. Las tres condiciones de magnesio que se han considerado más representativas en este estudio han sido las siguientes: 50 mg/L, 150 mg/L, que fue seleccionada como condición óptima, y 250 mg/L. A continuación, las muestras seleccionadas para cada condición, han sido homogenizadas por agitación y, mediante el uso de un densímetro, se da por finalizado el proceso de fermentación en aquellas muestras de vino cuya densidad es inferior a 1 (g/L). La centrifugación posterior ha permitido recoger por un lado los sobrenadantes libres de células para el análisis de los principales productos de fermentación y compuestos de aroma, y, por otro lado, las células de levadura, que han sido utilizadas para el análisis de ácidos grasos intracelulares.

2.4. Análisis de los principales productos de fermentación

Las concentraciones de los principales productos de fermentación, glucosa, fructosa, etanol, glicerol, ácido málico, ácido de cítrico, ácido acético, ácido láctico y ácido succínico se han determinado por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, serie 1200, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.) usando dos columnas HPLC (Hi-Plex H; 8.0 mm ID X 300 mmL; Showa Denko Europe GmbH Munich). El índice de flujo de fase móvil de 0.6 mL/min se ha logrado con un gradiente de elución compuesto de 5 mmol/L de H_2SO_4 en agua. El volumen de inyección para todas las sustancias ha sido de 100 μ L. La temperatura de la columna durante la separación ha sido de 60°C siendo utilizados los detectores de Ultra Violeta (UV Agilent Infinity

Diode Array Detector) y de Índice Refractivo (RID Agilent 1200 Infinity). El tiempo de análisis total ha sido de 42 min. Para la determinación de glucosa, fructosa, glicerol, ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico y alcohol se ha empleado el detector de índice de refracción (RID) y para la determinación del ácido málico y del ácido láctico se ha empleado el detector de Ultra Violeta (UV)

2.5. Determinación de los ácidos grasos

El análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos se ha realizado utilizando una versión modificada del método reportado por Borrell et al. (2015). Las muestras de células de levadura fueron almacenadas y congeladas, a fin de minimizar su oxidación y degradación hasta que estuvieron listas para la extracción. A un *pellet* de levaduras de $1 \cdot 10^8$ células previamente descongelado, se le han agregado 1 mL de HCl 1.25N en metanol y 10 μ L de ácido heptanoico (C7, 1 g/L) y ácido heptadecanoico (C17, 4 g/L) en tubos de cristal con las células. Las muestras se han calentado a 90°C durante 60 minutos y luego se han enfriado a temperatura ambiente. Después de enfriar, se han añadido 1 mL de NaCl al 0,9% (p/v) en agua y 300 μ L de hexano. La extracción se ha repetido dos veces. Entre cada fase de extracción, los tubos se han centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos para permitir la mejor separación de fases.

La cromatografía de gases (CG) analítica se ha llevado a cabo en un Agilent 5890 conectado a una computadora HP Vectra con el software ChemStation (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). El extracto (2 μ L) se ha inyectado (sin separación, 0,75 min) en una columna FFAP-HP de 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m de espesor de fase (Agilent) con un inyector automático (Agilent). El programa de temperatura ha sido de 100°C a 240°C (5 min) a 4°C/min. Las temperaturas del inyector y del detector han sido de 220°C y 250°C, respectivamente. El gas portador ha sido helio a 1,2 mL/min. Se han calculado las cantidades relativas de los ácidos grasos dados a partir de sus respectivas áreas de los picos cromatográficos después de la normalización con estándares internos (C7 o C17).

2.6. Análisis de sustancias volátiles

El procedimiento de extracción y separación de los compuestos volátiles es una modificación del método de Ortega et al. (2001). A 10 mL de las muestras de vino se han añadido 2,5 g de (NH₄)₂SO₄, 40 μ L de 4-methyl-2-pentanol (800 ppm) y ácido

heptanoico (700 ppm) disuelto en etanol (patrones internos) y 0,4 mL de diclorometano. Las muestras han sido agitadas a 60 rpm durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de ser centrifugadas, se ha extraído la fase inferior de diclorometano y se ha inyectado el extracto (2 µL) en modo split (10:1, 30 mL/min) en el cromatógrafo (Agilent Technologies, Böblingen, Germany). Las sustancias han sido separadas en una columna HP-FFAP (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm de espesor, Agilent) según el programa de temperatura y tiempo siguiente: temperatura inicial 35°C durante 5 minutos, después subida de la temperatura a 3°C por minuto hasta 200°C. Las temperaturas del inyector y detector han sido de 180 y 220°C respectivamente. El gas transportador ha sido helio a 3 mL/min y la detección de las sustancias se ha realizado en modo FID (Flame Ionization Detection).

Los compuestos volátiles han sido identificados y cuantificados por comparación con estándares. La concentración de cada compuesto se ha realizado de la manera siguiente:

$$\text{Concentración compuesto} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Área del compuesto en la muestra}}{\text{Área del Patrón interno en la muestra}} \cdot K$$

Con $K = \text{Concentración compuesto en solución de referencia}$

$$\cdot \frac{\text{Área patrón interno en solución de referencia}}{\text{Área compuesto en solución de referencia}}$$

2.7. Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en el análisis de las diferencias entre compuestos volátiles y no volátiles se ha utilizado el análisis de la varianza (ANOVA, método de diferencia mínima significativa en un nivel de significancia de $P \leq 0.05$) a través del programa Excel versión 2007 (Microsoft Corporation, EEUU.) y el complemento Realstats 2007 (Real Statistics).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Detección de iones

En los sobrenadantes se observa un incremento de iones respecto a las cantidades de partida lo cual significa que las levaduras no han necesitado iones del medio, y, por lo tanto, este aporte de iones podría provenir de la propia membrana celular o bien, del medio residual (precultivo). Para certificar la procedencia de estos iones se han realizado ensayos bajo condiciones anaeróbicas de fermentación. Se analizarán los resultados de estos ensayos posteriormente.

Tabla 3. Concentraciones de iones detectados en el mosto con el ICP

Concentración (mg/L)	Mg	Na	K	Ca	Zn
<i>S. cerevisiae</i>	19,31	>1248,36	108,16	26,12	2,3
<i>Schiz. pombe</i>	23,72	> 1286,80	165,59	18,65	0,59
<i>Starmerella bacillaris</i>	23,26	> 1290,10	183,84	19,45	0,72

La Tabla 3 muestra las concentraciones de los diferentes iones estudiados. En el ICP no se han detectado los iones de Fe y Cu ya que presentan concentraciones inferiores a 3 µg/L, consideradas como inexistentes o indetectables dada la sensibilidad del aparato de medición y, posiblemente, serian necesarias concentraciones de biomasa superiores a las $1 \cdot 10^8$ células/mL utilizadas en este estudio para su detección. Para el resto de iones (Mg, Na, K, Ca, y Zn), se ha optado por centrar este estudio solamente en el calcio y el magnesio por su relación antagonista durante el proceso de fermentación. Por otra parte los resultados muestran que las especies de levadura estudiadas tienen distinta carga iónica debido seguramente a sus diferencias en la composición de su citoplasma y sus requerimientos iónicos. Dado su uso más extendido en las fermentaciones ha sido *Saccharomyces cerevisiae* la cepa seleccionada y empleada en los ensayos.

3.2. Crecimiento de levadura

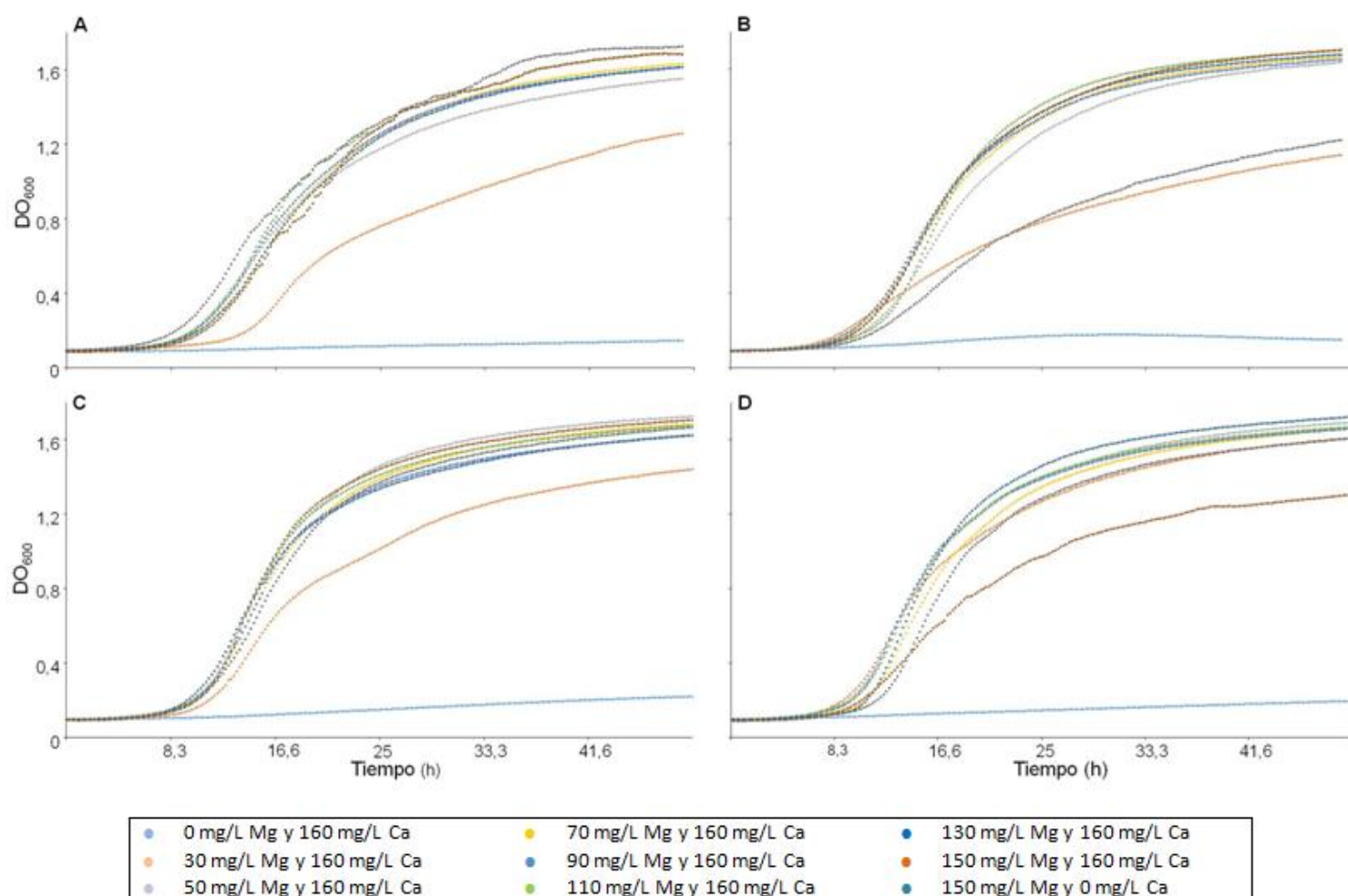


Figura 2. A, Sc1; B, Sc2; C, Sc3; D, Sc4; OD 600, densidad óptica

En la Figura 2 muestra las diferencias de crecimiento entre cuatro cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* en relación al aporte iónico en el medio de cultivo. Con una concentración constante de calcio (excepto una condición sin su aporte), las variaciones en las concentraciones de magnesio influyen significativamente sobre el crecimiento de las levaduras. En ausencia total de magnesio el crecimiento de las diferentes cepas es casi despreciable. Con la adición de 30 mg/L de magnesio, la concentración mínima añadida de este ion, pese observarse un crecimiento exponencial de las cuatro cepas, este es inferior respecto al observado con la adición de cantidades superiores de magnesio para las cepas Sc1, Sc2 y Sc3. Por otro lado, concentraciones de 150 mg/L de magnesio favorecen el crecimiento de todas las cepas con la excepción la levadura Sc4 cuyo crecimiento se ve reducido en estas condiciones.

La ausencia total de calcio afecta de manera diferente al crecimiento de las levaduras, sobre todo si se comparan las cepas Sc1 y Sc2. Mientras que la primera no parece verse

afectada por la ausencia de este ion, la cepa Sc2, en cambio, ve reducido su crecimiento de forma significativa.

3.3. Rendimiento de fermentación

La producción de dióxido de carbono durante las fermentaciones varia en relación a la cantidad de magnesio presente en las muestras inoculadas con la cepa Sc1.

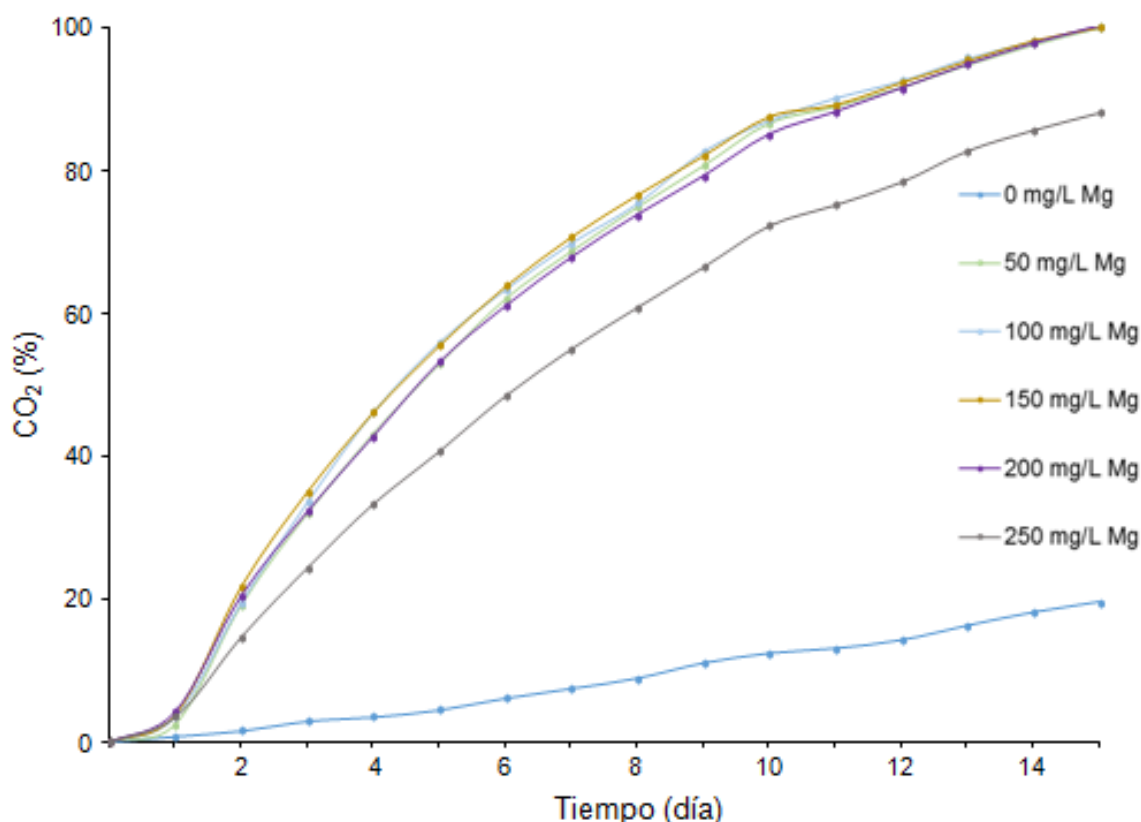


Figura 3. Producción de dióxido de carbono durante las fermentaciones

La Figura 3 muestra que en ausencia de magnesio la fermentación fue muy lenta, pocos azúcares se metabolizaron y la producción de etanol y dióxido de carbono fue escasa. Por otro lado, coincidiendo con lo que indican algunos estudios (Udeh y Kgatla, 2013), un exceso de magnesio (250 mg/L) también provoca un rendimiento menor de la fermentación respecto al resto de concentraciones. Durante la realización de este ensayo esta disminución del rendimiento ha sido cuantificada en un 10%. Las demás concentraciones de magnesio tienen un efecto similar entre si y a los 15 días todas las fermentaciones habían finalizado puesto que su contenido de azúcares residuales fue menor de 1 g/L.

3.4. Principales productos de fermentación

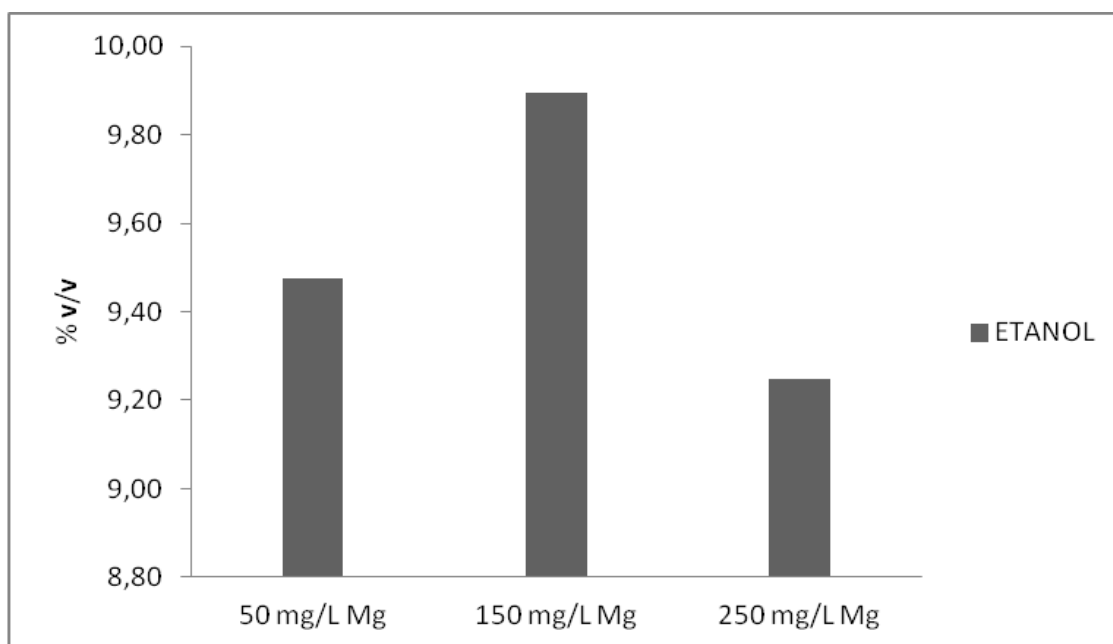


Figura 4. Graduación alcohólica de las muestras de vino con distintas concentraciones de magnesio: 50 mg/L, 150 mg/L y 250 mg/L

La Figura 4 muestra que existen unos valores de magnesio entorno de los 150 mg/L que producen un aumento significativo en la producción de etanol.

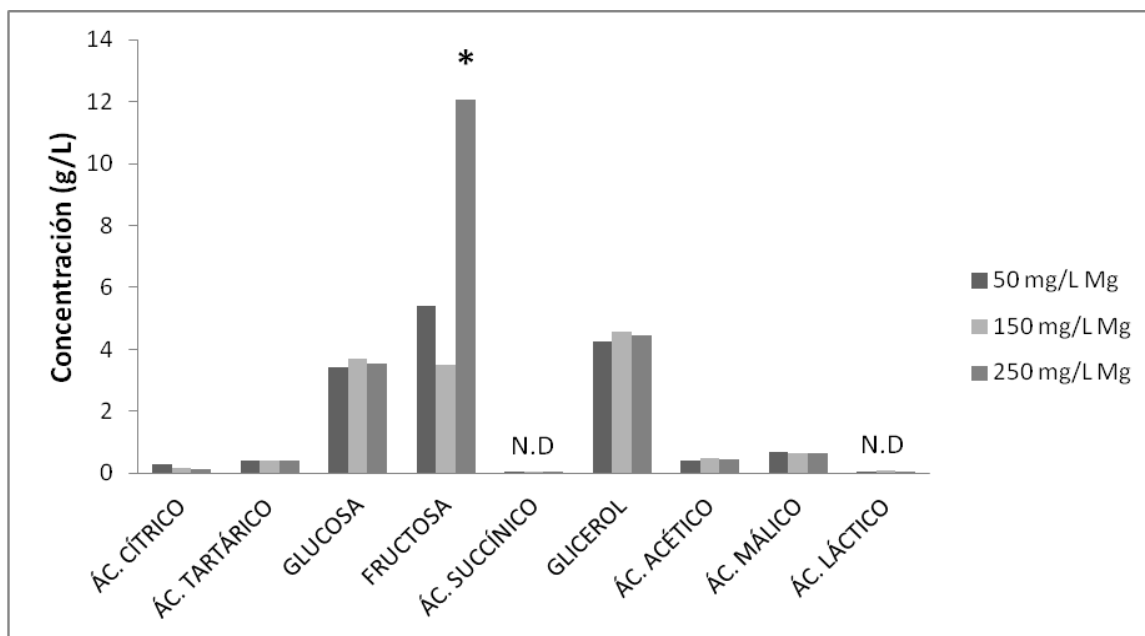


Figura 5. Principales productos de fermentación de las muestras de vino con distintas concentraciones de magnesio: 50 mg/L, 150 mg/L y 250 mg/L

En la Figura 5, que incluye el resto de productos de la fermentación: ácido de cítrico, ácido tartárico, glucosa, fructosa, ácido succínico, glicerol, ácido acético, ácido málico y ácido láctico, destacan especialmente las concentraciones de los azúcares residuales

(glucosa y fructosa) y glicerol. Una vez analizadas las concentraciones totales de todos los productos, se observa que no hubo diferencias estadísticamente significativas para ninguno de ellos con la excepción de la fructosa. Para este producto, esas diferencias estadísticamente significativas aparecen entre las muestras que contienen concentraciones de magnesio de 150 mg/L y 250 mg/L. También se aprecian variaciones de 6,68 g/L en el contenido de fructosa en las muestras adicionadas con 50 mg/L y 250 mg/L de magnesio, pese a no ser estadísticamente significativas.

3.5. Composición en ácidos grasos de las células de levadura

Se han determinado las concentraciones finales de diferentes ácidos grasos presentes en las levaduras: Ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico (C18), ácido oleico, ácido linoleico y ácido caléndico.

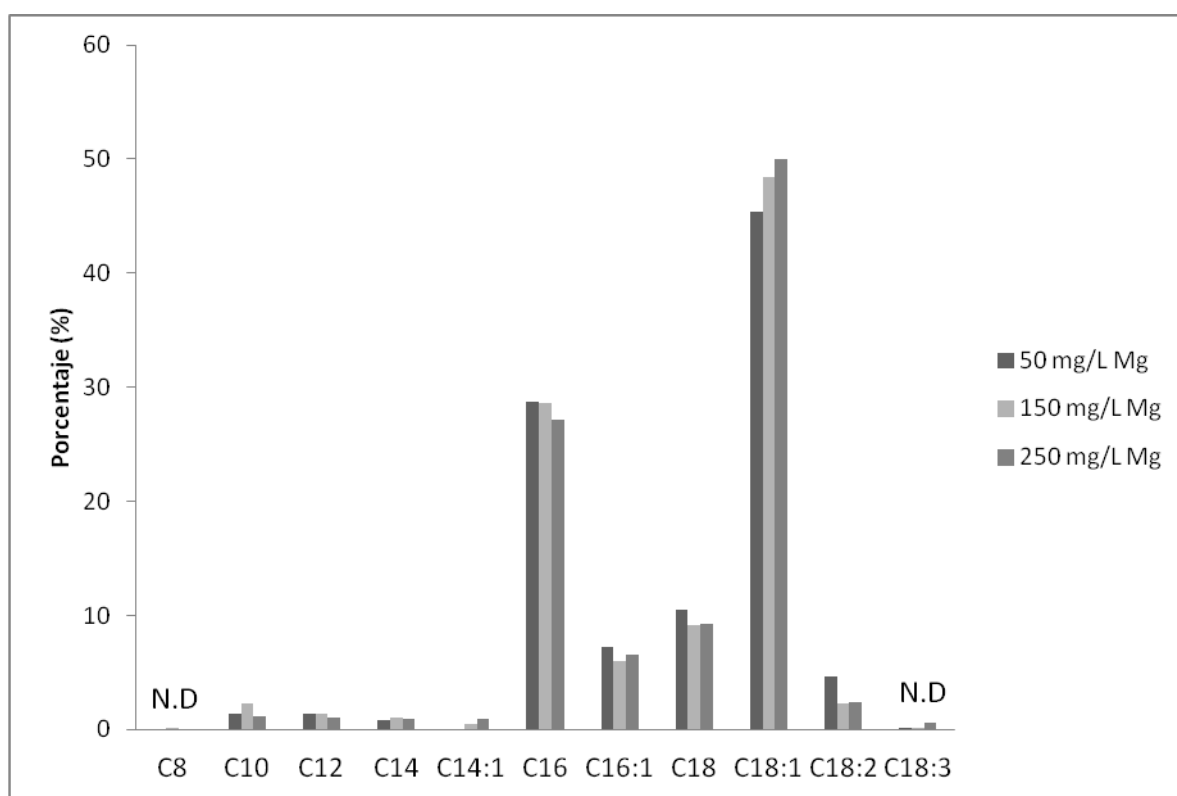


Figura 6. Ácido caprílico (C8), ácido cáprico (C10), ácido láurico (C12), ácido mirístico (C14), ácido miristoleico (C14:1), ácido palmítico (C16), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido caléndico (C18:3)

Tal como se puede visualizar en la Figura 6, el ácido oleico (C18:1), que representa aproximadamente un 45-50%, y el ácido palmítico (C16), que representa aproximadamente un 28-27% son los ácidos grasos mayoritarios de los analizados. Por

otro lado, a pesar de que se ha relacionado al magnesio con el metabolismo de los lípidos (Udeh y Kgatla, 2013), no se han observado diferencias significativas entre las diferentes muestras de levadura obtenidas a partir de vinos con las distintas concentraciones de magnesio estudiadas.

3.6. Compuestos aromáticos

Del total de sustancias volátiles susceptibles de ser analizadas en este estudio han sido seleccionadas las siguientes: acetato de etilo, 2-metil-propanol (isobutanol), cis-3-hexen-1-ol (conocido también como alcohol de hojas), ácido pentanoico (ácido valérico), acetato de 2 - feniletanol, ácido hexanoico (ácido caproico), 2- feniletanol (alcohol fenetílico) y ácido heptanoico.

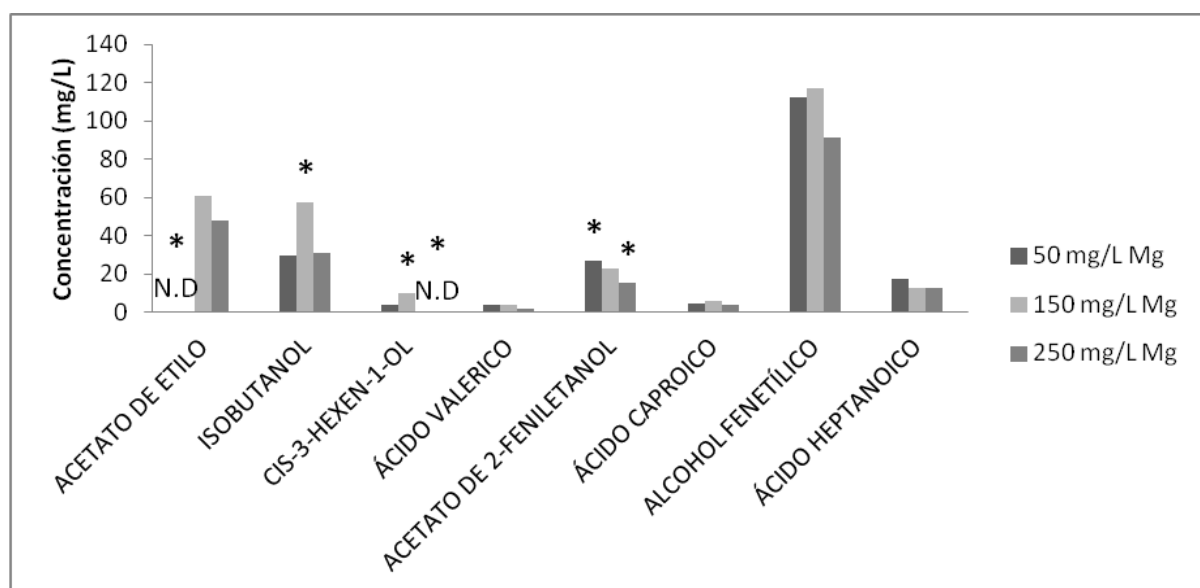


Figura 7. Compuestos aromáticos productos de la fermentación de las muestras de vino con distintas concentraciones de magnesio: 50 mg/L, 150 mg/L y 250 mg/L

La Figura 7 muestra que existen diferencias significativas en cuanto a la concentración de magnesio para el acetato de etilo, isobutanol, cis-3-hexen-1-ol y el acetato de 2-feniletanol ya que:

- No se detectan concentraciones de acetato de etilo en las muestras de vino con 50 mg/L de magnesio. Este compuesto resultante de la unión del ácido acético y del etanol es responsable del olor característico de los vinos con acidez volátil elevada y origina un olor a picado que se asemeja a pegamento, disolvente o barniz. Pese a esto, si no se encuentra en exceso, este compuesto puede favorecer la firmeza de algunos vinos tintos y también se le asocia con aromas afrutados.

- Se observan concentraciones significativamente superiores de isobutanol en las muestras de vino suplementadas con 150 mg/L de magnesio. En concentraciones moderadas, este compuesto presenta un agradable aroma a fruta.
- Para el cis-3-hexen-1-ol se encuentran diferencias significativas entre las muestras de 150 mg/L y 250 mg/L de magnesio, debido a que en estas últimas no se haya este compuesto. Este compuesto también conocido como alcohol de hojas se produce en pequeñas cantidades por la mayoría de las plantas y presenta un olor intenso a hierba y hojas verdes recién cortadas.
- En las muestras de vino de 50 mg/L de magnesio se detectan concentraciones de acetato de 2-feniletanol significativamente superiores a las de 250 mg/L de magnesio. La presencia de este compuesto contribuye al aroma afrutado característico de vinos jóvenes,

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La bibliografía afirma que la concentración de magnesio tiene un efecto absolutamente esencial para el crecimiento, la actividad de enzimas y el metabolismo de la levadura, jerarquizando a este metal a tener un rol fundamental en la fermentación.

Existe un efecto cepa dependiente de la concentración de magnesio. Las cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudiadas presentan rangos estrechos y constantes de magnesio y calcio fuera de los cuales, el crecimiento se ve afectado negativamente. Por ejemplo, durante el estudio de la cepa *S. cerevisiae* 1118, seleccionada en este trabajo, se ha comprobado que la concentración óptima de magnesio oscila entorno a los 150 mg/L, además del rango previamente establecido para el calcio de 160 mg/L.

Por otro lado, el efecto del magnesio, además de verse afectado por la temperatura, el pH y el número de células viables de levadura, también se ve afectado por la presencia de otros iones metálicos con funciones antagonistas como el estroncio, el cadmio, el calcio y el zinc (Udeh y Kgatla, 2013).

En el caso del calcio, se ha visto que las células requieren mayores cantidades de magnesio que de calcio para crecer, y, por ello, los niveles de ion Mg^{2+} intracelular son superiores.

En particular, niveles altos de ion Ca^{2+} puede inhibir la unión entre la superficie celular y la membrana de transporte de magnesio, y, además, puede inhibir la actividad de la ATPasa dependiente de magnesio, que es la principal fuerza motriz para la translocación de nutrientes y posterior crecimiento de la célula.

Por ello, en los procesos de fermentación se debe garantizar que los niveles de magnesio sean lo suficientemente altos para prevenir su posible déficit y que los niveles de calcio sean lo suficientemente bajos para evitar la competencia de este elemento con el magnesio.

En relación con los experimentos de fermentación realizados, se puede observar que con 150 mg/L de magnesio las levaduras tienen un mayor rendimiento de fermentación mientras que cantidades superiores (250 mg/L de magnesio) se observa una metabolización incompleta de la fructosa ya que las levaduras no logran fermentar todos los azúcares dando como resultado vinos no secos.

También se ha visto que la concentración de magnesio tiene un efecto sobre los metabolitos producidos durante la fermentación. Diferentes concentraciones de magnesio no tuvieron una influencia considerable en la producción de los principales metabolitos de fermentación con la mencionada excepción de la fructosa, ni tampoco en la composición

intracelular de ácidos grasos. Por otro lado, sí se vieron diferencias significativas para algunos compuestos volátiles.

Cuando las fermentaciones se realizan con concentraciones excesivas de magnesio, los vinos resultantes presentan una menor presencia de aromas afrutados provocados por compuestos como el cis-3-hexen-1-ol y el acetato de 2-feniletanol. Por otro lado, las fermentaciones llevadas a cabo en concentraciones bajas de magnesio dieron lugar a vinos con aromas afrutados pero de menor complejidad aromática (causada en parte por la falta de acetato de etilo) que los vinos con un rango de concentración de magnesio óptimo (150 mg/L de magnesio).

De cara al futuro, en el diseño de medios industriales para el crecimiento a gran escala de levaduras, la competencia entre calcio y magnesio podría tener implicaciones importantes ya que aunque los medios de laboratorio generalmente presentan una relación suficientemente alta de Mg:Ca, muchos medios de fermentación industrial pueden tener un equilibrio incorrecto de estos metales, con relaciones de concentración relativa más favorables al calcio, lo cual resulta en una fermentación poco eficiente.

Por lo tanto, deben optimizarse los niveles medios de ion Mg^{2+} para maximizar la formación de productos microbianos puesto que es bastante común que los constituyentes que contienen magnesio se agreguen de forma arbitraria sin tener en cuenta la cuestión de la biodisponibilidad, la cual debe tenerse en cuenta ya que las materias primas industriales contienen multitud de materiales de adsorción insolubles y quelantes solubles que reducen la biodisponibilidad de los iones metálicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado financieramente por la Universitat Rovira i Virgili. Además quiero agradecer a Ricardo Cordero, Nicolas Rozès y Gema Roca por la ayuda prestada durante la realización del trabajo.

5. BIBLIOGRAFÍA

Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A. y Moreno-Arribas, M. (2017). *Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement*. Madrid.

Borrull, A., Poblet, M. y Rozès, N. (2015). *New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection*. Food Microbiology. 48, 41-48.

Borrull, A., López, G., Miró, E., Salvadó, Z., Poblet, M., Cordero, R. y Rozès, N. (2016). *New insights into the physiological state of Saccharomyces cerevisiae during ethanol acclimation for producing sparkling wines*. Food Microbiology. 54, 20-29.

Ortega, C., López, R., Cacho, J. y Ferreira, V. (2001). *Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts*. Journal of Chromatography A. 923, 205–214.

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

Rodríguez-Porrata, B., Lopez-Martinez, G., Redón, M., Sancho, M., Mas, A., Cordero-Otero, R. y Rozès, N. (2010). *Enhancing yeast cell viability after dehydration by modification of the lipid profile*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 27, 75-83.

Udeh, H. y Kgatla, T. (2013). *Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation*. Thohoyandou, Sudáfrica.

Walker, GM. (1994). *The Roles of Magnesium in Biotechnology*, Critical Reviews in Biotechnology, 14:4, 311-354, DOI: 10.3109/07388559409063643

Walker, GM. (2004). *Metals in Yeast Fermentation Processes*, *Advances in Applied Microbiology*, 54:197-229, DOI: 10.1016/S0065-2164(04)54008-X