M02 - OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA CEPA VÍNICA DE *CANDIDA ZEMPLININA* EN FORMA DE LSA

Roca-Domènech G.[1], López-Martínez G.[1], Moliné A.[1], Poblet M.[1], Rozès N.[1], Cordero-Otero R.[1]

[1]Universidad Rovira i Virgili / Fac. de Enología, Dep. Bioquímica y Biotecnología, Marcel·lí D. 1, 43007, Tarragona, España
ricardo.cordero@urv.cat

RESUMEN:

La diferencia en la cinética de consumo de la glucosa respecto a la fructosa durante la fermentación por parte de *Saccharomyces cerevisiae* resulta en un retraso o parada de la misma. Este problema ha conducido al estudio de la levadura fructofílica del vino como *Candida zemplinina* para su aplicación en el restablecimiento de la proporción óptima glucosa/fructosa del mosto o bien para la eliminación de los azúcares residuales del vino. Quedando supeditada su aplicación de forma general a la disponibilidad de *C. zemplinina* en forma de LSA. En el presente estudio hemos desarrollado un protocolo para la preparación de LSA de *C. zemplinina* que alcanza una viabilidad de hasta un 40%. Además, su desempeño en inóculos mixtos en microvinificaciones resultó en una mayor complejidad organoléptica en comparación con los vinos obtenidos con *S. cerevisiae.*

Palabras clave: Levadura seca activa, viabilidad, *Candida zemplinina*

1. Introducción

La capacidad fructofílica de la levadura vínica *C. zemplinina* puede ser de gran utilidad para la prevención de paradas de fermentación producidas por la sensibilidad de *S. cerevisiae* a fermentar eficientemente mostos donde la fructosa presenta mayor concentración en la proporción fructosa : glucosa [1]. Se mostró que el restablecimiento de este equilibrio mediante la adición de glucosa permitía reactivar la fermentación mediada por cepas de *S. cerevisiae* sensibles, o bien por el mantenimiento del equilibrio mediado por la capacidad fructofílica de *C. zemplinina* [2, 3]. Los vinos producidos con inóculos mixtos *S. cerevisiae*/*C. zemplinina* presentan un enriquecimiento en acetoína, acetaldehídos, ácido succínico y niveles elevados de glicerol respecto a los producidos únicamente con *S. cerevisiae* [4]. Para lograr que *C. zemplinina* se vuelva una herramienta biotecnológica, tanto para aplicaciones puntuales durante la fermentación o bien para inducir cambios organolépticos del vino, ha de poderse comercializar en formato de Levadura Seca Activa (LSA), reduciéndose así gastos de almacenado y transporte, y asegurando la pureza del inóculo.

Debido a la capacidad fructofílica de *C. zemplinina*, la cual puede ser necesaria en algunos momentos puntuales de la fermentación o para acentuar características organolépticas del vino, se podrían realizar inóculos mixtos de *C. zemplinina* y *S. cerevisiae.* Para que estos inóculos puedan ser una herramienta biotecnológica para los enólogos, deberían poder comercializarse como LVSA (levadura vínica seca activa), formato para el cual los profesionales del sector ya cuentan con las competencias requeridas para su uso.

Consecuentemente, el objetivo de este trabajo es la obtención de un protocolo para obtener una cepa de *C. zemplinina* en formato de LVSA y evaluar su impacto en el perfil organoléptico de un vino elaborado a partir de inóculos mixtos.

2. Material y métodos

Se evaluaron 6 cepas de *C. zemplinina* aisladas de mosto de uva, éstas fueron cultivadas en agitación constante a 100 rpm y a 32ºC en YPD e inoculadas con un precultivo a una DO_{600} inicial de 0,250.

Se procedió a la desecación de $5 \cdot 10^7$ células, previamente sonicadas (3 veces durante 3 s con descansos en frío de 4 s), con diferentes concentraciones de trehalosa (5%, 10%, 20% y 30%) durante 20 h con un flujo de aire a 28ºC [5]. Transcurridas las 20 h se rehidrataron las células a: 30ºC, 40ºC y 50ºC; durante: 10min, 20min y 30min. Además de rehidratar las células con H_2O se evaluaron la presencia de rafinosa 0,25%, 0,5mM $FeSO_4$, 1mM ácido ascórbico, 5mM $MgSO_4$, prolina 10% y sus combinaciones.

La viabilidad celular fue evaluada mediante siembra en YPD, usando un sembrador automático (AES Laboratoire, Francia). Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) tras haber sido incubadas a 32ºC durante 48 h, mediante el software ProtoCol SR/HR versión 1.27 de Symbiosis (Cambridge, UK).

Las microvinificaciones se realizaron en 1,5 L a partir de mosto concentrado y suplementado con 300 $mg \cdot L^{-1}$ de nitrógeno asimilable. Al día 4 se había consumido el 50% de los azúcares totales, cuando las fermentaciones fueron complementadas con 50 $mg \cdot L^{-1}$ de fructosa. Los componentes volátiles principales fueron determinados por el Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (Zaragoza, España).

3. Resultados

Se evaluó la tolerancia a la deshidratación de 6 cepas de *C. zemplinina* en diferentes puntos de crecimiento para determinar la tasa de viabilidad para cada cepa en diferentes estados fisiológicos (Fig. 1). Todas las cepas evaluadas presentaron perfiles similares de tolerancia a la deshidratación, con células obtenidas entre 16 h y 24 h de cultivo en fase estacionaria. No obstante los resultados aquí presentados corresponden a los obtenidos para la cepa CBS1713, la cual alcanzó el mayor valor de viabilidad una vez sometida al proceso de secado y rehidratación.

Para la cepa *C. zemplinina* CBS1713 se evaluó la viabilidad rehidratando las células entre 30ºC y 50ºC durante 10 min, 20 min y 30 min (Fig. 2). Se observó una disminución significativa de la viabilidad en los casos en que las células se rehidrataron a 50ºC durante 10 min. La mayor viabilidad se obtuvo con células rehidratadas durante 30 min a 30ºC. De los suplementos evaluados durante la rehidratación prolina 10% duplicó la viabilidad celular, alcanzándose un 40% (dato no mostrado).

Las microfermentaciones mixtas finalizaron al 9 día de ser inoculadas, cuando las inoculadas con *S. cerevisiae* se extendieron 5 días más (datos no mostrados). Los valores

enológicos obtenidos aproximadamente para las diferentes fermentaciones fueron: etanol 13.5 % vol·vol^{-1}, azúcares residuales 3.2 mg·L^{-1} y ácido acético 150 mg·L^{-1}.

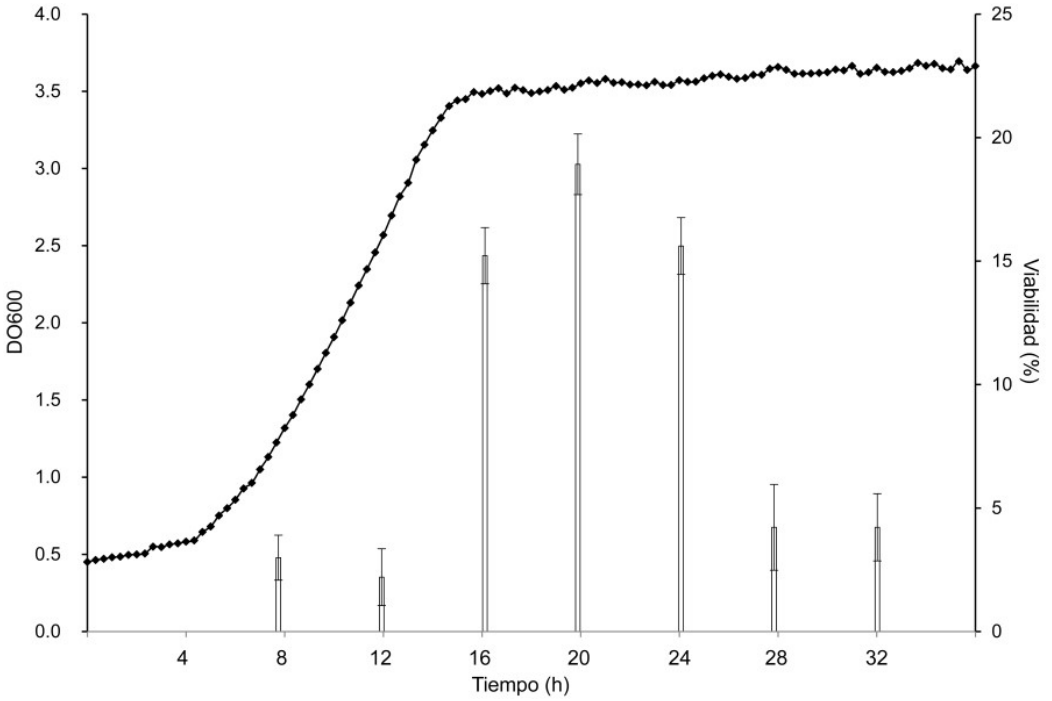


Fig. 1 Viabilidad celular a diferentes puntos de la curva de crecimiento. A título de ejemplo de representan los valores obtenidos para la cepa C. zemplinina CBS1713. *Resultados de 3 réplicas biológicas ± DS.*

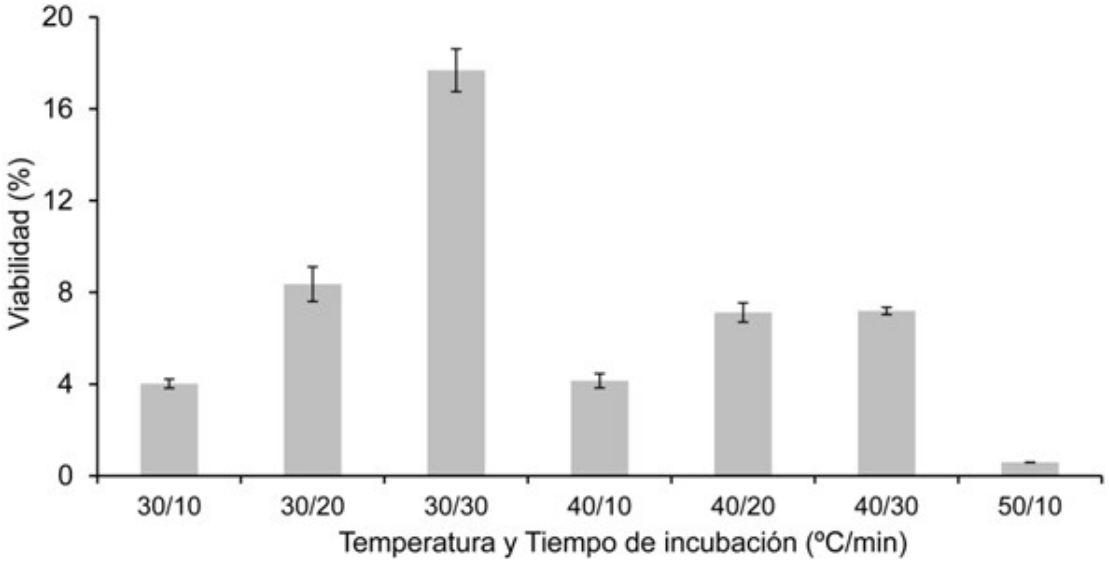


Fig. 2 Viabilidad celular a diferentes condiciones de rehidratación. Resultados de 3 réplicas biológicas ± DS.

Los perfiles aromáticos obtenidos de las diferentes microfermentaciones mixtas muestran un marcado incremento de acetato de etilo, acetato isoamilo, butirato etilo, hexanoato etilo, octanoato etilo, alcohol isoamílico, metionol, β-feniletanol, ácido butírico, ácido isovaleriánico, ácido hexanoico y ácido octanoico. De los 29 compuestos analizados solamente el acetaldehído de las fermentaciones mixtas presentó un valor tres veces inferior a las inoculadas solamente con *S. cerevisiae*.

Tabla 1 Componentes volátiles producidos durante las fermentaciones mixtas y simples.

	Compuestos	*S. cerevisiae* + *C. zemplinina*	*S. cerevisiae*	Umbral de percepción
Carbonilos, notas oxidativas y lácticas	Acetaldehído	21.03±5.65	77.24±9.11	0.5
Acetatos, notas frutales y florales	Acetato de etilo	41.10±1.57	4.29±4.30	12.3
	Acetato isoamilo	1.01±0.20	N.D.	0.03
Ésteres etílicos lineales, notas frutales	Butirato etilo	0.20±0.01	N.D.	0.125
	Hexanoato etilo	1.16±0.78	N.D.	0.062
	Octanoato etilo	0.56±0.32	0.15±0.03	0.58
	Decanoato etilo	0.08±0.04	N.D.	0.2
Alcoholes, notas fusel y verdes	Alcohol isoamílico	101.01±3.16	23.09±0.42	30
	Metionol	2.49±0.18	0.30±0.01	1
	β-feniletanol	16.55±2.57	8.22±5.82	14
Ácidos, notas de queso	Ácido butírico	0.76±0.02	0.20±0.01	0.173
	Ácido isovaleriánico	0.73±0.01	0.18±0.01	0.033
	Ácido hexanoico	3.54±0.41	0.32±0.02	0.42
	Ácido octanoico	8.81±0.50	1.32±0.13	0.5

Los valores del umbral de olfacción están estimados en vinos sintéticos. Los valores representados en mg·l^{-1} de al menos tres réplicas de fermentación ± DS.

4. Conclusiones

Se ha podido demostrar que la presencia de prolina durante la rehidratación tiene un efecto positivo en la mejora de la viabilidad celular en la preparación de *C. zemplinina* en forma de LSA. La evaluación de la LSA de *C. zemplinina* en inóculo mixto confirmó el aporte organoléptico positivo de esta levadura al vino aportando notas florales, fusel y de queso.

5. Bibliografía

1. Bisson, L.F., Kunathigan, V. 2003. On the trail of an elusive flux sensor. Res Microbiol. 154: 603-610.

2. Berthels, N.J., Cordero Otero, R.R., Bauer, F.F., Pretorius, I.S., Thevelein, J.M. 2008. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. Appl Microbiol Biotechnol 77: 1083-1091.

3. Magyar, I., Tóth, T. 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol 28: 94-100.

4. Ciani, M., Maccarelli, F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World J Microb Biot 14: 199–203.

5. Rodríguez-Porrata, B., Carmona-Gutierrez, D., Reisenbichler, A., Bauer, M., López, G., Escoté, X., Madeo, F., Cordero-Otero, R. 2012. Sip18 hydrophilin prevents yeast cell death during desiccation stress. J Appl Microbiol 112: 512-25.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2012-40018-CO1-01), a la Generalitat de Cataluña por la beca doctoral de GL (FI-DGR 2012 AGAUR) y a la Universidad Rovira y Virgili por la beca doctoral de GR (2014PMF-PIPF-47).