

NECESIDADES NUTRITIVAS DE LAS LEVADURAS

Necesidades nutritivas de las levaduras

Francisco Javier Agenjo Agenjo, *Director Técnico Biocor Europe S.L.*

El presente artículo pretende realizar una recopilación de los trabajos desarrollados por reconocidos investigadores, desde la década de los ochenta hasta la actualidad, sobre las necesidades de las levaduras para realizar una fermentación de los mostos de la mejor forma posible. Estas investigaciones han sido contrastadas por la experiencia de elaboración de vinos de fermentación controlada durante los últimos 30 años.

FACTORES DE INFLUENCIA EN LAS CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La cinética de la fermentación alcohólica está sometida a una serie de factores que es necesario tener en cuenta a la hora de tener que corregir esta, y son los siguientes:

Cepa de levadura. – Desde la generalización de la siembra de levaduras secas activas seleccionadas, la frecuencia de paradas de fermentación ha disminuido considerablemente porque los criterios de buena fermentación están entre los más importantes en la selección de una cepa de levaduras.

Sin embargo, antes de elegir una cepa de levadura es necesario conocer si está adaptada al mosto en el que se va a sembrar.

Temperatura de fermentación. – La temperatura tiene una influencia directa sobre la cinética de fermentación, así los años más cálidos se dan a menudo las fermentaciones más rápidas. Sin embargo, la rapidez no implica la ausencia de problemas. Actualmente el progreso de los equipos de frío y regulación de temperatura nos permite disminuir la frecuencia de estos problemas fermentativos.

Turbidez del mosto. – Por debajo de 50 ntu el riesgo de paradas de fermentación es alto. Las burbas tienen un doble papel: efecto soporte y sobre todo efecto nutritivo lipídico (aporta ácidos grasos de cadena larga, Feuillat 1994).

Contenido de vitaminas en mostos. – Especialmente importante es la tiamina. El contenido en el racimo es en general suficiente para la multiplicación de las levaduras, pero habitualmente la tiamina es consumida por las levaduras indígenas en el curso de las fases prefermentativas. Las levaduras del tipo *Kloeckera* consumen la tiamina más rápido que la *Saccharomyces*, lo que puede hacer que los mostos tengan carencia en el momento de la siembra de las levaduras. En estos casos el número de levaduras viables al final de la multiplicación disminuye fuertemente.

Además, la tiamina es en parte inactivada por el SO₂, su adición debe hacerse por tanto algunas horas después del sulfitado y justo en el momento de la siembra.

Importante es la presencia en los mostos de otras vitaminas como ácido pantoténico, piridoxina, biotina, etc., ya que están implicados en el metabolismo del H₂S y síntesis de metionina y cisteína.

Oxígeno. – Interviene en la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados de la membrana citoplasmática de la levadura; estos componentes son responsables de la resistencia al alcohol de las levaduras al final de la fermentación. Las levaduras necesitan una cantidad entre 5 y 10 mg/l de oxígeno.

Inhibidores. – Además del alcohol la levadura produce ácidos grasos tóxicos (C₆, C₈, C₁₀) que pueden ser eliminados por añadiendo cortezas de levaduras (Lafon-Lafourcade, 1982). Los residuos del tratamiento de la viña pueden ser también responsables de problemas fermentativos (fase de latencia larga, producción de acidez volátil).

DIFERENCIACIÓN DE LEVADURAS A NIVEL DE FENOTIPO

Es necesario explicar que el comportamiento en bodega de un microorganismo no depende sólo de su estructura genética. Las condiciones de vinificación y el estado fisiológico de la levadura van a condicionar su respuesta genética en condiciones determinadas. En un proceso de fermentación alcohólica el nivel estrés al que está sometida una levadura es elevado, por lo que su capacidad de respuesta a éste es muy importante. Por ello necesita estar metabólicamente preparada para funcionar de forma correcta y cumplir así con sus expectativas de elaboración de un vino en particular.

La cantidad de glucógeno y trealosa celular es muy importante en relación a la capacidad de conseguir una óptima respuesta de la levadura después de su rehidratación (Novo et al. 2007). Dos cepas de levadura que comparten su misma carga genética, van a comportarse de forma diferente cuando son inoculadas en un mosto a baja temperatura después de la rehidratación. La cepa que más trealosa y glucógeno tenga a nivel citoplasmático, resolverá mejor su adaptación al tener mayor material energético, a pesar de tener la misma carga genética de respuesta al estrés térmico.

De cara a la elaboración de un determinado estilo de vino, no sólo es importante la carga genética de una cepa en particular, sino que también depende de la tecnología empleada en su producción de biomasa, las condiciones de crecimiento, secado y conservación. Así, la estabilidad genética, la viabilidad celular, estado fisiológico, contenido en nutrientes, trealosa y glucógeno, nivel de contaminación microbiológica y la constitución lipídica de membrana, son factores determinantes que influyen en los procesos bioquímicos de la fermentación alcohólica. Por tanto, también son determinantes en la definición del resultado final cualitativo del vino.

INFLUENCIA DEL MOMENTO DE ADICIÓN DE ACTIVADORES

La tiamina debe añadirse cuando se realiza la siembra de las levaduras, ya que favorece su multiplicación. El momento de la adición del nitrógeno y el oxígeno es muy importante. El nitrógeno es necesario al comienzo pero sobre todo a mitad de la fermentación. El oxígeno debe adicionarse entre el primer cuarto y la mitad de la

fermentación (caída de 20 ó 30 puntos de densidad) si no, no es eficaz. Si se añade al principio la levadura lo utiliza en la respiración y no realiza síntesis de esteroides (Sablayrolles, 1997).

Las paredes celulares deben ser añadidas en el curso de la fermentación.

Cuando la concentración de etanol alcanza un 10% en volumen se presentan los primeros síntomas de inhibición de multiplicación celular, así como un sesgo en algunas vías bioquímicas:

1. Puede manifestarse una “intoxicación etílica” en las células de levadura, a la cual responden las células con la apertura de la vía anabólica de síntesis de ácidos grasos transformando el etanol en acetyl-CoA, y a partir de ello producir una significativa acumulación (3 mg/l ó más) de ácidos grasos (octanoico, decanoico y sus ésteres etílicos) los cuales se ligan a la membrana plasmática y evitan su función natural en el transporte de metabolitos, propiciando la muerte de la célula por inanición.
2. La actividad inhibitoria del etanol frente a las levaduras se manifiesta también por una disminución de la viabilidad celular de multiplicación y de la capacidad fermentativa. Se ha comprobado que cuando células de *Saccharomyces* se les coloca en medios con etanol, sufren una inhibición en el transporte de azúcares (glucosa, maltosa...) y en el transporte de aminoácidos.
3. Los lugares de acción del etanol a nivel de célula de levadura son los sistemas de endomembranas: citoplasmática, mitocondrial, nuclear, retículo endoplasmático y restantes orgánulos del sistema (lisosomas, vacuolas, etc.). La molécula de etanol, muy polar, penetra en el interior de la membrana sustituyendo a las moléculas exteriores y asociándose a las moléculas de ácidos grasos de los fosfolípidos, modificando su fluidez y permeabilidad. Estas modificaciones pueden llegar a provocar la muerte por inhibición del transporte especialmente en la membrana citoplasmática, subyacente a la pared celular que controla el tráfico de alimentos y metabolitos excretados constituidos por fosfolípidos y proteínas (permeasas encargadas del transporte de azúcares, aminoácidos, ...) Otro tipo de proteína presente en esta membrana la ATPasa, capaz de hidrolizar el ATP y acoplar la energía liberada a la excreción de iones H^+ al medio, eliminando la acidez del interior celular y aumentando el gradiente químico y el potencial de membrana, es decir, el potencial electroquímico de la célula. Por tanto, el etanol actúa mediante dos mecanismos en el transporte de solutos por la levadura: una acción directa sobre las permeasas, al modificar su entorno y la conformación de estas proteínas enzimáticas; y una acción indirecta perturbando el funcionamiento de la ATPasa de la bomba de protones, esta disolución provoca la disipación del gradiente electroquímico (fuerza protonmotriz, Δp) que dirige muchos procesos de transporte a nivel de membrana, y con él la parada de transporte de solutos y la falta de regulación del pH celular.
4. No obstante, las levaduras pueden neutralizar las modificaciones producidas por el etanol:
La biosíntesis de los ácidos grasos (su velocidad viene determinada por la velocidad de la reacción de la acetyl-CoA-carboxilasa, enzima alostérico para dar

malomil-CoA) tiene lugar en el citosol de las células eucariotas (mientras que su oxidación tiene lugar principalmente en las mitocondrias) a partir de las cuales se sintetizan bien triacilgliceroles o fosfolípidos. Los fosfoglicéridos, lípidos polares, que son sintetizados por enzimas del retículo endoplasmático, son en su mayoría insertados dentro de la bicapa lipídica del retículo. La membrana del retículo endoplasmático es a su vez el precursor de las membranas del aparato de Golgi y de las membranas vesicales (vacuolas) que constantemente se desprenden del aparato de Golgi siguiendo su camino hacia otros elementos del sistema de endomembranas, en proporciones específicas, así tales vesículas frecuentemente se funden con la membrana plasmática y las membranas tienen los materiales necesarios para su actividad de autosellado y reparación.

La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana varía al colocar las levaduras en etanol. Aumenta la proporción de ácidos de cadena larga (18 – C), así como el número de dobles enlaces en la molécula (oleico, y linoleico). El aumento de proporción de estos ácidos insaturados de cadena larga incrementa la fluidez de la membrana fosfolipídica facilitando la actividad de las proteínas de membrana (enzimas transportadoras), permitiendo que la levadura vaya adaptándose a la creciente concentración de etanol en el medio. Sin embargo, se sabe que la síntesis de estos compuestos se reduce cuando las levaduras se encuentran en un medio donde el oxígeno está en cantidad limitada, lo que ocurre en los últimos estadios de la fermentación. No obstante, en tales condiciones las levaduras se han mostrado capaces de asimilar los ácidos grasos de cadenas largas e incorporarlos a su membrana citoplasmática (autoreparación). Esta es la justificación de las pieles de bayas como coadyuvantes de la etapa final de fermentación.

La disminución de la fluidez de la membrana puede deberse también a la sustitución de de las moléculas exteriores asociadas a las cabezas polares de los fosfolípidos por moléculas de etanol, reduciendo el desplazamiento de las cadenas de los ácidos grasos. Conviene recordar aquí el papel preventivo de la trealosa en los procesos de deshidratación-hidratación de la célula de levadura en la osmoregulación (orgánulos homeostáticos).

La clarificación de mostos con bentonita puede conducir a fermentaciones lentas o perezosas, sobre todo en mostos que se separan de sus lías. Tanto más acusado es el efecto cuanto más azucarado es el mosto.

La síntesis de NAD por la levadura se inhibe en anaerobiosis, ya que la formación de su precursor, ácido nicotínico, exige la presencia de oxígeno y éste es necesario para la síntesis de ácidos grasos y esteroides.

En resumen, no existe un mecanismo único de la tolerancia de la levadura al etanol. Hay diversos factores (con un componente básico genético) que puede contribuir a la expresión de este carácter que debe figurar en las levaduras seleccionadas.

NUTRICIÓN CELULAR PARA LEVADURAS

Debemos considerar como nitrógeno asimilable (NA) por las levaduras en las condiciones de vinificación al amonio como fuente inorgánica (representa hasta el 40 % del NA), y todos los aminoácidos excepto la prolina. Sin embargo, la levadura vínica *Saccharomyces Cerevisae* no consume este nitrógeno de manera aleatoria, sino que tiene un orden de preferencia para las distintas fuentes de nitrógeno. *Saccharomyces Cerevisae* ha desarrollado diferentes mecanismos moleculares que le permiten utilizar preferentemente aquellas fuentes que le permiten crecer mejor.

La célula es capaz de detectar la presencia de fuentes de nitrógeno más ricas. Esto desencadena una fuente de señales, que culmina con la activación de los genes implicados en el transporte y metabolismo de estas fuentes ricas y en la represión de aquellos genes implicados en el transporte y utilización de fuentes más pobres. Una vez consumidas las fuentes de nitrógeno más ricas (amonio, glutamina y esparraguina), la levadura activa la maquinaria metabólica para la utilización de las más pobres (arginina, glutamato, alanina, etc.).

Sin embargo, la importancia del nitrógeno no reside exclusivamente en ser necesario para la formación de biomasa, el contenido en nitrógeno también tiene una influencia clara sobre la velocidad fermentativa. La mayor parte de la fermentación alcohólica se produce en una fase de no proliferación celular o estacionaria. En este punto el nitrógeno del medio es utilizado para el recambio proteico de las diferentes enzimas celulares (ATP sintetasa, bomba de protones, transporte de azúcares, etc.). Este contenido en nitrógeno tiene una influencia manifiesta en los diferentes metabolitos producidos durante la fermentación, muchos de ellos con un impacto muy claro en el aroma del vino.

El nitrógeno es el sustrato limitante del crecimiento celular hasta alcanzar valores cercanos a los 200 mg/litro, aunque esto depende de la fuente de nitrógeno utilizada. *Varela y cols. (2004)* determinaron el efecto que tenía la cantidad de células en un mosto deficiente en nitrógeno (50 mg/l) sobre la velocidad y tiempo de fermentación. Para ello añadió, 2 y 5 veces más de la dosis recomendable de LSA a los mostos. El resultado fue que en estas fermentaciones con mayor concentración de células se alcanzaban velocidades de fermentación similares a las obtenidas en un mosto rico en nitrógeno (300 mg/l). De esta manera mostraban una relación directa entre mayor concentración de biomasa y mayor velocidad fermentativa en los mostos pobres en nitrógeno.

Mendes-Ferrera y cols. (2004) también estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de amonio y $-NH_2$ sobre el crecimiento y la velocidad fermentativa. En este estudio y para la cepa PYCC 4072, estos autores determinaron la producción máxima de biomasa (7.8 g/l ó $7.8 \cdot 10^7$ cel/ml) para una concentración de 402,5 mg de N/l. En concentraciones limitantes de N (66 mg de N/l) la cantidad de biomasa producida era 3.5 veces menor (2.2 g/litro ó $2.2 \cdot 10^7$ cel/ml). Las concentraciones crecientes de N no sólo afectaban a la producción de biomasa, sino a la velocidad de

fermentación. Mientras la fermentación con una cantidad suficiente de N acabó la fermentación en 5 días, la fermentación limitante en N (66 mg de N/l) requirió 28 días para su finalización.

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y TIPO DE NITRÓGENO SOBRE LA CINÉTICA FERMENTATIVA

Resulta evidente que el enriquecimiento en N del medio de fermentación tiene un efecto sobre la cinética fermentativa, independiente del crecimiento celular. Algunos autores (*Thailandier et al. 2007*) confirman que este efecto estimulador del consumo de azúcar es incluso más importante que el efecto sobre el crecimiento. Este hecho resulta muy interesante desde el punto de vista industrial si tenemos en cuenta que la mayor parte de la fermentación alcohólica se produce en la fase estacionaria o de no proliferación celular. A pesar de que durante este periodo no hay multiplicación celular las levaduras necesitan nitrógeno para mantener su metabolismo activo. El medio de fermentación es un ambiente cambiante y hostil que requiere una readaptación continua para las nuevas condiciones. Esta readaptación al medio supone un recambio proteico continuo en la maquinaria enzimática celular. Para este recambio de proteínas celulares es necesaria la disponibilidad de N en el medio de fermentación. *Thailandier et al. (2007)* establecieron la cantidad de N consumido por la levadura, por gramo de azúcar consumido (mg N/g de glucosa-fructosa); como siempre hay que contar con las diferentes necesidades de las distintas cepas, esta cantidad tiene un rango de 0.61 – 0.91 mg de N/g de azúcar. Es una relación que asegura cubiertas las necesidades nitrogenadas (tabla 1).

CONCENTRACIÓN de N (mg/l)	CÉLULAS INOCULADAS (cel/ml)	TASA FERMENTACIÓN (g/l día)	TIEMPO DE FERMENTACIÓN (horas)
300	2 10 ⁶	37.5	170
50	2 10 ⁶	7.6	700
50	4 10 ⁶	17.6	330
50	1 10 ⁷	47.7	120

Tabla 1. – Relación entre el N disponible y las células inoculadas con el tiempo de fermentación (*Bertrand y cols. 2005*).

Una relación similar (tabla 2) estableció *Bisson y Butzke (2000)*, pero en este caso, entre necesidad de N asimilable frente a grado alcohólico probable (GAP).

GAP	N mg/l
16.450	350
15.200	300
13.900	250
12.600	200

Tabla 2. – Relación entre GAP y necesidad de N asimilable (*Bisson y Butzke 2000*).

Sin embargo, el aumento de la cinética fermentativa no debe ser sólo entendido por la disponibilidad de N para facilitar el recambio proteico celular, sino que se ha demostrado que algunas fuentes de N, en concreto el amonio, pueden actuar como

activadores de las enzimas glucolíticas claves. En concreto, se ha visto un incremento importante del transporte de azúcares por activación de las permeasas implicadas (genes HXT).

Thaillandier et al. (2007) también informaron de una mayor actividad fructofílica (mayor consumo de la fructosa frente a la glucosa) de la levadura en presencia de mayor concentración de N, probablemente por un cambio en la afinidad de los transportes de hexosas.

No olvidemos los llamados elementos de supervivencia como el ergosterol y determinados ácidos grasos poliinsaturados.

RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO EN NITRÓGENO Y LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS AROMÁTICOS

La disponibilidad de N afecta también a la formación de compuestos volátiles y no volátiles, los cuales son de gran importancia para las calidades organolépticas del vino final. La concentración de compuestos no volátiles, como son el glicerol, el ácido málico, ácido succínico o ácido α -cetoglutárico, pueden variar dependiendo de la cantidad y la fuente nitrogenada presente en los mostos. En un trabajo de *Beltran y cols. (2005)* observaron que la concentración de glicerol disminuye en fermentaciones con limitación de N. Este demuestra que la producción de glicerol es directamente proporcional a la producción de biomasa.

Muchos de los compuestos volátiles, que son los que contribuyen al aroma final del vino, también están afectados por el tipo y/o concentración de N disponible para la levadura. Los compuestos mayormente afectados son el ácido acético, los alcoholes superiores, los ácidos grasos de cadena media y corta, esteres etílicos y los esteres de acetato.

De este trabajo se desprende que hay una relación inversa entre el crecimiento o disponibilidad de N y producción de alcoholes superiores. Mientras que la mayor presencia de N parece estimular una mayor producción de esteres. Sin embargo, los resultados de este trabajo, demuestran que la concentración óptima de N para la síntesis de esteres depende de la levadura en cuestión.

El contenido de ácido acético varía según la concentración de N en el medio, habiendo una relación inversa entre el contenido de acético producido y la disponibilidad de N a concentraciones bajas o moderadas.

Los alcoholes superiores pueden aportar aromas pesados y desagradables a los vinos si se encuentran en concentraciones muy altas (excluyendo el 2-Feniletanol que tiene aroma floral). Existe una relación inversa entre el contenido en alcoholes superiores y la concentración inicial de nitrógeno. Los alcoholes superiores se pueden formar a partir de aminoácidos (vía Ehrlich) o a partir del catabolismo de los azúcares (vía anabólica). Esta última es la principal de producción de alcoholes superiores durante la

fermentación alcohólica. Cuando hay poco N disponible en el medio ($-NH_2$), hay un aumento en la síntesis de α -cetoácidos a partir de azúcares. Estos α -cetoácidos son los precursores en la síntesis de aminoácidos, pero la escasez de N α -amínico necesario en la reacción de transaminación, hace que los α -cetoácidos formados se acaben excretando en el medio en forma de alcoholes superiores. Sin embargo, en medio con alto contenido en N, el N disponible permite la biosíntesis de aminoácidos, lo que reduce el exceso de α -cetoácidos, y por tanto la producción de alcoholes superiores (Oshita y cols. 1995).

La inoculación de LSA se debe de hacer, para no tener problemas fermentativos, con una densidad de población de $4 \cdot 10^6$ cel/ml. Durante la fermentación, las células de levaduras sufren por lo menos 5 divisiones celulares (duplicando la población de levadura con cada división).

20 g/HI de LSA \longrightarrow $4 \cdot 10^6$ cel/ml aproximadamente
 $4 \cdot 10^6 \cdot 2^5$ cel/ml \longrightarrow $128 \cdot 10^6$ cel/ml

Hay investigadores que aconsejan inocular 25 g/HI de LSA

25 g/HI de LSA \longrightarrow $5 \cdot 10^6 \cdot 2^5$ cel/ml \longrightarrow $160 \cdot 10^6$ cel/ml

BIBLIOGRAFÍA

Feuillat 1994: Influence of Yeast Walls on the Behavior of Aroma Compounds in a Model Wine S. Lubbers, C. Charpentier, M. Feuillat and A. Voilley. American Society for Enology and Viticulture 1994

Sablayrolles, 1997: C. Manginot, J.M. Sablayrolles, J.L. Roustan, P. Barre. Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. Enzyme and Microbial Technology Volume 20, Issue 5, April 1997, Pages 373–380.

Novo et al. 2007: Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds, Gemma Beltran, Maite Novo, José M. Guillamón, Albert Mas, Nicolas Rozès. International Journal of Food Microbiology Volume 121, Issue 2, 31 January 2008, Pages 169–177.

Lafon-Lafourcade 1982: Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines, G. H. Fleet, S. Lafon-Lafourcade and P. Ribéreau-Gayon. Applied and Environmental Microbiology

Varela and cols 2004: Varela C, Pizarro F, Agosin E (2004) Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. Appl Env Microbiol 70:3392–3400.

Mendes-Ferreira y cols 2004: Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leao, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *J. Appl. Microbiol.* 97, 540-545.

Thailandier y cols 2007: Thailandier, P., Ramon-Portugal, F., Fuster, A. y Strehaiano P. (2007)
Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology* 24: 95-100.

Bisson y Butzke 2000: Bisson, L.F., Butzke, C.E. (2000). Diagnosis and rectifications of stuck and sluggish fermentations. *Am.J.Enol. Vitic.* 51, 168-177.

Beltran y cols 2005: Beltran, G., B. Esteve-Zarzoso, N. Rozes, A. Mas, y J. M. Guillamon.
Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J Agric. Food Chem*, 53: 996-1002, 2005.

Oshita y cols 1995: Oshita, K., M. Kubota, M. Uchida, M. Ono (1995) Clarification of the relationship between fusel alcohol formation and amino acid assimilation by brewing fusel alcohol formation and amino acid assimilation by brewing yeast using ¹³C-labeled amino acid. *Proceedings of the European Brewing Convention. Bruxelles, 387-394.*