

La nueva biotecnología enológica

por José-Vicente Gil Ponce, Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científica, Valencia.

El hombre ha producido vino y otros alimentos fermentados como el pan, la cerveza o ciertos derivados lácteos desde tiempos remotos. Los restos arqueológicos relacionados con la elaboración del vino más antiguos que se conocen datan de hace unos seis milenios. Esto implica que la biotecnología, es decir, la utilización de organismos vivos o de sus partes en procesos industriales, es casi tan antigua como el hombre, aunque, durante la mayor parte de la historia, la base de estas prácticas biotecnológicas fuera puramente empírica. Hoy en día, debido principalmente a los avances científicos de los últimos 150 años, el conocimiento empírico está siendo reemplazado por un adecuado conocimiento de los procesos que rigen estas transformaciones biotecnológicas. Además, la revolución provocada en el último cuarto de siglo por el desarrollo de las técnicas de la biología molecular y el ADN recombinante ha abierto multitud de posibilidades nuevas para el control de los procesos biotecnológicos y la mejora de los productos elaborados.

SELECCIÓN DE LEVADURAS

La levadura responsable de la mayor parte de la transformación del azúcar del mosto de uva en etanol durante la elaboración del vino es *Saccharomyces cerevisiae* (fig. 1). Sin embargo, cuando la uva llega a la bodega tras la vendimia, muchas otras especies de levaduras están presentes (además de hongos filamentosos, bacterias y virus) y, normalmente, en mayor número que *S. cerevisiae*. Las cambiantes condiciones meteorológicas, entre otros factores, provocan una gran variabilidad de la calidad y cantidad de la microbiota levaduriforme presente en la uva durante las sucesivas campañas. Este problema puede solventarse añadiendo al mosto un cultivo iniciador de levadura seleccionada que normalice la microbiota inicial y, de esta forma, dé lugar a una fermentación homogénea año tras año. Aunque los cultivos líquidos de levadura vínica han sido utilizados desde 1930 (Instituto Laclaire, Francia), las levaduras vínicas secas activas no se introdujeron hasta mediados de los años 50 y su uso no se extendió hasta finales de la década de los 70. Desde entonces, en varias zonas de Europa, Estados Unidos, Canadá, Sudáfrica y Australia se llevan a cabo fermentaciones utilizando estas levaduras como iniciadores de la fermentación. Las características que se le exigen a una levadura seleccionada son, principalmente, que produzca fermentaciones vigorosas, reproducibles, predecibles y con baja concentración de azúcar residual, que posea una buena tolerancia al etanol, a la temperatura y al anhídrido sulfuroso, que produzca un buen perfil aromático exento de aromas no deseados y, sobre todo en la elaboración de vinos espumosos, que flocule y sedimente espontáneamente para que sea fácil de eliminar una vez acabada su función.

MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN

Tras el empleo de levaduras seleccionadas como práctica habitual en muchas bodegas, inevitablemente se planteó un importante interrogante. ¿Cómo saber si la inoculación es exitosa y la levadura añadida conduce la fermentación y transmite al vino las características por las que fue seleccionada? Las técnicas clásicas de identificación, basadas en las características morfológicas y fisiológicas, aparte de ser lentas, no podían contestar a esta cuestión ya que eran incapaces de discernir entre las numerosas cepas de la especie *S. cerevisiae* presentes en el mosto o vino y, por tanto, la levadura seleccionada se hacía indistinguible del resto. El problema se resolvió con el empleo de los métodos moleculares de identificación. En concreto, el empleo de ciertos

enzimas de restricción que cortan selectivamente el ADN, y la posterior separación de los fragmentos resultantes en geles de agarosa, permitió obtener patrones de bandas correspondientes a fragmentos del ADN mitocondrial de las levaduras. Estos patrones resultaron ser distintos entre las distintas cepas de levadura vínica y, por tanto, la técnica permitió de forma rápida conocer qué cepas y en qué proporción se hallan en cada momento creciendo en los fermentadores (fig. 2). Esta herramienta de identificación permite además realizar un análisis de las distintas levaduras comerciales que se encuentran en el mercado y comprobar si las cepas que se venden como distintas lo son en realidad, pudiéndose detectar los fraudes que no mucho tiempo atrás pasaban desapercibidos. Además de esta técnica, existen otras cuya aplicabilidad varía en función de los objetivos que se persigan. Por ejemplo, la separación de los cromosomas (cariotipo) en función de su migración electroforética en geles de agarosa puede ser igualmente útil para diferenciar entre distintas cepas de *S. cerevisiae*, y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar selectivamente fragmentos del ADN ribosomal se utiliza para diferenciar entre distintos géneros y especies de levaduras que forman parte de la microbiota natural de la uva y el vino.

La utilización de este tipo de técnicas se está imponiendo con rapidez en las bodegas, ya que permiten un control microbiológico del proceso fermentativo más rápido y efectivo, sobre todo cuando se utilizan levaduras seleccionadas para producir vinos de características homogéneas año tras año.

EMPLEO DE ENZIMAS EN ENOLOGÍA

Los enzimas son aditivos alimentarios de utilización frecuente en casi cualquier alimento procesado, y el vino no es una excepción. La utilización de enzimas en enología se desarrolló a partir de la década de los 70 y, actualmente, la mayor parte de los preparados enzimáticos comerciales que se emplean en enología provienen de cultivos del hongo *Aspergillus niger*. Los avances en las técnicas de la ingeniería genética y de procesos han permitido producir enzimas más puros y en mayor cantidad. Además, mediante ingeniería de proteínas es posible optimizar algunas de las propiedades de los enzimas antes de su producción.

Los preparados enzimáticos de utilidad en enología que se pueden encontrar en el mercado varían en función del fin que se persiga. Las glucanasas se emplean para solventar problemas de filtración y clarificación originados por el *b*-glucano, y las pectinasas para disminuir la viscosidad al hidrolizar las pectinas y así provocar un aumento de rendimiento en zumo tras el prensado y también favorecer la filtración y clarificación.

Los llamados enzimas de maceración son cócteles enzimáticos compuestos fundamentalmente por pectinasas, celulasas y hemicelulasas que pretenden conseguir los efectos ya citados de las pectinasas y la degradación de los polisacáridos de las paredes celulares del grano de uva por parte de las celulasas y hemicelulasas. Con la adición de estos preparados durante la maceración (fig. 3) se consigue, además de una ganancia en el rendimiento en zumo tras el prensado, incrementar las velocidades de clarificación y sedimentación, una mejor extracción del color de los vinos tintos, un aumento del aroma y el sabor, y un mejor envejecimiento debido a incrementos en taninos y proantocianidinas.

La práctica totalidad de los preparados enzimáticos que se comercializan actualmente poseen, en mayor o menor medida, otro tipo de enzimas denominados globalmente glicosídicos. El papel de estas actividades glicosídicas es aumentar y mejorar los

aromas varietales de los vinos. Esto es posible porque los componentes del aroma de las uvas constan de compuestos volátiles libres y conjugados con azúcares. Las actividades glicosídicas, siguiendo un esquema en dos pasos, son capaces de romper los enlaces que unen los compuestos del aroma a los azúcares y, por tanto, aumentar la fracción volátil libre con la consiguiente mejora organoléptica.

El empleo de enzimas en enología ha experimentado importantes cambios en la última década y son numerosos los campos abiertos en la investigación de nuevas actividades enzimáticas, como proteasas para conseguir la estabilidad proteica de los vinos, fenol oxidasas para estabilizar el color en vinos blancos, glucosa oxidasa para obtener vinos con bajo contenido en etanol, o los enzimas implicados en la síntesis de ésteres, compuestos de suma importancia en el aroma afrutado de los vinos.

MODIFICACIÓN GENÉTICA

El uso de levaduras seleccionadas que se inoculan en los mostos para iniciar y conducir la fermentación alcohólica imponiéndose al resto de levaduras presentes, junto con el mayor conocimiento molecular de algunas rutas bioquímicas de interés biotecnológico, ha permitido hacer ingeniería genética de la levadura vínica. El razonamiento es simple: la introducción de uno o varios genes exógenos en la levadura implica la producción de una o varias nuevas características de interés industrial. Su posterior inoculación e imposición asegura la expresión de dichas características a lo largo del proceso fermentativo y, por tanto, su efecto en el producto final.

Para poder modificar genéticamente un organismo es necesario disponer de un sistema de transformación que permita introducir en él la información genética modificada *in vitro*. Durante los últimos años se han desarrollado enormemente los sistemas de transformación y, finalmente, se ha logrado construir levaduras vínicas recombinantes que portan un nuevo gen o genes integrados en el genoma de la levadura y que carecen de los genes de resistencia a antibióticos que se han empleado en los procesos previos de manipulación. Una vez que somos capaces de introducir genes en la levadura vínica, el siguiente paso consiste en conseguir su expresión durante la vinificación. La regulación de la expresión puede modularse de forma que los genes se “enciendan” o “apaguen” en función de determinadas condiciones fisiológicas o ambientales, lo que permite, por tanto, no sólo que los genes se expresen, sino que lo hagan en el momento más idóneo del proceso de elaboración.

Con las herramientas descritas, se han obtenido diversas levaduras vínicas transgénicas. Para vinos que presentan problemas de baja acidez se han construido levaduras que contienen un gen, aislado de *Lactobacillus casei*, necesario para la producción de ácido láctico. Esta levadura transgénica es así capaz de llevar a cabo la fermentación láctica y la alcohólica, con lo que se solventa el problema. Para el caso contrario, es decir, vinos con excesiva acidez, se han introducido en la levadura dos genes provenientes de *Lactococcus lactis* y *Schizosaccharomyces pombe*, que han conseguido que la levadura modificada sea capaz de llevar a cabo la fermentación maloláctica, es decir, la conversión del ácido málico en ácido láctico, la cual se traduce en una disminución de la acidez y una mayor estabilidad microbiológica del vino. Igualmente se han obtenido levaduras transgénicas que producen algunos de los enzimas mencionados anteriormente, prestando especial interés al incremento de los aromas varietales. Así, la inclusión en la levadura vínica de los genes que codifican enzimas implicados en el incremento del aroma se ha llevado a cabo con éxito (fig. 4), lo que ha permitido obtener vinos en los que se ha comprobado el aumento en los aromas florales y afrutados. De igual forma se han producido en levadura vínica actividades

enzimáticas de maceración, como celulasas y hemicelulasas, y se han logrado resultados comparables a los obtenidos tras la adición convencional de los preparados comerciales durante la vinificación. Actualmente se sigue investigando en campos como el estudio de los genes que regulan la floculación de las levaduras, la construcción de levaduras transgénicas incapaces de producir urea o la modificación de las características metabólicas para optimizar las tasas de fermentación y la producción de metabolitos de interés.

Además de la modificación genética de la levadura vínica, también se están produciendo importantes avances en la modificación genética de la materia prima, es decir, la vid. Se han conseguido eficientes sistemas de transformación que permiten introducir genes exógenos en la vid y, en una primera aproximación, se ha investigado en la producción de plantas resistentes a ciertas enfermedades víricas y fúngicas. En el futuro, a medida que se obtengan nuevos conocimientos acerca de las rutas metabólicas y su regulación en las plantas, será posible abordar con éxito cuestiones como la modificación de la composición fenólica de la uva, importante para producir vinos envejecidos de calidad, o la mejora genética de las propiedades nutricionales u organolépticas.

La técnica del ADN recombinante ha cambiado en pocos años el panorama de la biotecnología, y ha posibilitado hazañas impensables hace unas cuantas décadas. Sin embargo no se debe lanzar el mensaje de que ahora todo es posible. De hecho, de nada sirve la ingeniería genética cuando se desconoce la fisiología y el engranaje metabólico de los organismos que se quieren modificar. No es casualidad que los primeros logros industriales de la ingeniería genética se hayan producido en la mejora de los procesos en los que más ciencia básica se había acumulado durante los últimos años. En la medida en que avance la ciencia y el conocimiento básico podremos abordar la mejora genética de los organismos y, desde este punto de vista, estamos en los comienzos, pues aún es inmensa nuestra ignorancia.

http://www.uv.es/metode/anuario2001/58_2001.html