

ZYGOSACCHAROMYCES

Una levadura discreta, pero peligrosa en bodega

Miren Zumárraga y Francisca Barbero
Departamento Enología. Guserbiot, S.L.U.



La presencia de levaduras del género *Zygosaccharomyces* en el vino puede convertirse en un serio problema para la bodega. Debido a su osmotolerancia y a su elevada resistencia a conservantes convencionales, pueden alcanzar niveles de contaminación elevados a partir de poblaciones iniciales muy bajas y causar alteraciones en el vino una vez embotellado (exceso de CO₂, turbidez, sedimentos, etc.). La detección e identificación es un punto clave para la prevención y control en bodega de esta levadura. La limpieza y desinfección de las instalaciones, junto con una adecuada filtración, permitirán asegurar la calidad del producto, evitando así las posibles pérdidas económicas que puedan derivarse de los vinos defectuosos

Desde el punto de vista microbiológico, las levaduras (principalmente, *Saccharomyces cerevisiae*) juegan el papel más destacado en la transformación del mosto de uva en vino. Sin embargo, también existen especies de levadura que, presentes en el producto final y dependiendo de su concentración, pueden alterar la calidad organoléptica del vino, con las consecuentes pérdidas económicas que conlleva.

Concretamente, las levaduras del género *Zygosaccharomyces* tienen un largo historial, como contaminante, en la industria alimenticia (concentrados de frutas, bebidas, mermeladas, gelatinas, conservas, salsas, etc.). Se caracterizan por su resistencia a conservantes de uso común en alimentación (ácido sórbico, ácido benzoico o SO₂), su extrema osmotolerancia y su capacidad para fermentar vigorosamente azúcares de tipo hexosa (Thomas y Davenport, 1985).

EN SÍNTESIS...

1. *Zygosaccharomyces* es una levadura alterante del vino que se caracteriza por su elevada resistencia a conservantes convencionales, su extrema osmotolerancia y su capacidad para fermentar vigorosamente azúcares de tipo hexosa, preferentemente fructosa
2. La alteración por estas levaduras puede provocar exceso de producción de CO₂, turbidez, aparición de partículas, películas en la superficie y sedimentos en las botellas, así como elevada acidez volátil
3. Actualmente, la detección y/o identificación de *Zygosaccharomyces* en vino es posible mediante métodos tradicionales de caracterización morfológica y fisiológica, y técnicas moleculares basadas en el ADN
4. Una sola célula de *Zygosaccharomyces* por botella es capaz de alterar la calidad de un vino, por lo que la detección de esta levadura se antoja imprescindible para su prevención y control
5. El embotellamiento es el punto más crítico para la prevención, por lo que se recomienda una exhaustiva filtración por membrana y una correcta esterilización de las instalaciones

La presencia de la levadura del género *Zygosaccharomyces* constituye un indicador de posibles futuros problemas de alteraciones (exceso de CO₂, turbidez, sedimentos, elevada acidez volátil, etc.).

Por eso, es imprescindible la utilización de metodologías rápidas y precisas para determinar la presencia de esta levadura en el vino.

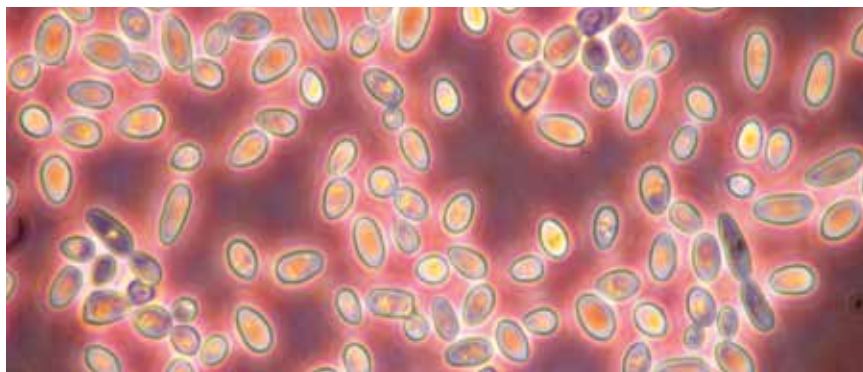


Figura 1. *Zygosaccharomyces bailii* al microscopio (x 400)

Taxonomía y morfología

Zygosaccharomyces es un género de levaduras perteneciente a la familia *Saccharomycetaceae*. La que actualmente conocemos como *Zygosaccharomyces bailii* fue descrita, por primera vez, en 1895, por Linder como *Saccharomyces bailii*, y no fue hasta 1983 cuando se adoptó el actual género *Zygosaccharomyces* que incorpora once especies diferentes (Barnett y cols., 1983). Entre estas especies, *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. rouxii*, *Z. florentinus* y *Z. lentus* han sido aisladas a partir de mosto de uva y vino, aunque *Z. bailii* representa, sin duda, la especie alterante del vino más frecuente y peligrosa (Fugelsang 1997).

La morfología de las células y colonias varía según el medio de aislamiento. Barnett y cols. (1983) describen *Z. bailii* con forma entre ovalada y cilíndrica, con un tamaño de 4,5-11,5 µm x 3,5-6,5 µm.

Características fisiológicas

La resistencia de las diferentes especies de *Zygosaccharomyces* a conservantes ácidos orgánicos débiles como el ácido sórbico, el ácido benzoico, el ácido acético y al ácido cinámico, entre otros, es bien conocida (Steels y cols., 1999; Martorell, 2006) Además, estas levaduras también muestran una extraordinaria resistencia al SO₂, un antioxidante y antimicrobiano ampliamente utilizado en las bodegas.

Las cepas de *Zygosaccharomyces* son extraordinariamente tolerantes al alcohol, creciendo incluso en vinos con un contenido de alcohol del 18% (v/v), lo que explica la elevada frecuencia de aislamiento en vinos embotellados refermentados (Thomas y Davenport, 1985). Además tienen la capacidad de crecer

en medios con pH en torno a 2,2; en cuanto a la temperatura de crecimiento se refiere, *Z. lentus* es capaz de crecer a 4 °C mientras que, en el otro extremo, *Z. bailii* llega a tolerar hasta 70 °C en un medio con alto contenido de glucosa (3-3,5 M) (Martorell, 2006).

La tabla 1 resume los diferentes conservantes y las concentraciones de tolerancia de las levaduras del género *Zygosaccharomyces* (Fugelsang, 1997).

Zygosaccharomyces es una levadura osmotolerante, lo cual significa que es capaz de vivir en ambientes con elevadas concentraciones de solutos, en este caso azúcares. En concreto, *Z. rouxii* muestra la mayor tolerancia, pudiendo crecer a concentraciones de hasta 50-70% (w/w) de azúcar (James y Stratford, 2003; Tofalo y cols., 2009).

Una de las características metabólicas más interesantes de *Z. bailii* es que, en una mezcla de glucosa y fructosa, fermenta preferentemente la fructosa. De hecho, en un estudio reciente (Santos y cols., 2008), se estudia el comportamiento de una cepa de *Z. bailii* para su posible utilización en paradas de fermentación. Debido a su carácter fructofílico y su elevada resistencia tanto al etanol como al ácido acético, condiciones todas ellas presentes en una parada de fermentación, constituye una buena candidata para la reactivación, siempre bajo un estricto control de la población y tomando las medidas necesarias para evitar posibles problemas de alteración.

Alteraciones en el vino

Zygosaccharomyces bailii raramente se encuentra durante la fermentación alcohólica, probablemente porque, debido a su baja tasa de crecimiento, es incapaz

de competir con *Saccharomyces cerevisiae*. Por el contrario, a menudo aparece en vinos embotellados, dominando la población de levaduras, como consecuencia de su tolerancia a ambientes extremos como el del vino (concentración de alcohol, bajo pH, presencia de ácidos, etc.).

El signo más visible de la alteración por levaduras es el exceso de producción de CO₂, debido a la fermentación vigorosa, pudiendo producir incluso la explosión de botellas de vidrio. Las células de levadura alterantes en el vino pueden provocar turbidez, aparición de partículas, películas en la superficie y sedimentos en las botellas. Además, se ha descrito la síntesis de otros compuestos como el ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, acetaldehído y glicerol, dando lugar a una elevada acidez volátil (Fugelsang y Edwards, 2006). Sin embargo, para el consumidor, los aromas y sabores desagradables, derivados de la producción de pequeñas moléculas volátiles, no se perciben tan evidentemente (Martorell, 2006). Para detectar los aromas y olores alterantes, la población de levaduras en el vino debería ser de al menos 105 células/ml (Boekhout y Phaff, 2003).

Aunque ninguna especie de *Zygosaccharomyces* es patógena para el ser humano, sí que se ha atribuido algún desorden gastrointestinal menor por consumo de bebidas contaminadas por esta levadura (Stratford, 2005). De hecho, parece que estos efectos se deben más a los metabolitos sintetizados por las levaduras que a las propias levaduras en sí. En general, los vinos blancos y rosados tienen un mayor riesgo de alteración que los vinos tintos. Según Tho-

mas (1993), los compuestos fenólicos y los antocianinos podrían inhibir el crecimiento de *Zygosaccharomyces*.

Zygosaccharomyces en la bodega

A pesar de que los datos de la bibliografía sugieren una baja prevalencia de *Zygosaccharomyces* en vino, en opinión de Loureiro (2003) la utilización de métodos de detección inadecuados puede contribuir a una subestimación de esta levadura en las bodegas.

Las levaduras de *Zygosaccharomyces* raramente se encuentran en uvas sanas. Sin embargo, su presencia es bien conocida en bodegas, sobre todo en aquellas que procesan vinos dulces y achampañados que usan concentrados o zumos de uva (Loureiro y cols., 2003). Una vez presentes en la bodega, los sitios de difícil desinfección en la línea de procesado sirven como reservorio principal para los microorganismos y, desde aquí, es posible la contaminación continua del producto. A bajas temperaturas de almacenamiento, el microorganismo es capaz de crecer lentamente y, a menudo, de manera inapreciable. Posteriormente, el calentamiento durante el transporte podría estimular las poblaciones previamente reprimidas.

El embotellado del vino es una operación crítica, ya que es la última fuente de contaminación antes de sacar el vino al mercado. En la mayoría de los vinos tintos secos, el embotellado no es un problema serio pero sí que puede serlo en vinos con azúcar residual.

A diferencia de otros microorganismos contaminantes del vino, *Z. bailii* puede crecer hasta poblaciones alteran-

tes, partiendo de una sola célula en 5-10 ml (Fugelsang, 1997). Es más, Thomas (1993) afirma que una sola célula de *Zygosaccharomyces* por botella es capaz de alterar la calidad de un vino. Los niveles aceptables varían en función del contenido de azúcar residual en el vino, y el tiempo hasta su consumo. Así, para vinos con más de 5 g/l de azúcar residual se aceptaría un máximo de 2 UFC/250 ml mientras que, en vinos secos blancos y tintos, se permitirían de 5 a 15 UFC/100 ml, según la bodega. En el caso de vinos que se consumen rápidamente, se admiten niveles mayores, hasta 100 UFC/ml (Martorell, 2006).

La Oficina Internacional del Vino y la Viña (OIV), no define el nivel máximo de contaminación por levaduras en el vino. La única condición es que la botella debe estar limpia, sin turbidez (<102-103 UFC/ml) (Loureiro y cols., 2003).

Métodos de detección

A fin de prevenir o, en el peor de los casos, reducir la probabilidad de la alteración del vino por levaduras y particularmente por especies género *Zygosaccharomyces*, en primer lugar es esencial la detección de su presencia en el vino y, en segundo lugar, la identificación precisa, preferiblemente a nivel de especie.

Existen variedad de métodos para la detección y/o identificación de levaduras del género *Zygosaccharomyces* en vino, desde los métodos más tradicionales y rutinarios de caracterización morfológica y fisiológica, hasta las más modernas técnicas basadas en el ADN.

Caracterización morfológica y fisiológica

Tradicionalmente, la identificación de las levaduras, en general, se ha llevado

Conservante	Concentración tolerada
SO ₂	> 3 mg/l SO ₂ molecular (a pH 3,4)
Ácido sórbico	600-800 mg/l
Ácido benzoico	600-1.000 mg/l
Ácido acético	20-25 g/l
Etanol	>18% (v/v)

Tabla 1. Tolerancia de las levaduras del género *Zygosaccharomyces* a diferentes conservantes

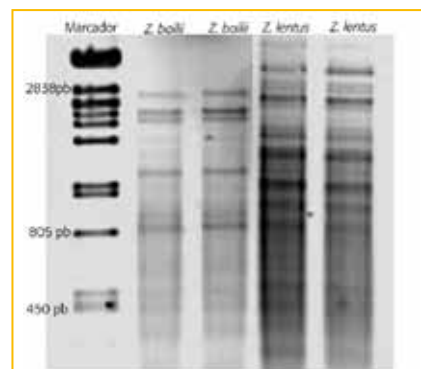


Figura 3. Perfiles de DNA mitocondrial de *Zygosaccharomyces baillii* y *Zygosaccharomyces lentus*

a cabo según sus características morfológicas y sus propiedades fisiológicas y bioquímicas.

Sin embargo, este tipo de identificación requiere un trabajo muy intenso y tiempo, ya que los resultados a menudo son difíciles de interpretar y las características pueden variar en función de las condiciones de cultivo, llevando a identificaciones incorrectas. Además, la diferenciación entre especies del mismo género puede resultar muy difícil, sobre todo en aquellas especies con características fisiológicas generales muy similares.

Actualmente, en el mercado existe una variedad de sistemas de identificación manual y automatizada, basados en las características fenotípicas de las diferentes levaduras, incluyendo las del género *Zygosaccharomyces*. Se trata de métodos bioquímicos basados en el análisis de diferentes actividades enzimáticas, proteínas totales, patrones de isoenzimas y análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases, entre otros. Sin embargo, el éxito de estas técnicas depende de la experiencia de la persona que lo analiza, así como del estado metabólico de la célula en el momento del test y, a menudo, no permite discriminar entre especies (Boekhout y Phaff, 2003).

Cultivos celulares

El medio de cultivo específico para la detección y cuantificación diferencial de *Z. bailii* ZDM (medio diferencial de *Z. bailii*) contiene un medio base para levaduras suplementado con una mezcla de glucosa (0,1% w/v) y ácido fórmico (0,2% w/v) como única fuente de carbono y energía, y la incorporación de verde de bromocresol (0,005% w/v) como indicador ácido-base. Bajo estas condiciones, sólo las cepas de *Z. bailii* pueden alcalinizar el medio, asociado con el cambio de color de las colonias de verde a azul (respuesta positiva) (Schuller y cols., 2000). Sin embargo, este medio sólo permite la detección de la especie *Z. bailii*. En el caso de *Z. rouxii*, al ser una especie más osmotolerante, se suele emplear un medio con 40-60% (w/v)

de glucosa que proporciona una presión osmótica óptima para seleccionar específicamente esta especie (Boekhout y Phaff, 2003). De todas maneras, a pesar de ser métodos sencillos y poco costosos, el crecimiento de las células es lento. Además, puede tener el inconveniente de que, si la población de levaduras presente inicialmente en el vino es baja, puede pasar desapercibida y no detectarla, aunque sea más que suficiente para alterar el vino tras el embotellamiento. En estas circunstancias, se

amplificados mediante PCR específicos para cada especie y que permiten su comparación con los perfiles disponibles en una base de datos "on line" (<http://yeast-id.com/>) (Guillamón y cols., 1998).

A veces, no es suficiente con la identificación de especies y es necesario identificar la levadura a nivel de cepa. El análisis de restricción del DNA mitocondrial, desarrollado por Querol y cols. (1990), ha sido aplicado con éxito para diferenciar cepas de *Zygosaccharomyces* presentes en vino (Esteve-Zarzoso y cols., 2003). Aunque la técnica permite la diferenciación intraespecífica, en la mayoría de los casos los patrones son muy similares, por lo que se debe profundizar más en este aspecto, desarrollando u optimizando métodos que proporcionen un mayor poder discriminatorio.

Aparte de éstas, existen otras muchas técnicas moleculares frecuentemente utilizadas para la detección de cepas de levadura en alimentos y bebidas como la RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic ADN-PCR), la PCR de micro y minisatélites o la amplificación de secuencias delta, entre otras. Sin embargo, por el momento, no han sido aplicadas para la identificación de *Zygosaccharomyces* en vino.

Recientemente, también se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real (RT-PCR) que permiten la cuantificación, en pocas horas, de células de *Zygosaccharomyces* con una elevada especificidad y sensibilidad.

Prevención y control en bodega

La detección y el seguimiento de *Zygosaccharomyces* en la bodega de forma rutinaria puede ser una práctica de gran utilidad para resolver problemas de contaminación y evitar pérdidas económicas importantes. Aún más si se tiene en cuenta que la contaminación inicial con un bajo número de células puede ser la causa de una alteración posterior del producto.

Además, es de gran importancia poder identificar el origen de la contaminación cuanto antes para evitar su propagación a toda la bodega.



Figura 2. Colonias de *Zygosaccharomyces bailii*

recomienda la filtración por membrana o la inclusión de un paso de enriquecimiento (Pitt y Hocking, 1997).

Métodos moleculares

El progreso experimentado durante los últimos 20 años en el área de la biología molecular ha permitido el desarrollo de nuevos métodos alternativos, que permiten la identificación de levaduras a nivel de especie e incluso de cepa, de manera rápida y fiable. Sin embargo, no permiten distinguir entre las células viables de las muertas, por lo que se antoja necesaria la combinación de diferentes métodos para su cuantificación.

Entre los métodos de detección e identificación de *Zygosaccharomyces* en vino a nivel de especie, cabe destacar el análisis de perfiles de restricción (RFLP) de las diferentes regiones ribosómicas. Mediante esta metodología, se generan patrones de restricción de los fragmen-

El hecho de que estas levaduras sean extremadamente resistentes a los conservantes hace que la adición de dosis elevadas, pero subletales, incremente su competitividad. De hecho, se considera una buena práctica de manipulación añadir el conservante justo antes del embotellamiento y limitar la circulación del mosto de uva concentrado a tuberías y bombas específicas. Sin embargo, la resistencia de *Zygosaccharomyces* a la mayoría de los conservantes convencionales, al SO₂ e incluso al calor, puede hacer que, en muchos casos, el tratamiento con estos aditivos no sea suficiente para prevenir la alteración del vino.

En este aspecto, los resultados obtenidos por Martorell y cols. (2007) en una empresa de la industria alimentaria indican que la alteración por *Z. bailii* podría prevenirse mejor mediante el uso de agentes biocidas.

Tal y como se ha comentado, el embotellamiento es un punto crítico para la prevención de *Zygosaccharomyces*. Por ello, la mejor solución para el problema de contaminación del vino en el embotellado es una correcta filtración por membrana y un embotellamiento estéril. Si el sistema de esterilización en el embotellado no es muy intenso, la presencia de *Zygosaccharomyces* puede convertirse en un serio problema para la bodega.

A menudo, la causa de la contaminación del producto reside en que los agentes químicos esterilizantes, o el agua o el vapor utilizados no hayan alcanzado el tiempo ni la temperatura requerida para la destrucción celular. Por ello, es recomendable hacer una limpieza exhaustiva de todo el equipamiento después de su uso, y no justo antes.

Asimismo, cuando el oxígeno se introduce en el vino durante el embotellado también se puede favorecer el creci-

miento de *Zygosaccharomyces*, ya que se ha observado que *Z. bailii* y *Z. bisporus* requieren la presencia de oxígeno para la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides que constituyen la membrana (Malfeito-Ferreira y cols., 1989; Rodrigues, 2001).

La prevención y control en bodega de esta levadura, al igual que en otros casos de contaminantes de origen microbiano, mediante un programa de limpieza y desinfección adecuados y un control microbiológico del vino embotellado, permitirán asegurar la calidad del mismo y mantener la confianza del consumidor, además de evitar las pérdidas económicas que puedan derivarse de los vinos defectuosos.

>> Referencia bibliográfica de autores

La bibliografía completa de este artículo puede ser solicitada en vinoteq@rbi.es