

LA EXPRESIÓN AROMÁTICA DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA



Logroño, 14 de Junio de 2007

Daniel Ramón Vidal
Biópolis S.L.



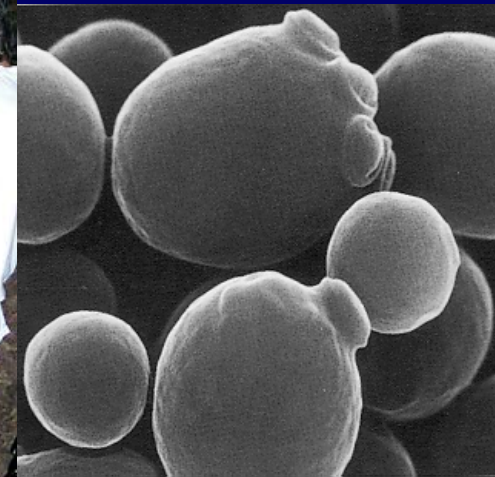
LA BIOTECNOLOGÍA DEL VINO



Vitis vinifera

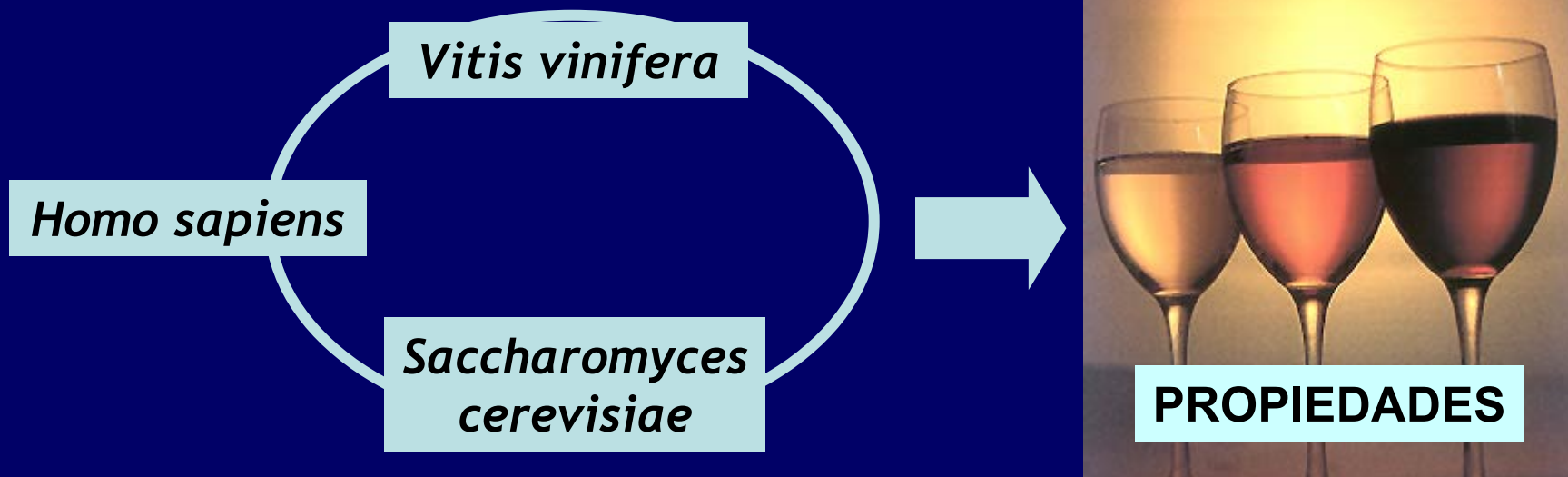


Homo sapiens

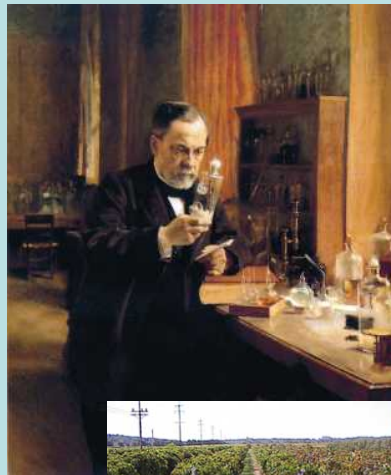


Saccharomyces cerevisiae

LAS INTERACCIONES



PROPIEDADES DEL VINO



- ✓ *Propiedades físico-químicas*
- ✓ *Propiedades organolépticas*
- ✓ *Propiedades funcionales*



**FALTA DE
CONOCIMIENTO CIENTÍFICO**

EL AROMA DEL VINO



- ✓ Viene determinado por compuestos de naturaleza volátil (alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas e hidrocarburos)
- ✓ Todos estos compuestos tienen umbrales de percepción muy bajos (entre 0.1 mg/l y 0.1 fg/l)
- ✓ Están presentes a concentraciones muy bajas en el producto (entre 10 mg y 0.1 µg/Kg)
- ✓ Dichas concentraciones varían en función de distintas variables (clima, suelo, riego, momento de la vendimia, variables del proceso de fermentación u operaciones de procesado, entre otras)
- ✓ La interrelación entre centenares de ellos da la percepción final de aroma



CLASIFICACIÓN DE AROMAS



Primario



Secundario



Terciario

EL AROMA VARIETAL O PRIMARIO

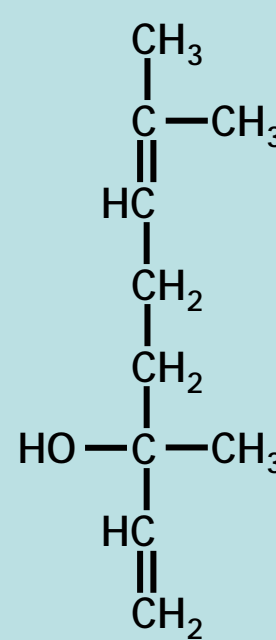


- ✓ *En la fase final de maduración de la uva los compuestos aromáticos se acumulan en la piel y en la pulpa de la baya; son ésteres, aldehídos, cetonas y alcoholes*
- ✓ *Los ésteres que más contribuyen al aroma son ésteres del ácido acético y de alcoholes de cadena corta*
- ✓ *Los aldehídos son importantes desde el punto de vista cuantitativo, se forma enzimáticamente; destacan el trans-2-hexenal y el n-hexenal*
- ✓ *En la fracción cetónica son importantes las 2- y 3-alcanonas*
- ✓ *Entre los alcoholes destacan n-alcoholes con 4 a 11 átomos de carbono, alcoholes insaturados y ramificados de cadena corta y compuestos aromáticos como el alcohol bencílico, el 1- y 2-feniletanol y los monoterpenos*

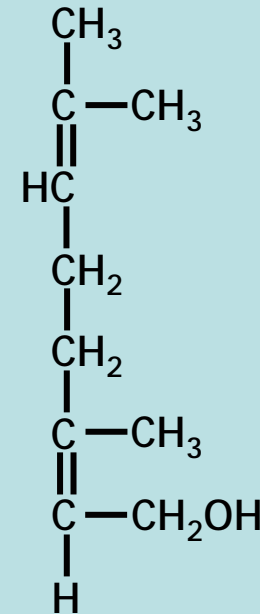
EL CASO ESPECIAL DE LOS TERPENOS



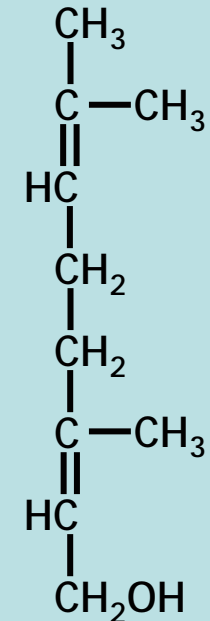
- ✓ *Muchos compuestos volátiles tienen efecto tóxico sobre la célula vegetal por lo que están presentes en forma glicosilada no volátil*
- ✓ *Los terpenos son los compuestos aromáticos que más abundan como forma glicosilada no volátil*
- ✓ *El comolejo terpeno-azúcar está formado por un disacárido del que siempre forma parte una molécula de glucosa que es la que forma el enlace con el monoterpeno*
- ✓ *El segundo azúcar suele ser una arabinosa, una ramnosa o una apiosa; los monoterpenos más comunes son el geraniol, el nerol y el linalol*
- ✓ *Esta fracción es potencialmente aromática al no ser volátil*



Linalol



Nerol

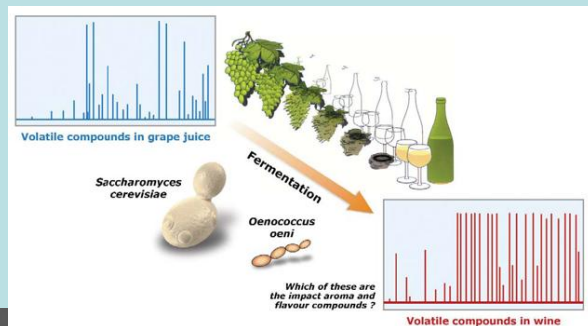


Geraniol



Terpenos unidos
(sin aroma)

EL AROMA SECUNDARIO O DE FERMENTACIÓN



- ✓ *Se debe al metabolismo de la levadura vínica durante la fermentación alcohólica*
- ✓ *Son alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, fenoles, compuestos orgánicos sulfurados y terpenos*
- ✓ *Destacan algunos alcoholes alifáticos (1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-a-butanol o 3-metil-1-butanol) y aromáticos como el 2-feniletanol*
- ✓ *También ésteres como el acetato de etilo, aldehídos como el acetaldehído o cetonas como la acetona, la acetoína y la 2,3-pentadiona*
- ✓ *Los compuestos orgánicos volátiles que contienen azufre tienen mucha relevancia porque tienen un bajo umbral de detección; destacan el 4-mercapto-4-metil pentanona, el 3-mercaptohexanol y el 3-mercaptohexil acetato*
- ✓ *Los terpenos se forman a partir de los precursores glicosilados del mosto mediante reacciones glicosídicas*
- ✓ *Todos ellos se forman a partir de precursores presentes en el mosto*

EL AROMA TERCIARIO O BOUQUET DE MADURACIÓN



- ✓ *Se da durante el envejecimiento de los vinos; en el envejecimiento en barrica se da un bouquet de oxidación y en el envejecimiento en botella un bouquet de reducción*
- ✓ *En el de oxidación se produce la síntesis de acetaldehídos y acetales al mismo tiempo que se extraen de la barrica compuestos fenólicos que provienen de su lignina o lactonas como la 3-metil- γ -octalactona*
- ✓ *En el de reducción se dan reacciones entre derivados de norisoprenoides, carbohidratos y compuestos azufrados reducidos*
- ✓ *En general durante el envejecimiento desaparecen los ésteres de acetato, los alcoholes superiores y los alcoholes monoterpénicos y aumenta el furfural, el acetato de etilo, algunos ésteres etílicos y el óxido de nerol, hotrienol, hidroxilinalol e hidroxicitronelol*



¿ES POSIBLE MEJORAR EL AROMA?



PRIMARIO



- ✓ *Mejora de la variedad de uva*
- ✓ *Recepción de la uva (antioxidantes, CO₂)*
- ✓ *Normalización del mosto*

SECUNDARIO



- ✓ *Nuevas cepas de levadura*
- ✓ *Mejora de las propiedades de las cepas*
- ✓ *Precusores en el mosto (nutrición)*

TERCIARIO

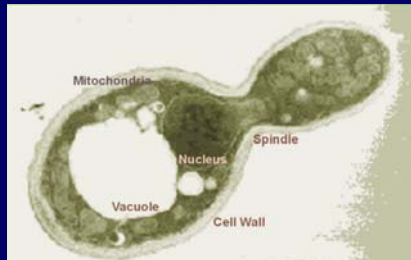


- ✓ *Nuevos materiales barrera*
- ✓ *Direccionalidad de las reacciones*

TIPOS DE LEVADURAS VÍNICAS DEPENDIENDO DEL POTENCIAL AROMÁTICO



LEVADURAS VARIETALES
Expresan aromas primarios

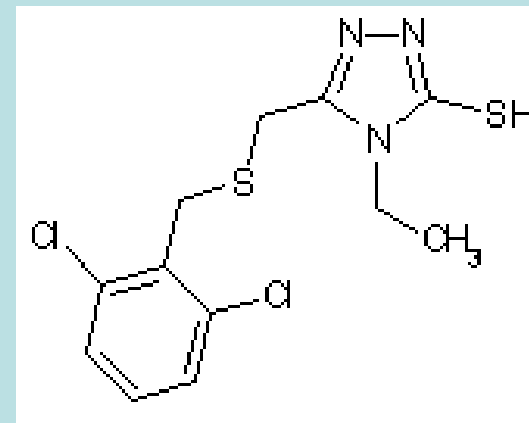
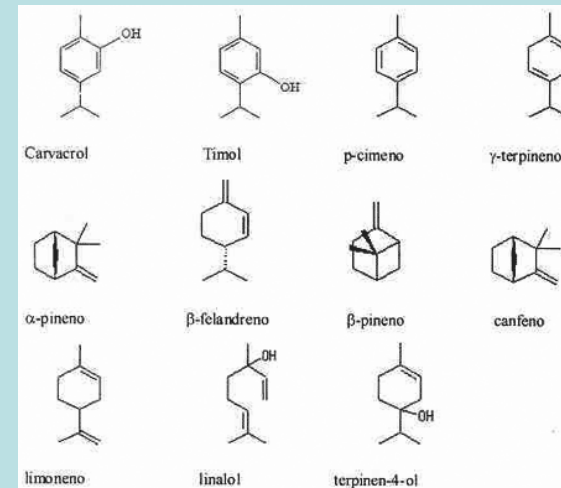


LEVADURAS AROMÁTICAS
Producen aromas de fermentación

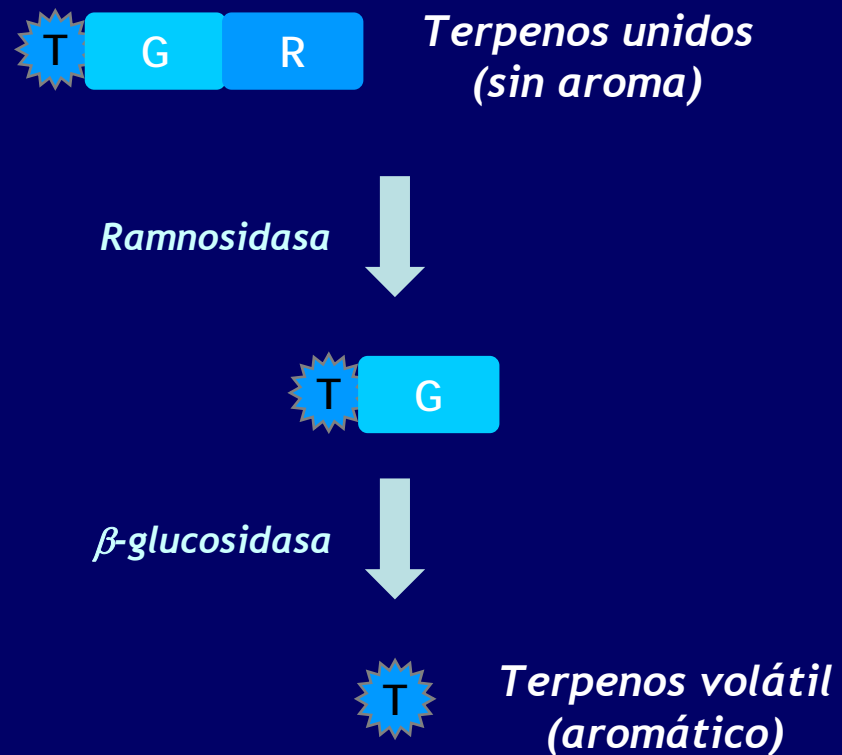
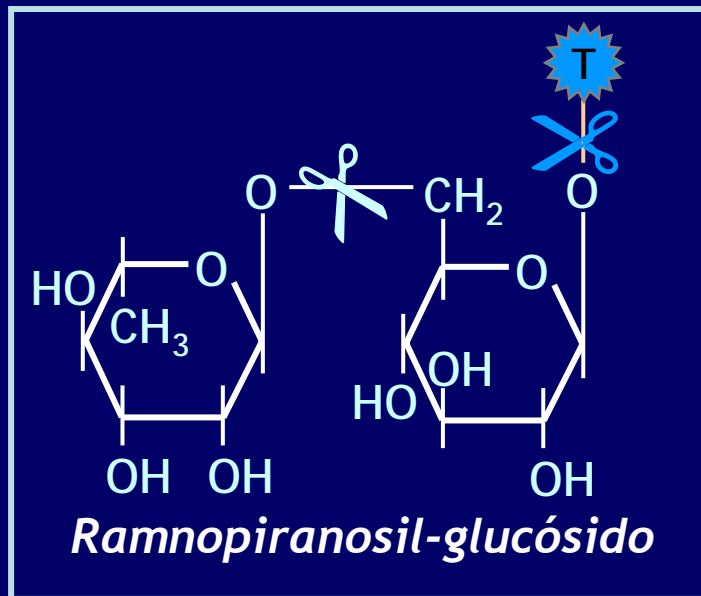
EMPLEO DE LEVADURAS VARIETALES



- ✓ *Expresan y valoran los aromas primarios que vienen del mosto de uva*
- ✓ *Bioquímicamente dependen de que la levadura tenga genes que expresan enzimas capaces de liberar precursores aromáticos presentes en la uva*
- ✓ *Dos grandes grupos de ejemplos: liberación de terpenos aromáticos y de compuestos sulfurados*



EMPLEO DE LEVADURAS VARIETALES PARA INCREMENTAR TERPENOS



ESTRATEGIAS PARA LA LIBERACIÓN DE TERPENOS



ADICIÓN DE
ENZIMAS
EXÓGENOS



*Inhibición de actividades
Destrucción de las enzimas*

USO DE
LEVADURAS
SELECCIONADAS



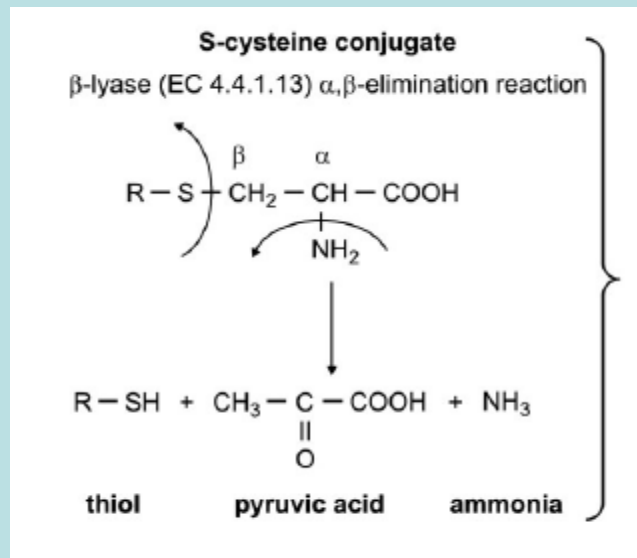
*Número reducido de cepas
Inhibición parcial*

EMPLEO DE
LEVADURAS
TRANSGÉNICAS



Rechazo social

LEVADURAS VARIETALES PARA INCREMENTAR COMPUESTOS SULFURADOS



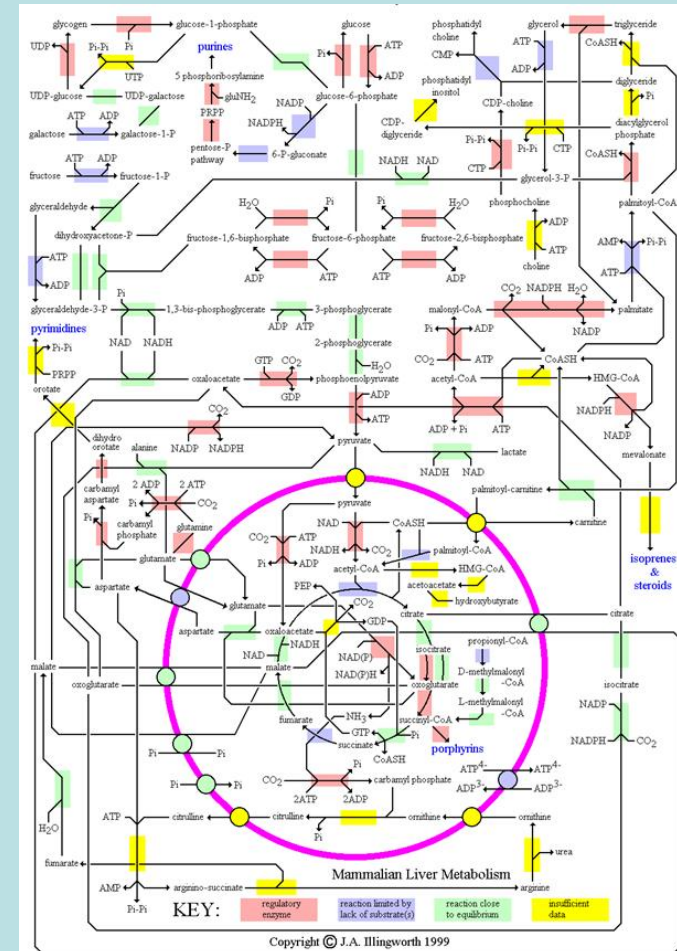
4-mercapto-4-metilpentanona (4MMP)
3-mercaptohexanol (3MHA)

- ✓ *Se forman a partir de conjugados a cisteína no volátiles presentes en el mosto por la acción de liasas que no se venden comercialmente*
- ✓ *En S. cerevisiae hay al menos cuatro genes que pueden estar implicados en la liberación de 4MMP desde Cys-4MMP*
- ✓ *Hay cepas de levaduras vínicas comerciales con mayor actividad liasa (ES181)*
- ✓ *Hay cepas transgénicas que expresan una triptofanasa de E. coli con elevada actividad tiolasa*

EMPLEO DE LEVADURAS AROMÁTICAS

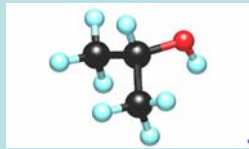


- ✓ Llevan a cabo síntesis de novo de compuestos volátiles, sobre todo ésteres, acetatos, alcoholes superiores y aldehídos
- ✓ Para que funcionen correctamente se precisa activar las rutas bioquímicas que conducen a la síntesis de estos productos
- ✓ Para la síntesis correcta de muchos de estos compuestos se precisa una buena fuente de aminoácidos

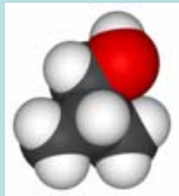


INTERMEDIARIOS METABÓLICOS RELEVANTES

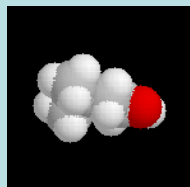
ALCOHOLES SUPERIORES



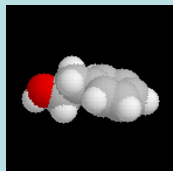
Propanol



Isobutanol



Alcohol
isoamílico



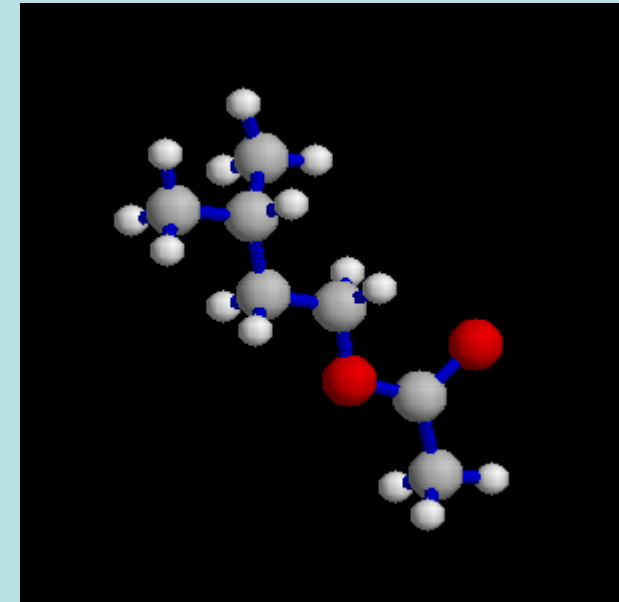
2-feniletanol

- ✓ *Para sintetizar todos estos metabolitos con capacidad aromática, los intermediarios metabólicos relevantes son los alcoholes superiores y los ésteres*
- ✓ *Los alcoholes superiores se producen en cantidades elevadas, su olor es penetrante y a concentraciones superiores a los 400 mg/l pueden producir efectos negativos en la percepción sensorial*
- ✓ *Aunque per se tienen efecto sobre las propiedades organolépticas del vino, su importancia tecnológica radica en ser precursores de los ésteres de acetato*
- ✓ *Los más relevantes se producen a partir de aminoácidos*

INTERMEDIARIOS METABÓLICOS RELEVANTES ÉSTERES



- ✓ *En general se sintetizan en pequeñas cantidades y tienen fragancias aromáticas agradables*
- ✓ *Para el aroma del vino los más importantes son los ésteres de acetato de alcoholes superiores que se asocian al aroma frutal, floral y fresco de los vinos jóvenes*
- ✓ *Son productos típicos del metabolismo secundario de las levaduras; su síntesis no suele ser específica, de forma que interaccionan entre sí para dar un matiz de aroma que se produce por la sinergia entre ellos*
- ✓ *Los más relevantes son el acetato de etilo, el acetato de isoamilo, el acetato de isobutilo y el acetato de 2-feniletilo*



ALGUNOS ALCOHOLES SUPERIORES PRODUCIDOS POR LA LEVADURA VÍNICA



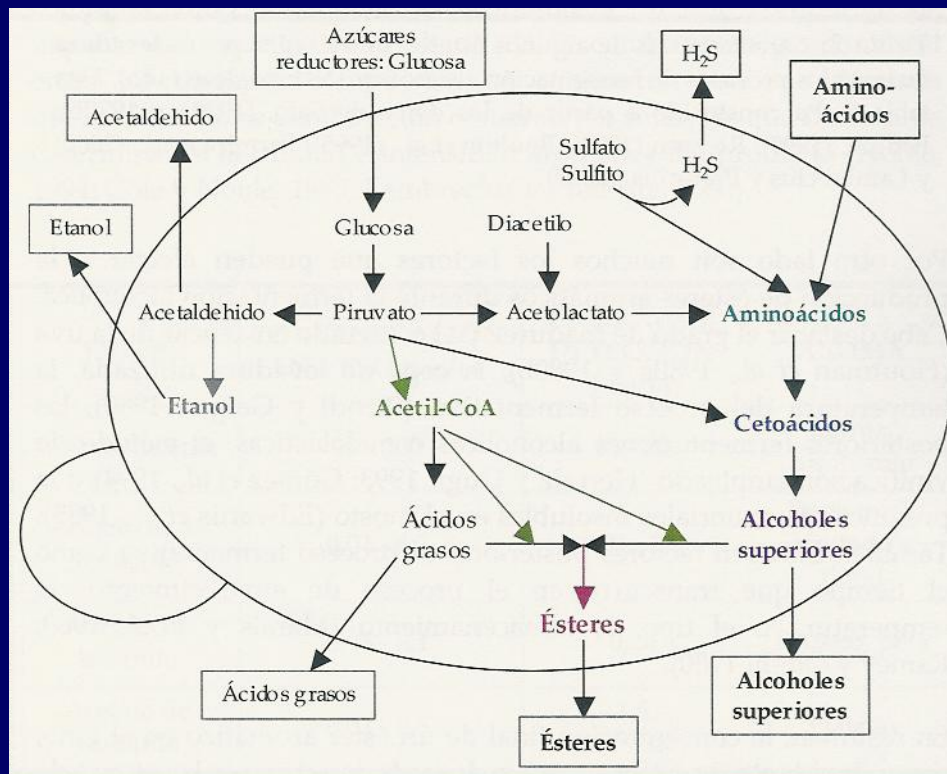
ALCOHOL	AMINOÁCIDO PRECURSOR	CONCENTRACIÓN (mg/l)	AROMA
Propanol	Treonina 2-amino-butírico	9-68	Disolvente
Isobutanol	Valina	9-28	Alcohol
Alcohol isoamílico	Leucina	45-490	Mazapán
2-feniletanol	Fenilalanina	10-180	Floral

ALGUNOS ÉSTERES SUPERIORES PRODUCIDOS POR LA LEVADURA VÍNICA



ÉSTER	CONCENTRACIÓN (mg/l)	AROMA
Acetato de etilo	10-100	Disolvente
Acetato de 2-feniletilo	0.01-4.5	Rosa, afrutado
Acetato de isoamilo	0.03-8.1	Plátano, pera
Acetato de isobutilo	0.01-0,8	Plátano
Acetato de hexilo	0-4.8	Manzana madura
Butanoato de etilo	0.01-3	Floral, afrutado
Caproato de etilo	Trazas-3.4	Manzana, plátano

SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN

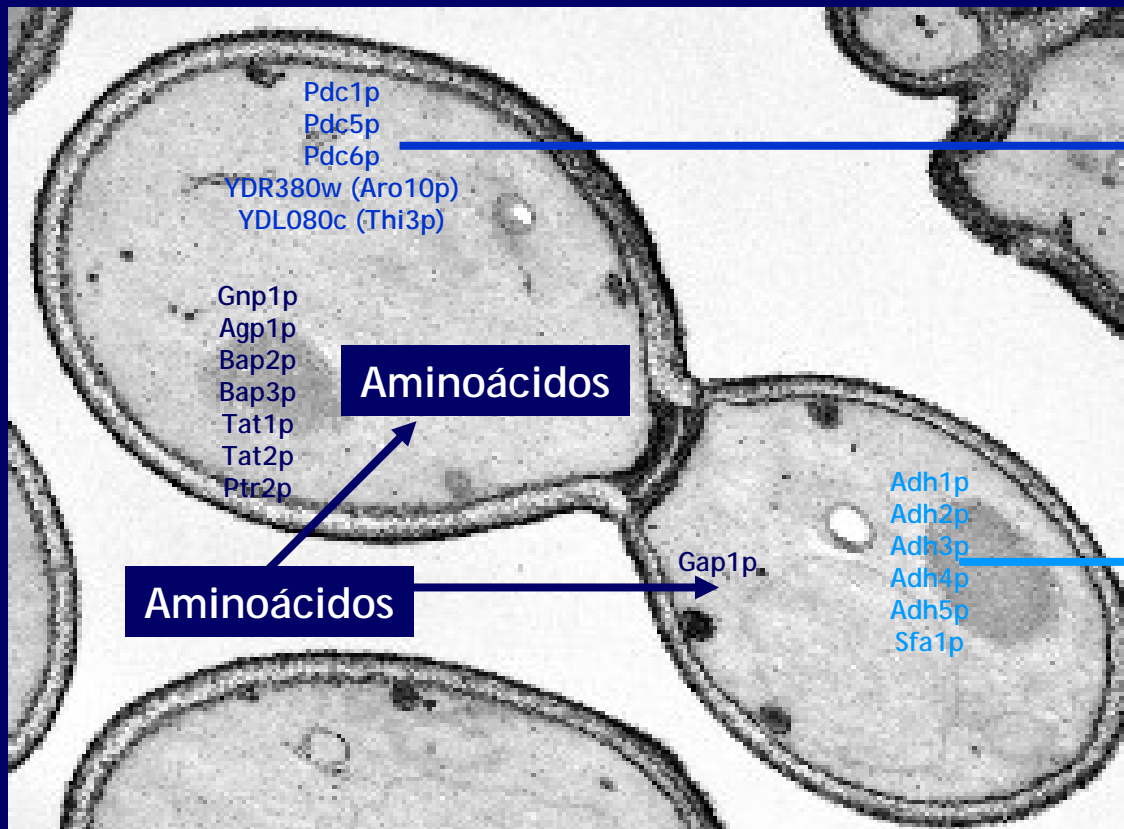


✓ *Formación*

✓ *Degradación*

✓ *Difusión de membrana*

GENES Y ENZIMAS IMPLICADOS



Descarboxilación

Reducción

ALCOHOL SUPERIOR

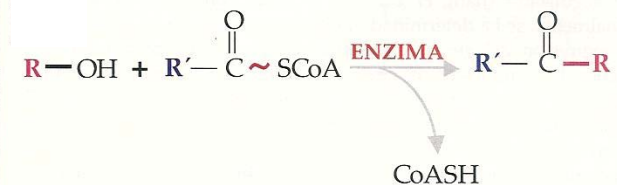
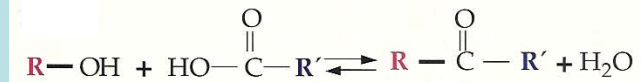
Aminoácidos

Aminoácidos

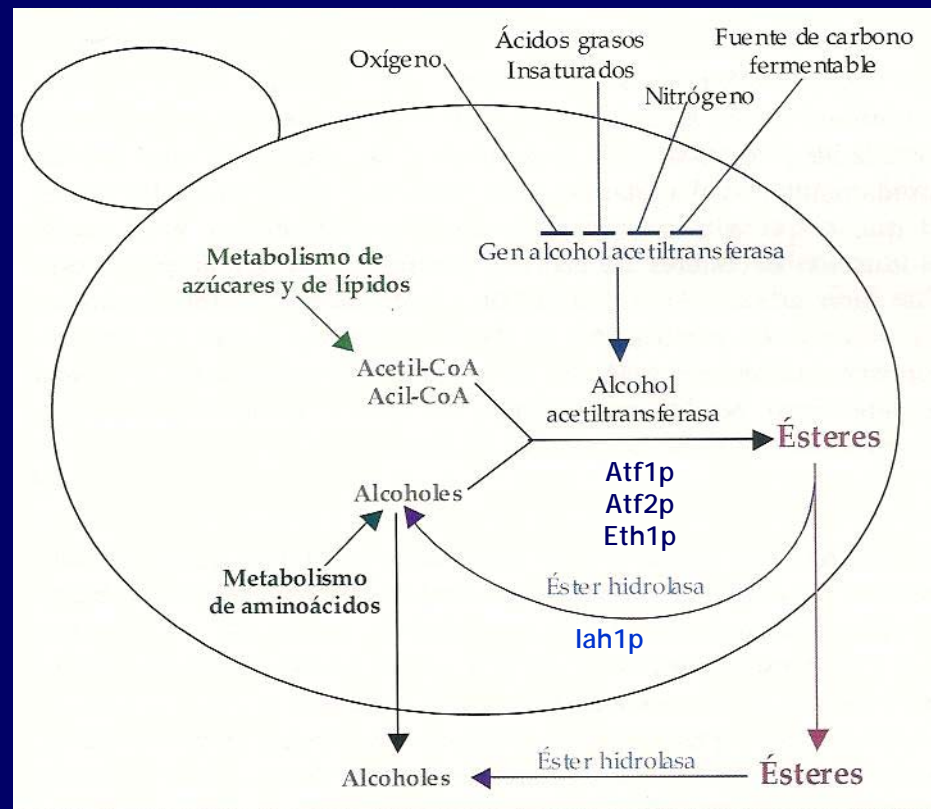
LA SÍNTESIS DE ÉSTERES AROMÁTICOS



- ✓ *Puede haber síntesis por condensación química entre un alcohol superior y un ácido pero es lenta y poco probable durante la fermentación*
- ✓ *La biosíntesis demanda energía por lo que se precisa de la presencia del alcohol superior y una molécula activa en forma de acil-CoA que suele ser acetil-CoA*
- ✓ *Las enzimas que lo llevan a cabo se denominan éster sintasas, etanol acetiltransferasas o alcohol acetiltransferasas (AATasa)*
- ✓ *Los ésteres pueden ser hidrolizados por éster hidrolasas o esterases; al final de la fermentación se produce un incremento importante de esta actividad*



GENES Y ENZIMAS IMPLICADOS

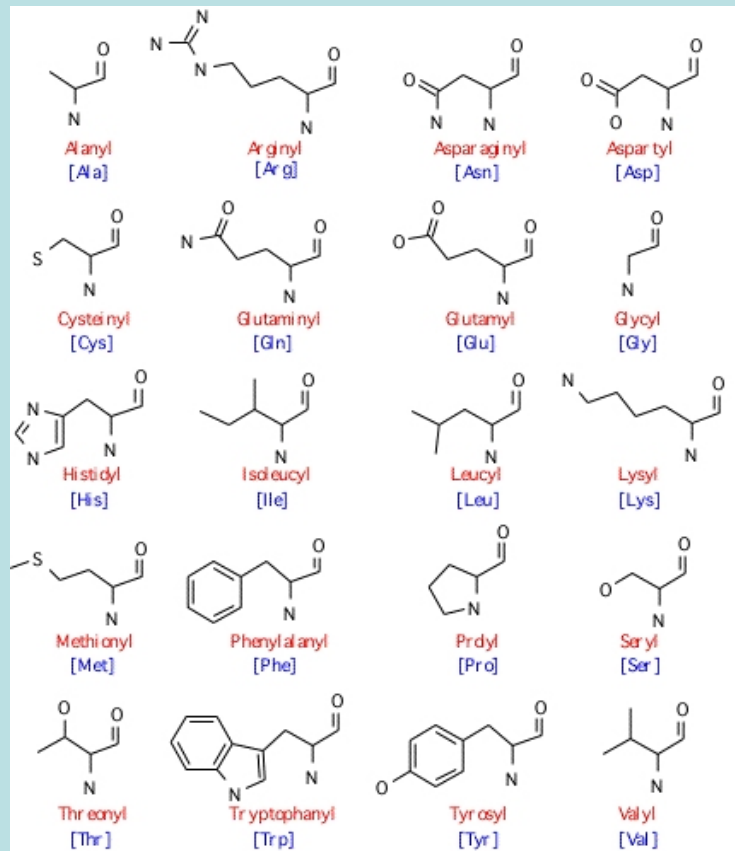


LEVADURAS AROMÁTICAS CON MEJOR PERFIL



- ✓ *Hay cepas de levaduras vínicas comerciales con mayor producción de ésteres afrutados (S. uvarum ES U42)*
- ✓ *La sobreexpresión del gen ATF1 incrementa 180 veces la producción de acetato de isoamilo y entre 10 y 200 veces otros ésteres como el acetato de etilo o el acetato de 2-feniletilo*
- ✓ *La delección del gen IAH1 duplica la concentración de ésteres de interés enológico*
- ✓ *Las condiciones de fermentación (presencia de aminoácidos) pueden afectar dramáticamente a la producción de volátiles relacionados con el aroma*

AMINOÁCIDOS, VINO Y AROMA



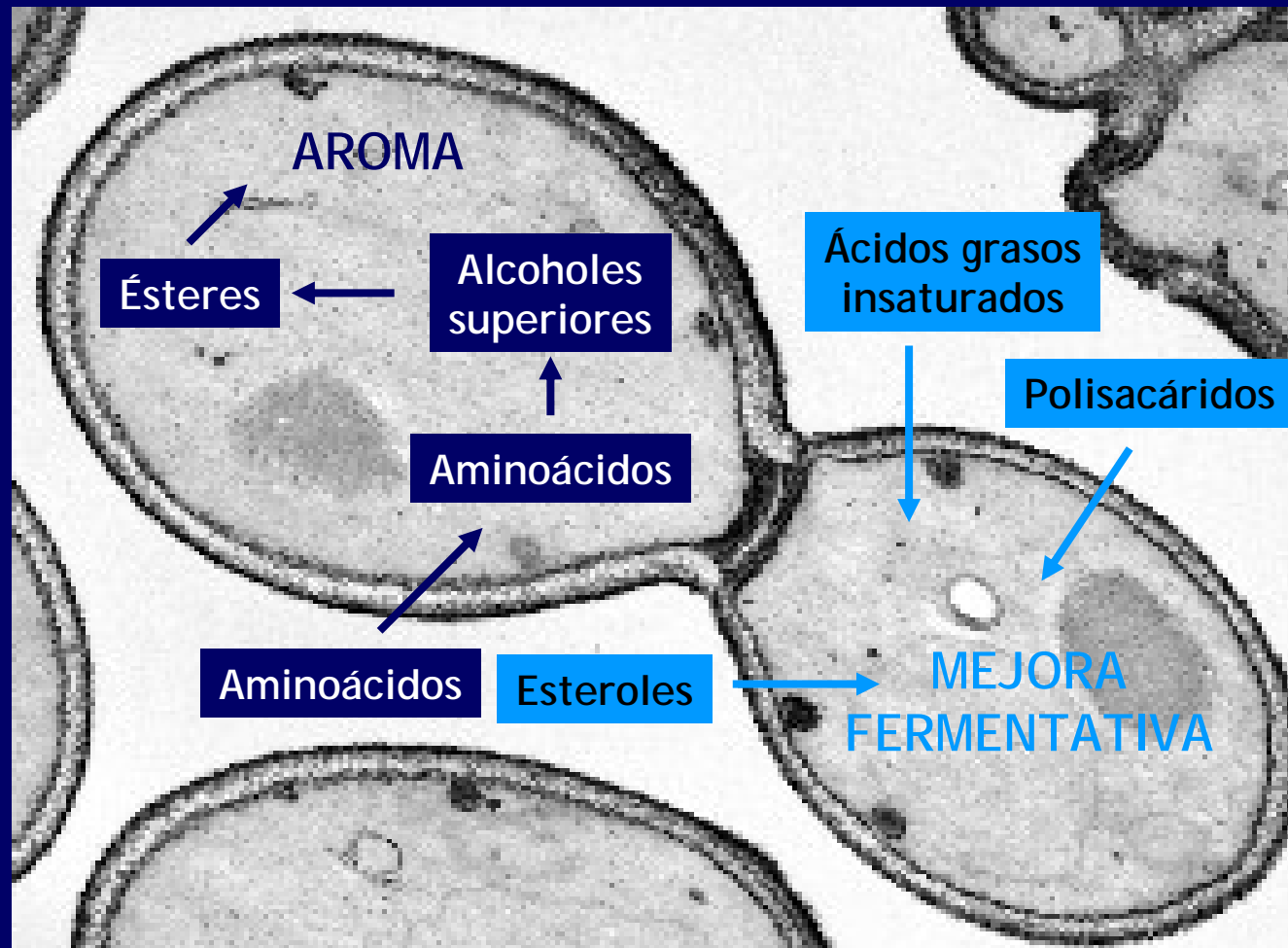
- ✓ *La presencia de determinados aminoácidos en el mosto determina el perfil aromático del vino producido*
- ✓ *Cada variedad tiene un perfil de aminoácidos en el mosto; por ejemplo en Macabeo hay mucha metionina que da lugar a la producción de metional en el vino final*
- ✓ *Los aminoácidos son precursores de la síntesis de alcoholes superiores, aldehidos, ácidos carboxílicos e, indirectamente, ésteres*

AROMAS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS

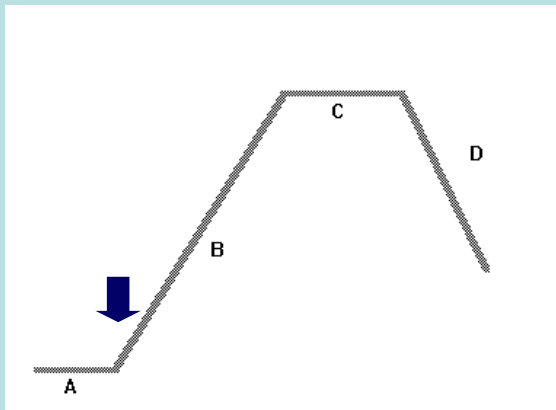


AMINOÁCIDO	ALDEHIDO	ALCOHOL	AC. CARBOXÍLICO	OTROS
Leucina	3-Mebutanal	3-Mebutanol	Ac 3 Mebutanoico	
Isoleucina	2-Mebutanal	2-Mebutanol	Ac 2 Mebutanoico	
Valerina	2-Meropanal	2-Mepropanol	Ac 2 Mepropanoico	
Fenialanina	Φ-acetaldehido	Φ-etanol	Ac. Φ-acético	
Tirosina	p-OH-Φ-acetaldehido	p-OH-Φ-etanol	Ac p-OH-F-acético	p-cresol
Triptófano	Indol-3-acetaldehído	Triptofol	Ac indol-3 acético	Skalote
Metionina	3-Metiopropanal	3-Metio-propanol	Ac -3 Metiopropanoico	Metanotiol
Asparragina			Malato	Diacetilo Acetoína

ESTRATEGIAS DE NUTRICIÓN



ADICIÓN DE NUTRIENTES ORGÁNICOS

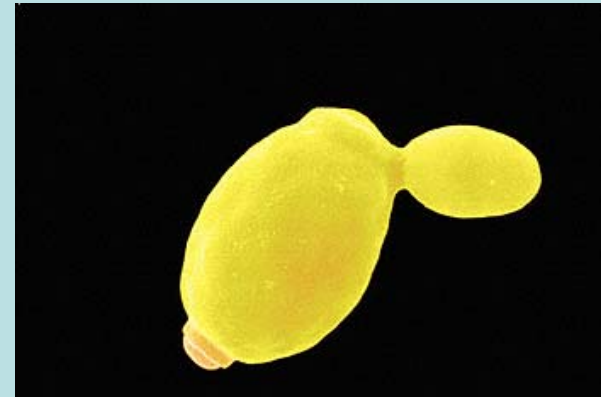


- ✓ *Siempre al comienzo de la fermentación para evitar concentraciones elevadas de etanol*
- ✓ *En esas condiciones suministra precursores rápidos para la síntesis proteica*
- ✓ *La célula acumula el exceso de aminoácidos en la vacuola para poderlos utilizar posteriormente*

LA ADICIÓN DE NUTRIENTES EN LOS DISTINTOS TIPOS DE VINOS



- ✓ *Cada tipo de vino es una matriz distinta; no hay una solución global ni un único efecto del empleo de nutrientes*
- ✓ *En vinos tintos y en rosados aromáticos el efecto principal de la adición de nutrientes es la mejora de las propiedades organolépticas*
- ✓ *En vinos tradicionales o de crianza la nutrición con esteroides y ácidos grasos garantiza el desarrollo de la fermentación*



BIOLOGÍA MOLECULAR DEL AROMA



Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde

Denise Tieman¹, Mark Taylor¹, Nikolaus Schauer², Abdulrahman R. Ferris¹, Andrew D. Hanson¹, and Harry J. Klee^{1*}

¹Department of Horticultural Sciences, University of Florida, P.O. Box 110990, Gainesville, FL 32611-0990 and ²Wissenschaftszentrum für molekulare Pflanzenphysiologie, Am Mühlenberg 1, 14469 Golm-Postdam, Germany

Plant Molecular Biology (2005) 59:345–362
DOI 10.1007/s11103-005-8884-y

© Springer 2005

Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity*

Islam El-Sharkawy¹, Daniel Manriquez², Francisco B. Flores¹, Farid Regad, Mondher Bouzayen, Alain Latché and Jean-Claude Pech*

UMR 990 INRA/INPT-ENSAT "Génomique et Biotechnologie des Fruits", Av. de l'Agrobiopole, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France (*author for correspondence; e-mail pech@ensat.fr);

¹These authors contributed equally to the work

International Grape Genome Program



Welcome to www.vitaceae.org the web site for multinational collaborative grapevine research. The primary research focus is grapevine genomics carried out within the framework of the International Grape Genome Program (IGGP). It is expected that this new genomic knowledge will have a significant impact on our understanding of grapevine biology, viticulture and enology. Plant biologists, viticulturists and enologists are encouraged to contribute their expertise and form collaborations with genetic and molecular scientists within the IGGP.

[IGGP Home](#)
[White Paper \[pdf\]](#)
[IGGP](#)
[Recommendations](#)
[IGGP Structure](#)
[IGGP List Servs](#)

- ✓ *Se empiezan a identificar genes relacionados con la síntesis de aromas en diversas plantas*
- ✓ *La genómica comparativa nos permitirá disponer en pocos años de muchos de estos genes*
- ✓ *La secuencia del genoma de la uva está prácticamente finalizada*
- ✓ *Ya se han construido levaduras vínicas transgénicas que expresan genes de plantas e incrementan aromas*

FINALMENTE *Homo sapiens*



Beyond the Human Genome Project

In 2003 scientists in the Human Genome Project obtained the DNA sequence of the 3 billion base pairs making up the human genome.

- The human genome is nearly the same (99.9%) in all people.
- Only about 2% of the human genome contains genes, which are instructions for making proteins.
- Humans have an estimated 30,000 genes; the location of more than half of these are unknown.
- Almost half of all human proteins share similarities with those of other organisms, underscoring the unity of life.

Many new discoveries yet to come!

The Path Forward

Scientific Discovery

How does DNA impact HEALTH?

Microbes for energy and the environment

What do all the GENES do?

Microbiotrophs

Applications: Economic benefits: bioprocessing

How does the genome enable LIFE?

DNA identification

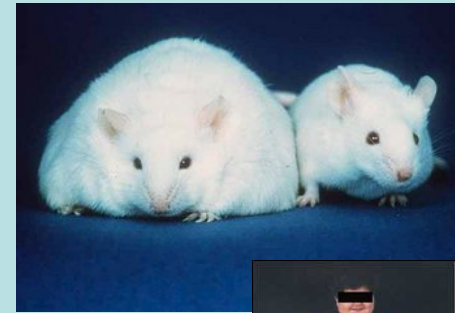
The Road from DNA to working cells

- ✓ Desde el año 2003 disponemos de la secuencia completa del genoma humano que está compuesta por unos 30000 genes; sólo conocemos la funcionalidad de la mitad
- ✓ Los genomas de todos los humanos son prácticamente idénticos (99.9% de identidad)
- ✓ Ya conocemos que genes de nuestro genoma se relacionan con las sensaciones organolépticas
- ✓ Se piensa que hay alrededor de 1000 genes relacionados con la percepción de aromas

NUTRIGENÉTICA Y NUTRIGENÓMICA



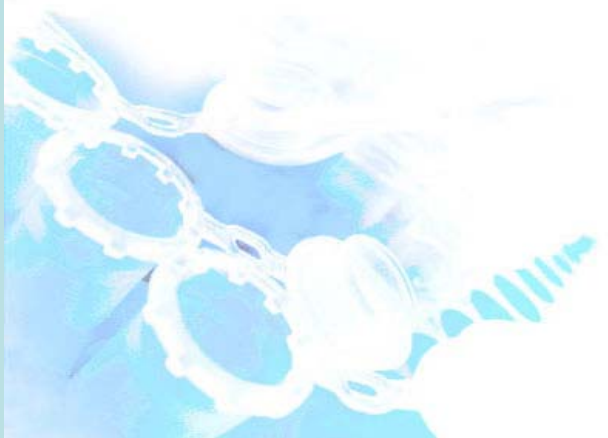
- ✓ *Por nutrigenética se definirán mutaciones en estos genes que muestren predisposiciones genéticas a no detectar o hiperdetectar aromas*
- ✓ *Se realizarán estudios epidemiológicos*
- ✓ *En base a ello se producirán vinos de diseño para satisfacer poblaciones de consumidores*
- ✓ *La nutrigenómica nos permitirá mejorar las variedades de uva y las levaduras*



CONTACTO EN BIÓPOLIS S.L.



<http://www.biopolis.es>



Biópolis, S.L.
Polígono La Coma s/n
46980 Paterna (Valencia)
España

Daniel Ramón

 (+34) 96 316 02 99

 Daniel.ramon@biopolis.es