



Elaboración de vino Malbec en planta piloto con una levadura OGM diseñada para reducir la graduación alcohólica

Cuello Raúl Andrés¹; Massera Ariel Fernando¹; Combina Mariana¹; Ciklic Iván Francisco^{1a}.
¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) EEA Mendoza.
ciklic.ivan@inta.gob.ar

Introducción

El problema del alto contenido de alcohol en los vinos



Uno de los problemas que enfrenta la industria vitivinícola en los últimos años, es el aumento sostenido de la graduación alcohólica de los vinos obtenidos. La demanda de vinos que posean taninos maduros y dulces obliga a una cosecha tardía de las uvas con una madurez azucarina muy avanzada, ya que habitualmente se presenta un retraso de la madurez fenólica con respecto a la madurez azucarina. Este efecto se ve agravado por la incidencia del calentamiento global, particularmente en nuestra región de Cuyo, que de por sí presenta veranos muy cálidos. Consecuentemente, la fermentación de mostos con una elevada concentración de azúcar resulta en vinos con un elevado tenor alcohólico.

Materiales y Métodos

Mediante el método de recombinación homóloga del *cassette* de resistencia *KanMX* y la incorporación de un *stop codon*, se obtuvo la delección específica planificada en el extremo N-terminal de *PDC2* [Fig.1]. Se obtuvo así una proteína truncada con 519 (*pdc2Δ519*) aminoácidos menos que la secuencia completa de 925, donde solo se conserva el sitio de unión a ADN. Para la evaluación fenotípica de las cepas vínicas mutantes (cepa control EC1118*pdc2Δ519* y cepa nativa Mab2C*pdc2Δ519*), se llevaron a cabo fermentaciones en planta piloto con mosto de Uva Malbec a 24 °Brix (237,8 g/L de azúcares) pH 3,5 y con una acidez titulable de 5,5 g/L de ácido tartárico. Se emplearon envases de 5 L y se adicionaron 50 mg/L de SO₂ en molienda. Las concentraciones de etanol, ácido acético, azúcares reductores y glicerol se determinaron mediante espectrometría. Los parámetros cinéticos se determinaron mediante el seguimiento de la pérdida de peso. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para determinar el porcentaje de implantación de las levaduras inoculadas, se tomaron muestras en distintos momentos de la vinificación y se analizaron mediante resistencia a antibiótico (Mab2C*pdc2Δ519*) o PCR interdelta (cepa comercial IONYS).

Resultados

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS GENERAL

Mediante una delección en el extremo C-terminal del gen *PDC2* en cepas vínicas de levadura se obtiene una variante del factor de transcripción de la proteína Pdc2p cuya actividad reguladora positiva de *PDC1* y *PDC5* se encuentre atenuada. Esto conlleva a una disminución en la actividad enzimática PDC y la consecuente reducción de la producción de etanol.

OBJETIVO GENERAL

Obtener cepas vínicas de *S. cerevisiae* con capacidad reducida para producir alcohol mediante la inserción genómica de la mutación *pdc2Δ519*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Insertar la mutación *pdc2Δ519* en distintas cepas vínicas de *S. cerevisiae*.
- Evaluar las cepas vínicas mutantes con respecto a la producción de etanol, la actividad piruvato descarboxilasa y otros parámetros enológicos durante la fermentación a escala de laboratorio.
- Evaluar en condiciones reales de vinificación las cepas vínicas mutantes que presenten una reducción en la producción de etanol y parámetros enológicos adecuados para una cepa de alcance comercial.
- Comparar las cepas vínicas mutantes *pdc2Δ519* obtenidas con otras cepas disponibles en el mercado, en cuanto a su capacidad para reducir etanol y otros atributos enológicos relevantes.

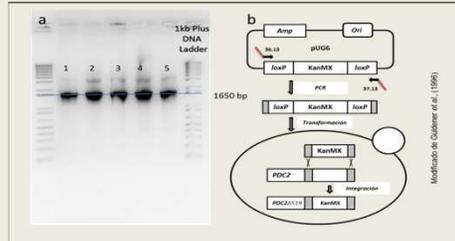


Figura 1a) Amplificados del *cassette* de resistencia *KanMX* para la transformación de las levaduras. b) Representación esquemática de los pasos de amplificación de *KanMX* por PCR y posterior transformación y recombinación homóloga en la levadura de interés. Se resalta en rojo las secuencias de reconocimiento de *PDC2* de los primers 36,13 y 37,13, para la recombinación homóloga.

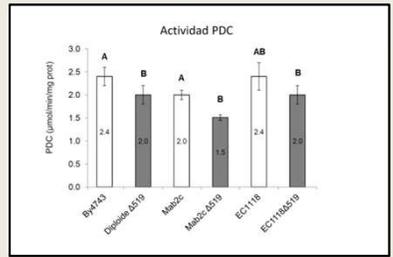


Figura 2. Gráficos de barra de las actividades enzimáticas de las cepas BY4743, BY4743Δ519 (diploideΔ519), Mab2C, Mab2CΔ519, EC1118 y EC1118Δ519.

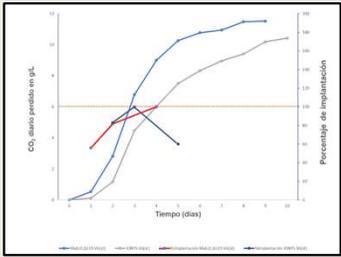


Figura 3. Análisis de la pérdida de peso vs % de implantación de las cepas Mab2CΔ519 y IONYS en la vinificación V6(st).

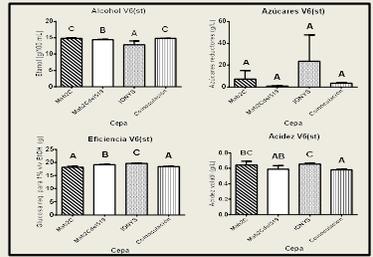


Figura 4. Gráficos de barra de parámetros enológicos correspondientes a vinificación en planta piloto V6(st). Se representan los valores de etanol, azúcares residuales, eficiencia y acidez. Se realizó un ANAVA de los parámetros, sometidos luego a la prueba LSD Fisher con un nivel de significación de 0,05.

Número de muestra	Cepa	GRADUACIÓN ALCOHÓLICA (v/v)	COLOR (mg/L)	COLOR (mg/L)	AROMAS (ppm)	ACIDEZ (g/L)	ACIDEZ (g/L)
1	Malbec	5,08*	3,33*	5,53*	4,40*	3,27*	5,05*
2	Malbec	5,07*	3,30*	5,21*	4,40*	3,27*	5,05*
3	Malbec	5,28*	3,27*	5,42*	4,40*	3,27*	5,05*
1	Mab2CΔ519	5,12*	3,31*	5,24*	4,40*	3,27*	5,05*
2	Mab2CΔ519	5,15*	3,27*	4,81*	4,40*	3,27*	5,05*
3	Mab2CΔ519	5,18*	3,27*	4,81*	4,40*	3,27*	5,05*

Tabla 1. Valores correspondientes a los MANOVA (análisis multivariantes de la varianza) de las variables Producto, Panelista y Sesión y sus correspondientes interacciones en la vinificación V6(st).

Conclusiones



- A pesar de generar una reducción de alcohol más limitada que IONYS, nuestra cepa mutante Mab2CΔ519 es altamente competitiva considerando su dinámica de fermentación superior y su acidez volátil reducida. Además, la reducción observada de 0,8 % V/V (para un vino con predicción de 15,5 de alcohol) es industrialmente relevante y equivalente a la declarada por el fabricante de IONYS.
- Los resultados de los análisis enzimáticos de PDC refuerzan la hipótesis general de nuestro trabajo.
- El análisis sensorial permite afirmar que no existen diferencias distinguibles en las elaboraciones de vino efectuadas con Mab2C vs las que se llevaron a cabo con Mab2CΔ519.