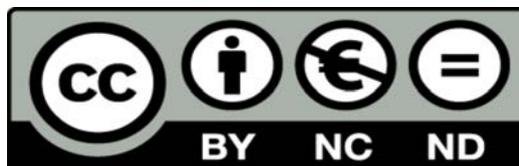




# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TESIS DOCTORAL

Título
<b>Estrategias de uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fermentaciones aeróbicas</b>
Autor/es
<b>Andrea Martín Guindal</b>
Director/es
Ramón González García, Jordi Tronchoni León y Pilar Morales Calvo
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico
2023-2024



Estrategias de uso de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones aeróbicas, tesis doctoral de Andrea Martín Guindal, dirigida por Ramón González García, Jordi Tronchoni León y Pilar Morales Calvo (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

Tesis doctoral

2023

Programa de doctorado “Enología, Viticultura y Sostenibilidad”,

Universidad de La Rioja

**Estrategias de uso de *Saccharomyces  
cerevisiae* en fermentaciones  
aeróbicas**

---

**Strategies of use of *Saccharomyces  
cerevisiae* in aerobic fermentations**

**Andrea Martín Guindal**

**Dr. Ramón González García**

**Dr. Jordi Tronchoni León**

**Dra. Pilar Morales Calvo**



# INFORME DIRECTORES PRESENTACIÓN TESIS DOCTORAL

D. Ramón GONZÁLEZ GARCÍA, Profesor de Investigación del CSIC, Dña. María Pilar MORALES CALVO, Científica Titular del CSIC en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino y D. Jordi TRONCHONI LEÓN, Director del Máster en Bioinformática de la Universidad Internacional de Valencia (VIU)

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Estrategias de uso de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones aeróbicas” presentado por Dña. Andrea MARTÍN GUINDAL para optar al título de Doctora por la Universidad de La Rioja ha sido realizado bajo su dirección, autorizando su presentación para proseguir los trámites oportunos y proceder a su calificación por el tribunal correspondiente.

Logroño, noviembre de 2023.

Fdo: Ramón González García

Fdo: María Pilar Morales Calvo

Fdo: Jordi Tronchoni León



# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>11</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>23</b>
1. Importancia cultural y económica del vino en España.....	25
2. El proceso de fermentación.....	26
2.1 Metabolismo de la fermentación .....	26
2.2 Fermentación alcohólica.....	29
2.3 Fermentación maloláctica .....	32
3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
3.1 Origen y ecología .....	34
3.2 Especialización .....	37
3.2.1 Tolerancia a factores de estrés.....	37
3.2.2 Efecto Crabtree .....	40
3.2.3 Represión por catabolito de carbono.....	42
3.3 Contribución organoléptica.....	46
4. Aumento del grado alcohólico de los vinos.....	48
4.1 Causa y efecto.....	48
4.2 Soluciones frente al aumento de grado alcohólico.....	50
4.2.1 Soluciones microbiológicas.....	51
4.2.1.1 Levaduras no- <i>Saccharomyces</i> .....	51
4.2.1.2 Mejora de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	52
5. La respiración como sumidero de carbono .....	53
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>61</b>
1. Introducción.....	63
2. Materiales y métodos.....	65

2.1 Cepas y medios de cultivo .....	65
2.2 Fermentación aeróbica en mosto natural y mostos sintéticos .....	66
2.3 Optimización del régimen de aireación.....	67
2.4 Determinación de la concentración de metabolitos .....	64
2.5 Análisis de compuestos volátiles.....	69
2.6 Análisis estadísticos.....	70
3. Resultados .....	70
3.1 Exploración de la fermentación aeróbica de <i>S. cerevisiae</i> ....	70
3.2 Principales parámetros de fermentación bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.....	73
3.3 Producción de volátiles en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.....	76
3.4 Optimización del proceso de fermentación aeróbica.....	79
3.5 Consistencia de los parámetros de fermentación entre sistemas y medios de cultivo.....	84
4. Discusión.....	87
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>91</b>
1. Introducción.....	93
2. Materiales y métodos.....	95
2.1 Cepas.....	95
2.2 Mosto natural y mosto sintético.....	95
2.3 Análisis transcripcional.....	96
2.4 Evolución dirigida .....	97
2.5 Ensayos de respuesta a CCR .....	98
2.6 Crecimiento en mosto natural.....	98
2.7 Selección de los clones evolucionados .....	99
2.8 Resistencia a factores de estrés.....	99
2.9 Fermentaciones aerobias en biorreactor .....	100
2.10 Determinación de la concentración de metabolitos .....	100

2.11 Análisis estadístico.....	100
3. Resultados .....	101
3.1 Caracterización del perfil de fermentación de los mutantes de respiración .....	101
3.2 Análisis de distancia global .....	102
3.3 Efecto de la disponibilidad de oxígeno.....	105
3.4 Efecto de la inactivación del gen <i>HXK2</i> .....	105
3.5 Efecto de la inactivación del gen <i>REG1</i> .....	107
3.6 Identificación de genes relevantes para la producción de ácido acético.....	111
3.7 Evolución dirigida y comportamiento de las poblaciones evolucionadas .....	113
3.8 Tolerancia a estrés industrial de los clones evolucionados .....	118
3.9 Fermentación en mosto natural de los clones seleccionados .....	119
3.10 Caracterización de los clones seleccionados de EC1118..	122
3.11 Crecimiento en biorreactor bajo condiciones aeróbicas ..	124
4. Discusión .....	125
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>131</b>
1. Introducción.....	133
2. Materiales y métodos.....	135
2.1 Cepas y medios.....	135
2.2 Experimentos de fermentación .....	135
2.3 Determinación de la concentración de metabolitos .....	136
2.4 Seguimiento de la dinámica de la población .....	136
2.5 Análisis de compuestos volátiles.....	137
2.6 Análisis de color .....	137
2.7 Análisis estadístico.....	137
3. Resultados .....	137

3.1 Selección de cepas de <i>M. pulcherrima</i> .....	137
3.2 Ajuste de las proporciones de cepas para co-inoculación .....	139
3.3 Optimización del régimen de aireación.....	141
3.4 Suplementación con fuentes de nitrógeno .....	141
3.5 Perfil de compuestos volátiles de los distintos ensayos de fermentación .....	143
3.6 Impacto de las condiciones de fermentación sobre los parámetros de color .....	145
3.7 Validez de la estrategia de co-cultivo con cepas estándar de <i>S. cerevisiae</i> .....	146
4. Discusión .....	148
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>151</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>159</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>163</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO .....</b>	<b>167</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>175</b>

## **RESUMEN**

---



El vino es un alimento tradicional, especialmente en los países del área mediterránea donde su producción se remonta a las primeras poblaciones humanas. España alberga el primer viñedo a escala mundial, con un 13% de la superficie de cultivo total de vid destinada a la producción de vino (datos de 2021, disponibles en [www.fev.es/sector-cifras/](http://www.fev.es/sector-cifras/)), lo que se traduce en una aportación del 2.2% del valor añadido bruto y en el mantenimiento del 2.4% de empleo en España entre puestos de trabajo directos e indirectos (Analistas Financieros Internacionales, 2020). El sector vitivinícola está presente en todas las comunidades autónomas españolas, siendo una importante fuente de ingresos para las zonas rurales, actuando como un dinamizador del territorio y colaborando con el reto del despoblamiento territorial, bien gracias a la producción directa de vino, a la presencia de industrias accesorias (maderera, industria del corcho, del vidrio y otras) o mediante el enoturismo (Analistas Financieros Internacionales, 2020).

En los últimos años se ha observado un incremento sin precedentes de las temperaturas en la superficie terrestre (NOAA Global Climate Report for 2020), acompañado de cambios en el nivel y distribución de las precipitaciones. Este contexto de cambio climático está afectando a gran número de cultivos, especialmente en las regiones más secas como el área mediterránea. En el caso concreto de la vid, cultivo típico de estas zonas, se ha observado un claro cambio en el patrón de maduración de las bayas debido a estas alteraciones climáticas. En las últimas décadas se ha visto un desfase cada vez mayor entre la acumulación de azúcares dentro de la baya (madurez tecnológica) y la madurez organoléptica debida a la acumulación de compuestos fenólicos y aromáticos (Jones y Webb, 2010; Holland y Smith, 2010; Keller, 2010; Mira de Orduña, 2010). A causa de este desfase, lograr la producción de un vino con suficiente calidad organoléptica para el consumidor supone retrasar la vendimia más allá del punto óptimo de concentración de azúcares. Este aumento de azúcares se traduce, por el propio proceso de fermentación, en un incremento en la concentración de etanol y, por tanto, en un aumento en la graduación alcohólica del vino.

Se estima que desde 1980 los vinos comerciales han aumentado su contenido alcohólico en un 1% cada década, observándose este patrón de aumento en todo tipo de vinos y áreas de producción (Jones et al., 2005; van Leeuwen y Darriet, 2015), con una tendencia aún más severa en las regiones más cálidas, tradicionalmente de mayor producción vitivinícola (Alston et al., 2011; Godden et al., 2015).

El aumento del contenido alcohólico supone un grave problema para la industria vitivinícola desde varios puntos de vista: Grandes concentraciones de etanol pueden alterar el proceso de elaboración, al evitar que tanto levaduras (fermentación alcohólica) como bacterias del ácido láctico (fermentación maloláctica) se desarrollen de manera óptima (Bisson, 1999; Bruescher et al., 2001; Coulter et al., 2008; Graça da Silveira et al., 2002) dando lugar a paradas fermentativas y/o defectos organolépticos. Aunque el proceso de elaboración se llegase a completar, un exceso de grado alcohólico genera un desequilibrio sensorial al aumentar la solubilidad de ciertos compuestos volátiles, impidiendo su percepción (Goldner et al., 2009; Pickering et al., 1998; Hartmann et al., 2002; Le Berre et al., 2007; Robinson et al., 2009). Además, la sociedad actual busca cada vez más un estilo de vida saludable y un consumo de alcohol moderado, de forma que bebidas de alta graduación tienen cada vez menos cabida en el mercado (Schmidtke et al., 2012; Saliba et al., 2013), existiendo incluso medidas de salud pública que gravan la comercialización internacional de bebidas de alta graduación y que podrían llegar a afectar a la exportación-importación de vino (de Barros Lopes et al., 2003; Contreras et al., 2014).

Existen numerosos abordajes para tratar de paliar este problema, desde el manejo del cultivo para evitar el desfase en la maduración (por ejemplo, deshojado, manejo del suelo o deslocalización de cultivos) (Stoll et al., 2010; Whiting, 2010; Schmidtke et al., 2011; Ozturk y Anli, 2014) hasta la desalcoholización del vino mediante sistemas de filtración y evaporación, que exigen una posterior reestructuración del vino (Akyereko et al., 2021; Catarino y Mendes, 2011; Labanda et al., 2009; Gonçalves et al., 2013; Diban et al., 2008; Fedrizzi et al., 2014), pasando por la eliminación de parte del contenido en azúcares del mosto mediante dilución, filtración o tratamientos enzimáticos (Pickering et al., 1998; 1999). Todos ellos presentan ventajas e inconvenientes, siendo en la mayoría de los casos abordajes difíciles de implementar a nivel industrial, que supondrían un elevado sobrecoste, o que podrían tener un impacto negativo en la percepción del consumidor. No obstante, algunos de estos abordajes son soluciones válidas que están siendo investigadas y optimizadas para su transferencia al sector industrial.

En esta tesis doctoral se presenta como posible solución al aumento de grado alcohólico el abordaje del problema desde un punto de vista microbiológico, modificando el proceso de fermentación alcohólica. Este enfoque apuesta por reducir el rendimiento de etanol de las levaduras con el objetivo de

modificar al mínimo el producto final. Puede llevarse a cabo mediante dos líneas principales: la modificación del rendimiento en etanol de *Saccharomyces cerevisiae* y/o la utilización de levaduras alternativas al género *Saccharomyces*.

*S. cerevisiae* es un organismo altamente especializado en la fermentación alcohólica, siendo su agente principal y existiendo cepas adaptadas específicamente a la fermentación del mosto de uva (cepas vínicas), (Liti et al., 2009; Peter et al., 2018). Estas cepas presentan una gran tolerancia a los factores de estrés propios del medio enológico, como gran tolerancia a grandes concentraciones de azúcares (alta presión osmótica) bajo pH, altas presiones, presencia de sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), amplio rango de temperaturas y una alta resistencia a la toxicidad del etanol, que producen en grandes cantidades. Esta combinación de características hace que *S. cerevisiae* sea capaz de desbancar al resto de la microbiota presente en el mosto muy rápidamente conforme se inicia la fermentación, aun cuando esté en una proporción muy baja inicialmente. Esta especialización, que hace de *S. cerevisiae* el organismo fermentador por antonomasia, dificulta enormemente la modificación de su rendimiento en etanol, que además de ser más alto que el que presentan otras especies es una característica enormemente homogénea en toda la especie, como se describe en el capítulo 1.

Por otro lado, existen multitud de especies de levadura con un perfil de fermentación más adecuado para el objetivo de un menor rendimiento alcohólico. Sin embargo, estas especies, aun cuando sobreviven durante las fases iniciales de la fermentación, acaban siendo desplazadas por *S. cerevisiae*, precisamente por su menor adaptación a la fermentación del mosto, haciéndose necesario un trabajo de mejora para aumentar su resistencia a factores de estrés tan cruciales como la presencia de sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), temperatura o pH bajo.

En esta tesis doctoral se propone el uso de *S. cerevisiae* para reducir el grado alcohólico del vino mediante la desviación del consumo de azúcares de la producción de etanol hacia la generación de  $\text{CO}_2$  mediante la capacidad respiratoria de las levaduras. En concreto, se pretende solventar mediante distintas aproximaciones un problema inherente a esta propuesta, el exceso de producción de ácido acético por parte de *S. cerevisiae* en las condiciones de cultivo necesarias para que tenga lugar la respiración (aerobiosis). En este trabajo se explora la diversidad natural de *S. cerevisiae* en busca de cepas con una menor producción en ácido acético, identificando posibles cepas candidatas para su aplicación industrial, y se pone a punto el proceso de aireación para una cepa

seleccionada (capítulo 1). Se aborda el estudio de la relación entre la flexibilización de la represión por catabolito (capacidad de consumir otros azúcares en presencia de glucosa) y la menor producción de ácido acético, que sirve de base para el diseño de una evolución dirigida con el objetivo de obtener cepas con baja producción de ácido acético en aerobiosis (capítulo 2). Finalmente, se explora la reducción de ácido acético por medio de la regulación de las condiciones de aerobiosis, no mediante el control del flujo de aire, sino gracias al consumo de oxígeno por parte de la levadura alternativa *Metschnikowia pulcherrima* (capítulo 3).

## **SUMMARY**

---



Wine is a food product with an undeniable traditional character, especially in the Mediterranean area where its production dates back to the first human populations. Spain is currently the world's leading vineyard, with 13% of the total vine cultivation surface devoted to wine production (2021 data available at [www.fev.es/sector-cifras/](http://www.fev.es/sector-cifras/)), which translates into a contribution of 2.2% of gross value added and the maintenance of 2.4% of employment in Spain between direct and indirect jobs (Analistas Financieros Internacionales, 2020). The wine sector is present in all the Spanish regions, being an important income source for rural areas, acting as an accelerator of the territory and helping to solve the challenge of territorial depopulation, thanks to the direct production of wine, the presence of accessory industries (timber, cork industry, vineyards, etc.) or through wine tourism (International Financial Analysts, 2020).

In recent years there has been an unprecedented increase of temperatures (NOAA Global Climate Report for 2020), accompanied by changes in the level and distribution of precipitation. This context of climate change is affecting a large number of crops, especially in drier regions such as the Mediterranean area. In the specific case of vines, a typical crop in the region, a clear change has been observed in the ripening pattern of the berries due to these climatic alterations. In recent decades, an increasing gap has been observed between the accumulation of sugars within the berry (technological maturity) and organoleptic maturity due to the accumulation of phenolic and aromatic compounds (Jones and Webb, 2010; Holland and Smith, 2010; Keller, 2010; Mira de Orduña, 2010). Producing a wine with sufficient organoleptic quality to be accepted by the consumer involves delaying the harvest beyond the optimal point of sugar concentration. This increase in sugars results, through the fermentation process itself, in an increase in the concentration of ethanol, and therefore in an increase in the alcohol content of the wine.

It is estimated that since 1980 commercial wines have increased their alcohol content by 1% every decade. This pattern of increase has been observed in all types of wines and productive areas (Jones et al., 2005; van Leeuwen and Darriet, 2015), being even more severe in warmer regions, traditionally with higher wine productions (Alston et al., 2011; Godden et al., 2015).

The increase in alcohol content is a serious problem for the wine industry from several points of view: High ethanol concentrations can seriously affect the winemaking process by preventing both yeasts (alcoholic fermentation) and lactic acid bacteria (malolactic fermentation) from optimal development (Bisson, 1999;

Bruescher et al., 2001; Coulter et al., 2008; Graça da Silveira et al., 2002), resulting in stuck fermentations and/or unpalatable wines. Even if the winemaking process is completed, an excess of alcohol generates a sensory imbalance by increasing the solubility of certain volatile compounds, affecting their perception (Goldner et al., 2009; Pickering et al., 1998; Hartmann et al., 2002; Le Berre et al., 2007; Robinson et al., 2009). In addition, today's society is highly interested in healthy lifestyle and moderate alcohol consumption, so high alcoholic beverages have a reduced place in the market (Schmidtke et al., 2012; Saliba et al., 2013). There are even public measures for highly alcoholic beverages that penalise their international marketing. These measures could even affect the export/import of wine (de Barros Lopes et al., 2003; Contreras et al., 2014).

There are numerous approaches to try to alleviate this problem, from crop management to avoid ripening delays (like leaf removal, soil management, or crop relocation) (Stoll et al., 2010; Whiting, 2010; Schmidtke et al., 2011; Ozturk and Anli, 2014), to wine de-alcoholization through filtration and evaporation systems, that require subsequent wine restructuring (Akyereko et al., 2021; Catarino and Mendes, 2011; Labanda et al., 2009; Gonçalves et al., 2013; Diban et al., 2008; Fedrizzi et al., 2014), through to the removal of part of the sugar content from the must by dilution, filtration or enzymatic treatments (Pickering et al., 1998; 1999). All of them have advantages and disadvantages, being approaches that are difficult to implement at the industrial level, would entail serious cost overruns, or could negatively impact consumer perception. Nevertheless, some of them are valid solutions that are being investigated and optimised for transfer to the industrial sector.

In this doctoral thesis, a microbiological approach is presented as a possible solution to the increasing alcohol content of wines. This consists of the modification of the alcoholic fermentation process to reduce the ethanol yield of the yeasts, with the objective of minimising the changes in the final product. It could be approached along two main lines: the modification of the ethanol yield of *Saccharomyces cerevisiae* and/or the use of alternative yeasts outside the *Saccharomyces* genus.

*S. cerevisiae* is an organism highly specialised in alcoholic fermentation. It is the main agent of the fermentation process and there are lines specifically adapted to the fermentation of grape must (wine strains) (Liti et al., 2009; Peter et al., 2018). These strains have a high tolerance to the stress factors inherent to the oenological environment, such as high sugar concentrations (high osmotic

pressure), low pH, high pressures, the presence of sulphite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), a wide range of temperatures, and ethanol, which they produce in large quantities. This combination of characteristics means that *S. cerevisiae*, although initially found in a very low proportion, is capable of very quickly displacing the rest of the microbiota present in greater abundance in the must at the beginning of fermentation. This high specialization in the fermentation process is related to an ethanol yield which is not only higher than that of other species but is also a very homogeneous characteristic throughout the species, as described in Chapter 1.

On the other hand, there are a plethora of yeast species with a fermentation profile more suited to the objective of a lower ethanol yield. However, these species, even when they survive the initial phases of fermentation, end up being displaced by *S. cerevisiae*, precisely because of their lesser adaptation to must fermentation, making it necessary to improve their resistance to such crucial stress factors as the presence of sulphite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), temperature, or low pH.

This doctoral thesis proposes the use of *S. cerevisiae* to reduce the alcohol content of wine by diverting sugar consumption from ethanol production to  $\text{CO}_2$  generation through the respiratory capacity of yeasts. Specifically, the aim is to solve a problem inherent to this approach by means of different strategies. It has been shown that although it is possible to reduce ethanol production by favouring respiration through the maintenance of aerobic conditions during fermentation, this same aerobiosis produces, for reasons as yet unknown, an undesirable increase in acetic acid production, which means that this strategy cannot be applied in wine production. Chapter 1 explores the natural diversity of *S. cerevisiae* in search of strains with lower acetic acid production, identifying possible candidate strains for industrial application, and the aeration process for a selected strain is fine-tuned. Chapter 2 addresses the study of the relationship between the flexibilization of carbon catabolite repression (ability to consume secondary sugars in the presence of glucose) and lower acetic acid production, which serves as the basis for the design of a directed evolution to obtain strains with low acetic acid production in aerobiosis carried out. Finally, Chapter 3 explores the reduction of acetic acid by regulating aerobic conditions, not just by controlling airflow but through oxygen consumption by the alternative yeast *Metschnikowia pulcherrima* (Chapter 3).



## **AGRADECIMIENTOS**

---



Esta tesis ha sido financiada mediante las ayudas predoctorales para la investigación en los Centros Tecnológicos, Centros de Investigación y Empresas de la Comunidad Autónoma de La Rioja otorgadas por la Consejería de Desarrollo económico e Innovación de la Comunidad Autónoma de La Rioja.

Si este trabajo ha podido llevarse a cabo y yo he conseguido llegar hasta aquí ha sido gracias al apoyo de mucha gente a lo largo de muchos años, mucha más gente de la que voy a llegar a citar, aun así, voy a intentarlo:

En primer lugar, tengo que agradecer la inmensa labor de mis directores de tesis, Jordi, Pilar y Ramón. Primero por darme la oportunidad de trabajar con ellos, segundo por permitirme aprender tantísimo y tercero, por hacerme sentir apoyada cada día. He sido muy afortunada por teneros como directores. De igual manera tengo que dar las gracias a mis compañeros, Cris, Laura, Ana, Sara, Rufino, Guillermo, Yan y Miguel. Todos vosotros habéis hecho que el ICVV sea un sitio que echar de menos y que la etapa de doctorado sea algo que recordar con nostalgia y cariño. Me habéis enseñado un montón de cosas que me hacen ser mejor profesional, y creo que también mejor persona, de lo que era antes de conoceros, y por supuesto, muchos de vosotros habéis tenido un papel crucial en experimentos que aquí presento como “míos” cuando son de todos. MUCHÍSIMAS GRACIAS.

También tengo que acordarme de todos los profesores e investigadores que permitieron que me formara en sus laboratorios, a riesgo de la integridad de estos. Y aunque sé que jamás lo va a leer me siento obligada a agradecer a Alexandra Elbakyan y a su muy ilegal proyecto Sci-Hub, que ha permitido que toda una generación de estudiantes pueda acceder a publicaciones científicas de manera gratuita. Creo que el gran avance del ser humano como especie es compartir el conocimiento, que es la única propiedad que al cederse no se pierde, sino que se multiplica.

Por otro lado, quiero y debo agradecer a todos mis amigos de Logroño (*a.k.a* Ladrillitos) por haberme permitido hacer de esta ciudad mi casa y de estos años, confinamiento incluido, algo digno de recordar. Sois los mejores, aunque eso ya lo sabéis. En especial tengo que agradecerles a las mujeres más exitosas que conozco: Teri, Paula, Marta e Irene, por las incontables horas, parrafadas y *stickers* muy inapropiados que han tenido que aguantarme y que me han permitido llegar hasta aquí con (algo de) estabilidad mental.

Por último, tengo que dar las gracias a mis padres, porque, a parte de su patrocinio, no creo que hubiera sido científica (no creo que hubiera sido quien soy) sin las charlas en el coche camino a Condemios.



A mi familia,  
porque no hay cosa que yo  
pudiera hacer en la vida que  
me quitara vuestro apoyo.



# INTRODUCCIÓN GENERAL

---



# 1. IMPORTANCIA CULTURAL Y ECONÓMICA DEL VINO EN ESPAÑA

La fermentación alcohólica está estrechamente ligada a la aparición de las poblaciones humanas. Existen alrededor del globo numerosas pruebas arqueológicas del consumo de bebidas fermentadas que parecen estar asociadas al desarrollo de la agricultura (McGovern et al., 2004). Se postula que esta relación entre agricultura y fermentación pudo ser consecuencia accidental del almacenamiento de frutos y granos. Sin embargo, la capacidad para metabolizar el alcohol parece surgir millones de años antes, cuando los ancestros de chimpancés, gorilas y humanos adaptaron su locomoción, y con ello su dieta, a la vida en el suelo (Carrigan et al., 2015), donde ser capaz de consumir frutos maduros en exceso, y muy probablemente fermentados, pudo suponer una ventaja competitiva. Por tanto, parece que la capacidad de metabolizar el alcohol pudo permitir “prolongar” la vida útil de alimentos vegetales.

En cualquier caso, es innegable que el ser humano ha producido bebidas alcohólicas de forma consciente al menos desde el neolítico. El éxito de estas bebidas pudo deberse a múltiples factores, vigentes tanto en sociedades antiguas como en la actualidad: la obtención de un producto calórico a partir de alimentos no aptos para el consumo, su utilización como preparado analgésico, su función desinfectante (Cavaliere et al., 2003; Columela, 4dc-70dc/1824) y por supuesto como bebida hedónica, facilitando la desinhibición y el establecimiento de vínculos sociales dentro del grupo (Dunbar et al., 2017; Harutyunyan y Malfeito-Ferreira, 2022).

Dentro del área mediterránea, la fermentación de mosto de uva tuvo especial relevancia. En el contexto de España, se cree que su introducción es de origen fenicio (1100 a.C.) habiéndose encontrado lagares datados en torno al s. III a.C. (Ruiz-Mata, 2018). Sin embargo, el florecimiento de la producción de vino parece surgir a partir de la conquista romana. Desde la primera mitad del s. I d.C. se encuentran ya referencias claras de la producción y exportación masiva de esta bebida, volviéndose común encontrar vino de procedencia hispana en la misma ciudad de Roma (Martin i Oliveras, et al., 2017). Hacia finales del mismo siglo existen incluso referencias a zonas geográficas concretas de la península, que ofrecían vinos con características distintivas para los romanos (Martin i Oliveras, et al., 2017).

Existen numerosas fuentes históricas y arqueológicas, que abarcan toda la historia de la península, incluyendo el periodo musulmán (Escartín. 2004), y que señalan la importancia que esta actividad ha tenido en la península ibérica hasta nuestros días. La relevancia del consumo de vino en España no es casual; dada su localización geográfica y características climáticas, la península ibérica ha sido, y aún es, un lugar idóneo para el cultivo de la vid. Actualmente España cuenta con 941.086 hectáreas de viñedo (datos de 2021) lo que supone aproximadamente el 13% del cultivo global, colocando a nuestro país como el primer viñedo a escala mundial (datos disponibles en [www.fev.es/sector-cifras/](http://www.fev.es/sector-cifras/)), siendo el tercer productor mundial de vino y el primer exportador mundial en volumen (datos de 2021). Estos datos se traducen en una aportación del 2.2% al valor añadido bruto (VAB) español y en el mantenimiento del 2.4% del empleo en España, entre puestos de trabajo directos e indirectos (Analistas Financieros Internacionales, 2020).

Las implicaciones sociales del sector vitivinícola van mucho más allá del papel cultural que tiene el vino en la gastronomía y las tradiciones de nuestro país. Es un sector presente en todas las comunidades autónomas españolas que supone una importante fuente de ingresos para las zonas rurales, ayudando a afrontar el reto del despoblamiento territorial, siendo además fuente de negocio para otras industrias accesorias como por ejemplo la maderera, del corcho y la industria del vidrio entre otras (Analistas Financieros Internacionales, 2020). Además, contribuye directamente al desarrollo de otro gran dinamizador económico territorial, el turismo. El enoturismo tiene un enorme potencial como actividad económica sostenible para zonas rurales y deprimidas (Ruiz y Cañizares, 2019).

Por último, cabe destacar que, pese a ser una actividad profundamente tradicional, no por ello es un sector ajeno a la innovación, habiendo dedicado, según datos de la Federación Española del Vino, 175 millones de euros en los últimos 5 años a actividades de I+D+i.

## **2. EL PROCESO DE FERMENTACIÓN**

### **2.1. Metabolismo de la fermentación**

La fermentación es un proceso catabólico que permite a los organismos con esta capacidad obtener energía en ausencia de oxígeno a partir de la degradación de glucosa y algunas otras fuentes de carbono. Entre las levaduras se pueden

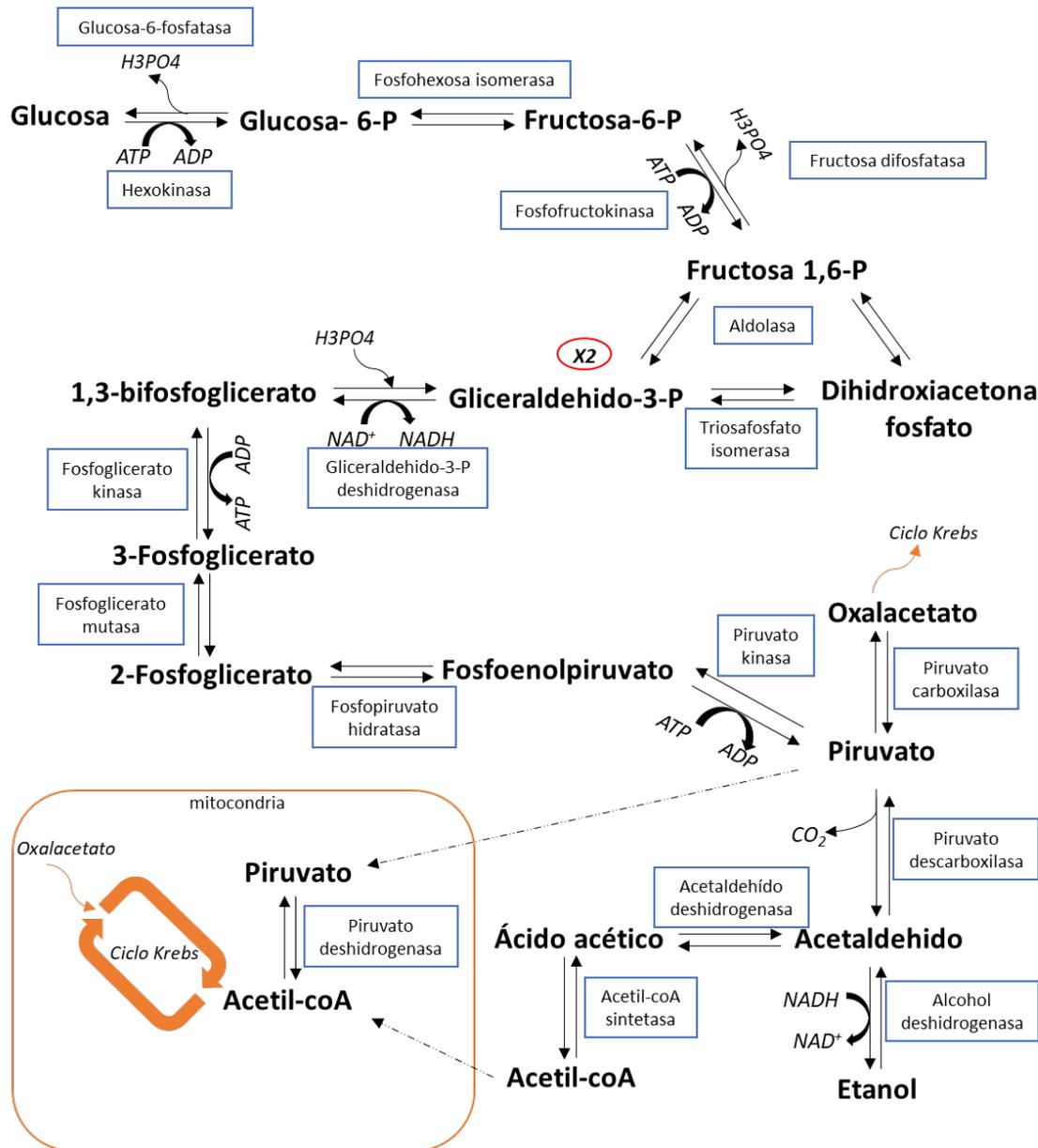
encontrar especies con distinta capacidad fermentativa: no-fermentadoras, que tan solo poseen metabolismo respiratorio; fermentadoras facultativas, que tienen la capacidad de utilizar ambas rutas catabólicas; o fermentadoras estrictas, que solo poseen capacidad fermentativa pero no respiratoria (Van Dijken y Scheffers, 1986).

La fermentación alcohólica se inicia con la glucólisis. La primera fase es la activación metabólica del azúcar mediante fosforilación dependiente de ATP hasta formarse fructosa-1,6-bisfosfato (Figura 1), que será de nuevo transformada en dos compuestos con un alto potencial de transferencia de fosfato (fosforilación a nivel de sustrato), el 1,3-bisfosfoglicerato y el fosfoenolpiruvato, lo que permitirá la formación de nuevo ATP, necesario para llevar a cabo otras reacciones fundamentales para el mantenimiento celular. En esta fase de obtención de energía también se lleva a cabo la reducción del coenzima  $\text{NAD}^+$  hacia NADH. La ecuación global de la glucólisis supone la formación neta de dos moléculas de ATP (a partir de ADP) y la producción de dos moléculas de NADH (Figura 1).

En condiciones de fermentación, el piruvato resultante de la glucólisis será descarboxilado mediante la piruvato descarboxilasa a acetaldehído y  $\text{CO}_2$ . Finalmente, este acetaldehído será transformado mayoritariamente en etanol por acción de la alcohol deshidrogenasa, recuperando el potencial de oxidación ( $\text{NAD}^+$ ) consumido en la etapa anterior. Estas últimas reacciones son las que caracterizan la fermentación alcohólica (Figura 1).

Bajo condiciones de respiración, el piruvato obtenido por la glucólisis es descarboxilado en la mitocondria mediante el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, generando  $\text{CO}_2$  y acetilcoenzima A, que es incorporado al ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs). Con la respiración la célula es capaz de obtener hasta 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (la mayor parte mediante fosforilación oxidativa de moléculas reducidas procedentes del ciclo de Krebs), generando como subproductos  $\text{CO}_2$  y agua. En la fermentación alcohólica, sin embargo, por cada molécula de glucosa se obtienen tan solo 2 moléculas de ATP, (generadas en la formación de 3-fosfoglicerato), (Figura 1), dando como subproductos  $\text{CO}_2$  y etanol.

La respiración es, sin duda, un proceso mucho más eficiente en términos tanto energéticos (Bakker et al., 2001) como de biomasa (van Dijken et al., 2000). Sin embargo, la fermentación otorga ciertas ventajas competitivas. En el caso de las fermentadoras facultativas permite la colonización de ambientes tanto aeróbicos como anaeróbicos. Además, el subproducto de la fermentación



**Figura 1.** Esquema de las principales reacciones metabólicas de la glucólisis y la fermentación alcohólica. Los recuadros azules indican las enzimas responsables de cada reacción. Las flechas discontinuas implican transporte hacia la mitocondria, señalada en naranja (respiración). Cabe destacar que a partir del gliceraldehido-3-fosfato por cada molécula de glucosa se producen dos moléculas de cada intermediario (señalado como x2).

alcohólica, el etanol, es una sustancia tóxica por lo que su liberación al medio condiciona la competencia entre los organismos con mayor y menor tolerancia, como se describirá más adelante. Por otro lado, dado que la fermentación genera menos energía que la respiración, la célula compensa este menor rendimiento con una mayor entrada de glucosa, lo que da lugar a un consumo de nutrientes más

rápido y a un aumento de la tasa de crecimiento (Olivares-Marín et al., 2018), lo que favorece su competencia con respecto a los organismos que están respirando.

Cabe mencionar que la glucólisis no es un proceso exclusivamente dirigido a la obtención de energía, es también una ruta que permite la obtención de metabolitos necesarios para el mantenimiento celular y el aumento de la biomasa. La glucosa-6-fosfato forma parte de la ruta de las pentosas-fosfato que permite la formación de NADPH (necesario para la biosíntesis de ácidos grasos) y de ribosas-fosfato (precursoras de nucleótidos). El 3-fosfoglicerato participa en la formación de aminoácidos. La dihidroxiacetona fosfato (DHAP) da lugar al glicerol, una molécula con gran importancia en la elaboración del vino, contribuyendo en su calidad e interviniendo en la síntesis de triacilgliceroles. El glicerol es además el principal osmolito compatible de las levaduras, lo que les permite hacer frente al alto estrés osmótico que sufren al inicio de la fermentación, debido a la alta concentración de azúcares del mosto.

## 2.2. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica, y más concretamente la fermentación del mosto de uva, fue llevada a cabo de forma espontánea y sin mayor comprensión del proceso hasta el s. XIX, cuando los trabajos de Louis Pasteur (1857) establecieron que la conversión de los azúcares presentes en el mosto hacia etanol y dióxido de carbono en condiciones de ausencia de oxígeno no se debía a un proceso químico espontáneo, sino al metabolismo de un organismo vivo, las levaduras.

Estas levaduras están presentes de forma natural en la superficie de la uva, donde llegan por la dispersión del viento y los insectos (Lafon-Laforurcade, 1983). La composición de esta microbiota es considerablemente variable, ya que se encuentra afectada por distintos factores ambientales, tales como la temperatura, las precipitaciones, la altitud, el punto de maduración de la uva y el uso de agroquímicos, entre otros (Boulton et al., 1996), posiblemente incluso la variedad de uva (Tronchoni et al., 2022). En cualquier caso, aunque el principal agente de la fermentación alcohólica es la especie *Saccharomyces cerevisiae*, su presencia en la uva es muy limitada, encontrándose principalmente cepas de los géneros *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Candida*, *Starmerella* y basidiomicetos como *Cryptococcus* y *Rhodotorula* (Bokulich et al., 2014; Kecskeméti et al., 2016; Kioroglou et al., 2019). En menor proporción se encuentran otros géneros de levadura como

*Torulaspota*, *Zygosaccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomyces*, e *Issatchenkia* (Bokulich et al., 2016; Kioroglou et al., 2019; Xu et al., 2020).

En las fermentaciones espontáneas son estas levaduras las que están presentes en el mosto y tanques de fermentación durante las primeras horas. Sin embargo, conforme avanza la fermentación tiene lugar un cambio en la población. Pese a estar en menor proporción, *S. cerevisiae* comienza a multiplicarse hasta llegar a ser la especie predominante y responsable principal de la fermentación. Esta imposición espontánea por parte de *S. cerevisiae* se debe a su adaptación a los cambios ambientales que ocurren durante la fermentación, como son el aumento de temperatura, las condiciones de anaerobiosis y el aumento de la concentración de etanol (Fleet y Heard, 1993; Fleet, 2007), que favorecen su crecimiento por encima del resto de las especies presentes, con una menor tolerancia a etanol y temperatura y/o una menor capacidad fermentativa. No obstante, aunque *S. cerevisiae* termine como agente principal del proceso de fermentación, la rapidez o eficacia con la se impone sobre el resto de la microbiota es considerablemente variable, viéndose especialmente alterada por la temperatura y la carga microbiana inicial.

En la actualidad, para garantizar una imposición eficiente, la fermentación se lleva a cabo realizando inoculaciones de cultivos puros (cultivos iniciadores o *starters*) con cepas de levadura seleccionadas, en forma de levadura seca activa, (Boulton et al., 2002), a la vez que se adicionan sulfitos ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) para inhibir el crecimiento de la microbiota autóctona (Sandraud y Chauvert, 1985). La utilización de levaduras seleccionadas garantiza una óptima fermentación y una mayor homogeneidad del proceso (Bauer y Pretorius, 2000). Actualmente, la utilización de fermentaciones espontáneas en la industria no es muy habitual, aunque está ganando popularidad y es común en la elaboración de vinos específicos, por ejemplo, los llamados “vinos naturales” que buscan una mayor complejidad sensorial (Zamora, 2009) y cierta diferenciación de la homogeneidad a la que pueden dar lugar las levaduras comerciales, gracias a la diversidad metabólica que aporta la microbiota nativa de la uva.

Aunque el número de cepas iniciadoras de *S. cerevisiae* que ofrece el mercado permite un gran abanico de opciones, existe un interés cada vez mayor por aumentar la variedad aromática, sin renunciar a la homogeneidad en la producción y minimizando los riesgos de una mala fermentación. Por este motivo la industria está incorporando cultivos iniciadores de levaduras de géneros alternativos a *Saccharomyces*; son las llamadas no-*Saccharomyces*. Estas levaduras

habían sido consideradas tradicionalmente como causantes de defectos en el vino, como paradas fermentativas o aromas desagradables por generación de compuestos como el ácido acético (*Zygosaccharomyces*), aminas (*Issatchenkia* y *Torulaspota*) o compuestos azufrados (*Torulaspota* y *Candida*) (Capozzi et al., 2015). Sin embargo, en la actualidad muchas levaduras no-*Saccharomyces* son consideradas una fuente de diversificación organoléptica de los vinos (Roudil et al., 2020) y ya son utilizadas como cultivos iniciadores. *Lachancea thermotolerans* y *Torulaspota delbrueckii* en co-inoculación con *S. cerevisiae*, fueron las primeras levaduras no-*Saccharomyces* en ser comercializadas para tal fin en el año 2004, siendo aún las levaduras alternativas más populares (Roudil et al., 2020). No obstante, existe cada vez una mayor diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas y disponibles en el mercado, que aportan distintas cualidades, por ejemplo, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri* (Roudil et al., 2020), *Hanseniaspora vineae* (Lleixá et al., 2016), o *Schizosaccharomyces pombe* (Roudil et al., 2020). Aunque en algunos ensayos publicados estas levaduras pueden llevar a cabo una fermentación de forma satisfactoria (Sadoudi et al., 2012; Belda et al., 2015), por lo general son usadas en combinación, bien simultánea (co-inoculación), bien secuencialmente, con *S. cerevisiae*, ya que en su mayoría presentan problemas de parada fermentativa, no consumiendo la totalidad de azúcares del mosto y facilitando la colonización por microorganismos no deseados.

El riesgo de fermentaciones incompletas y alteraciones microbianas durante la fermentación no es nuevo. Pasteur (1857) ya relacionó las condiciones de asepsia y la utilización de cultivos puros con el éxito en la fermentación, y sobre estas bases en 1883 Emil Christian Hansen desarrolló en la Fundación Carlsberg, en Copenhague, el primer cultivo iniciador para la fermentación alcohólica, en este caso de cerveza, *Saccharomyces carlsbergensis*. (actualmente englobada dentro de la especie *S. pastorianus*). Sin embargo, como ya se ha mencionado, el vino ha constituido un alimento desde mucho antes de los avances científicos del s. XIX, y garantizar una óptima producción debió de suscitar gran interés desde su origen. Ya en el s. I encontramos consejos de limpieza y “sanitización” de lagares y tinajas con agua salada y pez (Columela, 4dc-70dc), y existen pruebas arqueológicas de tapones, resinas para impermeabilizar contenedores y aditivos como sales y hierbas que ayudarían tanto a mantener la estabilidad biológica del vino como a evitar su oxidación (Harutyunyan y Malfeito-Ferreira, 2022). Una forma tradicional para conseguir cierto control microbiológico de la fermentación es el “pie de cuba”, que consiste

en la adición de una parte de mosto ya fermentado con éxito a una nueva partida de mosto. Esta selección inconsciente de microorganismos, así como el comercio y transporte de productos fermentados, llevó probablemente a la domesticación y dispersión del principal agente de la fermentación, *S. cerevisiae*.

### 2.3. Fermentación maloláctica

Una vez completada la fermentación alcohólica, la elaboración de vino puede requerir de un segundo proceso microbiológico, la fermentación maloláctica, sobre todo en vinos tintos. Esta fermentación transforma el ácido málico en ácido láctico, y es llevada a cabo por las bacterias del ácido láctico. Este ácido es más suave al paladar, reduciendo la acidez del vino y evitando el enmascaramiento de ciertos compuestos volátiles.

Los ácidos tienen un papel importante en la configuración organoléptica del vino, así como en el mantenimiento de su color. Además, junto con la presencia de etanol, el bajo pH del vino contribuye a su estabilidad microbiológica, especialmente tras el embotellado, creando un ambiente hostil para cualquier microorganismo contaminante (van de Guchte, 2002).

Aunque Pasteur, en 1873, fue el primero en hablar de las bacterias del ácido láctico en el vino, no fue hasta 1939, con los trabajos de Émile Peynaud que se confirmó el papel de la fermentación maloláctica en la disminución de la acidez y en la mejora de la estabilidad microbiológica tras el embotellado del vino.

Durante la fermentación maloláctica, el carácter astringente del ácido málico es sustituido por el sabor más agradable del ácido láctico. Pero, además, se forman ésteres como el acetato de etilo, el lactato de etilo, el octanoato de etilo y el hexanoato de etilo (de Revel et al., 1999) que ejercen un impacto importante en el perfil aromático y la calidad del producto final. Las bacterias del ácido láctico también liberan al mosto fermentado otros metabolitos que contribuyen a enmascarar aromas herbáceos, astringencia y amargor, lo que es especialmente importante en vinos tintos y blancos espumosos (Lepe y Leal, 2004; Bartowsky et al., 2015).

Cabe destacar que, además de llevar a cabo la fermentación maloláctica, algunas bacterias del ácido láctico pueden disminuir la calidad del vino debido a otros factores, como la generación de aminas biógenas, o de precursores de carbamato de etilo, una molécula potencialmente carcinógena. Aunque el principal precursor de carbamato de etilo en vino se produce mediante la

combinación de etanol con la urea secretada por las levaduras. También pueden generarse precursores a partir de los productos de degradación de la arginina, como la citrulina, segregados por varias especies de bacterias del ácido láctico (Mira de Orduña, 2001).

La fermentación maloláctica permite generar energía sin consumir azúcares. En esta fermentación, la salida de ácido láctico desde la célula es canalizada por un simportador de protones (Cox et al., 1989). Esto provoca su retorno a favor del gradiente de concentración (el pH celular se sitúa en torno a 6, mientras que el del mosto está entre 3 y 4). Esta entrada de protones, acoplada a una ATP sintetasa, permite la generación de ATP. Al no depender del consumo de azúcares, las bacterias del ácido láctico pueden prosperar en un mosto fermentado, sin azúcar residual, gracias también a la presencia de otros nutrientes liberados por las levaduras. Sin embargo, dado las hostiles condiciones que presenta el mosto fermentado, no todas las bacterias del ácido láctico son capaces de crecer en él. Estas bacterias, al igual que las levaduras, se encuentran presentes de forma natural en vides, uvas, equipamiento de bodega y en general en todo el proceso productivo del vino. Sin embargo, el pH, la falta de nutrientes y la concentración de alcohol en el mosto fermentado, son los agentes que modulan la presencia y el crecimiento de las diferentes especies bacterianas (Fleet et al., 1984). Las bacterias del ácido láctico que pueden encontrarse durante la vinificación pertenecen principalmente a dos familias: *Lactobacillaceae*, donde se encuentran los grupos *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostocaceae* siendo los géneros más comunes *Leuconostoc* y *Oenococcus*. Las bacterias del ácido láctico a su vez pueden ser divididas en función de sus características metabólicas (Muñoz et al., 2011) en:

- Homofermentativas: Bajo condiciones de exceso de glucosa (u otras hexosas) y baja disponibilidad de oxígeno estas bacterias consumen azúcares a través de la ruta Embden-Meyerhof, generando ácido láctico (2 moles por cada mol de glucosa), CO<sub>2</sub> y ATP.
- Heterofermentativas: Estos organismos consumen hexosas y pentosas a través de la ruta de las pentosas fosfato, dando como subproductos ácido láctico (un mol por cada mol de azúcares), etanol, CO<sub>2</sub> y ATP. A diferencia de las homofermentativas, estos organismos también pueden utilizar oxígeno y piruvato como aceptor final de electrones, generando ácido acético y más ATP.

- Heterofermentativas facultativas: En función del tipo de azúcares del medio estas bacterias pueden presentar ambos tipos de metabolismo, homofermentativo o heterofermentativo.

Al inicio de la fermentación, pueden encontrarse cerca de  $10^3$ - $10^4$  UFC/mL de bacterias del ácido láctico, la gran mayoría de metabolismo homofermentativo (Muñoz et al., 2005). Las especies más abundantes son *Lactiplantibacillus plantarum* (antes *Lactobacillus plantarum*), *Lentilactobacillus hilgardii* (antes *Lactobacillus hilgardii*), *Lactocaseibacillus casei* (antes *Lactobacillus casei*), *Leuconostoc mesenteroides* y *Pediococcus damnosus*. La abundancia relativa de estas especies depende en gran medida del punto de madurez y estado fisiológico de la uva durante su recogida. Al igual que ocurre con las levaduras, la competencia entre estas bacterias durante la fermentación maloláctica reduce su diversidad, de modo que persisten aquellas con mayor tolerancia a etanol y mayor resistencia a un pH bajo. Al igual que ocurre con *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica, los rasgos fisiológicos de la especie *Oenococcus oeni* están especialmente adaptados a este ambiente y suele ser la especie dominante en los procesos espontáneos de fermentación maloláctica.

Debido al gran peso que tiene la fermentación maloláctica sobre las características organolépticas del vino, desde principios de los años 80 existen en el mercado cepas seleccionadas de bacterias del ácido láctico para asegurar el éxito en el proceso. Las especies más utilizadas como cultivos iniciadores son *O. oeni* y *L. plantarum*, que parecen ser las más tolerantes a las condiciones presentes en el mosto fermentado (Cavin et al., 1993; Guerzoni et al., 1995).

### 3. SACCHAROMYCES CEREVISIAE

#### 3.1. Origen y ecología

La taxonomía del género *Saccharomyces* está en constante revisión. En este momento engloba ocho especies: *S. uvarum*, *S. paradoxus* (la especie más cercana a *S. cerevisiae*, Rokas et al., 2003), *S. mikatae*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* y *S. cerevisiae*. Estas especies a su vez han dado lugar a híbridos, en ambientes tanto naturales, como humanos e industriales (Alsammar y Delneri, 2020).

Aunque *S. cerevisiae*, gracias a su papel industrial, es uno de los microorganismos más estudiados, su origen y, sobre todo, su nicho biológico, son

aún motivo de debate. Desde hace décadas se viene proponiendo que, debido a su escasa presencia en entornos naturales, *S. cerevisiae* debía provenir de un híbrido entre especies naturales seleccionadas a través de la actividad humana (Winge, 1994; Johnston y Mortimer, 1986) convirtiéndose, hasta donde sabemos, en el primer microorganismo domesticado (Martini, 1993), y que su transporte y diseminación se produce gracias a insectos que son atraídos por el etanol y los componentes aromáticos que producen estas levaduras (Mortimer y Polsinelli, 1999; Buser et al., 2014), de forma que tendrían un nicho nómada (Goddard y Greig, 2015), moviéndose de forma continua entre ambientes industriales (procesos anaeróbicos) y naturales (superficies vegetales).

La secuenciación completa de su genoma y la comparación genética de aislados de *S. cerevisiae* de diversos orígenes, ha permitido identificar rastros genómicos del proceso de domesticación desde un ancestro silvestre. Se han identificado reordenaciones cromosómicas (Perez-Ortín et al., 2002; Almeida et al., 2017), transferencia horizontal de genes (Novo et al., 2009; Almeida et al., 2017), una alta heterozigosidad, variaciones estructurales, mutaciones puntuales y alteraciones en el número de copias de diversos genes (Warringer et al., 2011; Almeida et al., 2017). La combinación de estas características genera una gran diversidad fenotípica en la especie. Los datos parecen indicar que *S. cerevisiae* no fue domesticada de forma homogénea, ni dentro de un único ambiente estable. El aumento del número de análisis genéticos de aislados procedentes de distinto origen está arrojando nuevos datos sobre la ecología de esta especie, (Marsit y Dequin, 2015), demostrando la existencia de distintos clados, algunos estrechamente ligados a actividades humanas, (Liti et al., 2009; Peter et al., 2018). La gran diversidad de las líneas chinas sugiere que el origen de *S. cerevisiae* se encuentra en Asia oriental (Wang et al., 2012; Duan et al., 2018), con un único ancestro común para el resto de cepas no-chinas, que sufrió distintos eventos independientes de domesticación (Peter et al., 2018).

En el caso de las levaduras vínicas, el 95% de las cepas aisladas tiene un origen común (Legras et al., 2007), probablemente fruto de un cuello de botella generado durante su domesticación (Borneman et al., 2016; Peter et al., 2018) y su pariente silvestre más cercano, hasta la fecha, está asociado a robles de la región mediterránea (Almeida et al., 2015). Estas cepas son mayoritariamente diploides, con pocos ejemplos de haploidía y poliploidía (Bakalinsky y Snow, 1990; Codón et al., 1995), homotáticas, presentan baja heterozigosidad (Peter et al., 2018); y poseen un alto polimorfismo en la longitud de sus cromosomas (Radichi et al.,

1999; Bidden et al., 1992), lo que determina una alta variabilidad en su capacidad de esporulación (0%-75%) y en la viabilidad de las esporas (0-98%). Presentan una rápida adaptación al medio, gracias no tanto a la diversidad generada con mutaciones espontáneas, que se dan en muy baja proporción, sino a la gran capacidad de reorganización cromosómica (Puig et al., 2000), debida a translocaciones cromosómicas que generan elementos transponibles como el elemento-Ty (Longo y Vézinhel, 1993; Rachidi et al., 1999), entrecruzamientos mitóticos (Aguilera et al., 2000) y conversión génica (Puig et al., 2000).

La variabilidad en la ploidía dentro de la especie *S. cerevisiae* es un fenómeno que aumenta su capacidad de adaptación a entornos cambiantes y permite aumentar la cantidad de genes para algunos procesos metabólicos importantes, por ejemplo, la fermentación (Salmon, 1997; Bakalinsky y Snow, 1990). Esta plasticidad genómica, que permite la viabilidad de organismos con distinta carga genómica, favorece la generación de híbridos estables con especies cercanas.

El genoma haploide de *S. cerevisiae* está formado por, aproximadamente, 12 Mbp distribuidas en 16 cromosomas, comprendiendo alrededor de 6000 genes codificantes (Goffeau et al., 1996). El genoma actual de *S. cerevisiae* (y de otras pocas especies) surgió como resultado de un evento de duplicación completa de un genoma ancestral (*Whole Genome Duplication, WGD*), datada hace unos 100 millones de años (Wolfe y Shield, 1997; Kellis et al., 2004). Aunque una gran mayoría de los genes duplicados se han ido perdiendo a lo largo del proceso evolutivo, en el caso de *S. cerevisiae* se estima que al menos un 13% de sus proteínas provienen de esa antigua duplicación (Wolfe y Shield, 1997). La existencia de genes redundantes dentro del genoma es una potente fuente de especialización, ya que permite la adquisición de nuevas funciones, sin perder la función celular original. En el caso de *S. cerevisiae* la duplicación génica parece haber permitido un aumento en la capacidad glucolítica, lo que eventualmente contribuyó al efecto Crabtree, del que se hablará más adelante (Conant y Wolfe, 2007; Hagman et al., 2013)

La colinealidad del orden de genes (sintenia) entre especies distintas de Hemiascomycetos, parece indicar que la duplicación de pequeñas regiones genómicas, seguida de especialización y pérdida de genes, ha sido un mecanismo fundamental en la evolución de este grupo biológico. Mediante comparación genómica, se ha encontrado que dentro de las distintas especies del género *Saccharomyces* las regiones subtelméricas son las más variables, abundando

familias de genes repetidos, precisamente por la duplicación de estas regiones, (Ness y Aglie, 1995; Fischer et al., 2000; Kellis et al., 2003). Se cree que estos mecanismos son causantes de adaptaciones rápidas al medio, incluyendo la adaptación industrial de estos microorganismos. Se han encontrado en estas regiones subteloméricas numerosos miembros de la familia de genes transportadores de hexosas (Bargues et al., 19996); genes implicados en la hidrólisis de la sacarosa (*SUC*) (Carlson et al., 1998), maltosa (*MAL*) (Chow et al., 1989) o melibiosa (Naumova et al., 1997); genes importantes para la floculación (Teunissen y Steensma, 1995) o de resistencia a tóxicos presentes en melazas industriales (*RTM*) (Ness y Aigle, 1995). Por otro lado, las duplicaciones y translocaciones han podido tener un gran impacto en la especialización del género *Saccharomyces* no solo por la adquisición de rasgos adaptativos, sino también por el aislamiento reproductivo que producen, impidiendo la descendencia de los híbridos (Delneri et al., 2003; Fischer et al., 2001).

### 3.2. Especialización

La abundancia de *S. cerevisiae* en la superficie de la uva es asombrosamente baja. En 1999 Mortimer y Polsinelli encontraron esta especie en 1 de cada 100 uvas íntegras. Sorprendentemente, si se observaban uvas gravemente dañadas su presencia pasaba a estar en 1 de cada 4. Más recientemente (2014), Taylor y colaboradores, determinaron mediante análisis metagenómico que solo 1 de cada 20.000 levaduras en la superficie de la uva pertenecían a la especie *S. cerevisiae*. Esta especie tiene incluso una escasa presencia en la microbiota intestinal de insectos (Stefanini et al., 2012), aunque este ambiente contribuye a su diseminación y es donde, según algunas hipótesis, consigue completar su ciclo de vida.

El éxito de *S. cerevisiae* en la fermentación alcohólica se debe a su gran especialización, que no es fruto de un único elemento, ni siquiera de rasgos exclusivos de esta especie, sino de una combinación de distintas adaptaciones.

#### 3.2.1. Tolerancia a factores de estrés

Durante la fermentación del mosto de uva existe una gran presión osmótica, carencia de oxígeno, pH considerablemente bajo y altas concentraciones de etanol conforme avanza la fermentación. A estos factores se añaden las complejidades de cada estilo de vinificación, incluyendo temperaturas subóptimas (por exceso o defecto), alto contenido en polifenoles (tintos), altas

presiones (vinos espumosos) y crecimiento aeróbico en un medio con etanol (envejecimiento biológico), (Novo et al., 2012).

*S. cerevisiae* presenta una respuesta de estrés ambiental (ESR, por sus siglas en inglés) regulada por los factores de transcripción Msn2 y Msn4 (Berry y Gasch, 2008). Además, mediante análisis transcriptómico se ha definido también una respuesta a estrés fermentativo (FRS, por sus siglas en inglés) (Rossignol et al., 2003; Marks et al., 2008), que implicaría a más de 200 genes, de los cuales un 20% participan en la ESR. Otros muchos genes se encontrarían implicados también en otros mecanismos de resistencia a estrés, como el ayuno de nitrógeno, la toxicidad por etanol, la presión osmótica o el estrés oxidativo. Hay que tener en cuenta que la gran mayoría de rasgos de interés enológico son cuantitativos lo que dificulta su caracterización genética.

La tolerancia al gran número de factores de estrés que presenta la vinificación industrial requiere de la coordinación de varios mecanismos celulares a través de complejas redes de señalización (Gustin et al., 1998; Estruch, 2000). Por ejemplo, la tolerancia a estrés osmótico está mediada por una cascada de MAP quinasas (la ruta HOG), implicada en la sobreproducción de glicerol para el mantenimiento de la homeostasis (Hohmann, 2015); pero también necesita del correcto funcionamiento mitocondrial y del aparato de Golgi (Gonzalez et al., 2016). La tolerancia a etanol y temperatura depende en gran medida de la composición lipídica de la membrana; pero también de la acumulación de compuestos antioxidantes, chaperonas, presencia de ATPasas en la membrana plasmática, síntesis de trehalosa y funciones mitocondriales (Swan y Watson, 1997; Piper, 1995; Torija et al., 2003; García-Ríos et al., 2017). Una aneuploidía en el cromosoma III se ha relacionado con la resistencia a etanol (Morard et al., 2019) y temperatura (Yona et al., 2012). Cabe mencionar que para algunos autores la tolerancia al aumento de temperatura es un factor significativo para la imposición de *S. cerevisiae* en el entorno industrial (Goddard, 2008).

Hay que tener en cuenta que muchas especies de levaduras son anaerobias facultativas, pero muy pocas son capaces de crecer en un ambiente anaeróbico por largos periodos de tiempo. Esto es debido a que la gran mayoría de eucariotas requieren de la presencia de oxígeno para la síntesis de pirimidinas, ya que poseen enzimas dihidroorotato deshidrogenasas dependientes de la cadena respiratoria. Sin embargo, durante su evolución algunas *Saccharomycetaceae* adquirieron mediante transferencia horizontal una dihidroorotato deshidrogenasa bacteriana (Hall et al., 2005) que no requiere de la respiración, al

usar fumarato como aceptor de electrones (Gojković et al., 2004). También la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados es dependiente de oxígeno, pero las levaduras pueden incorporar lípidos de origen vegetal durante la fermentación (Luparia et al., 2004).

Además de todo lo anterior, las cepas enológicas son muy resistentes al dióxido de azufre. Aunque está en discusión cuándo empezó a utilizarse el sulfitado en la elaboración de vino, parece claro que su uso no es en absoluto reciente (Lück y Jager, 1997). El sulfitado evita la oxidación a la vez que es la principal forma de eliminar organismos contaminantes en el vino (Bauer y Pretorius, 2000). Por esta razón, es fundamental la resistencia de *S. cerevisiae* a este agente químico, siendo un rasgo clave en la selección de cepas como cultivos iniciadores (Divol et al., 2012). La disolución de dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) en el mosto produce sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). La resistencia a este compuesto se adquiere a través de distintos mecanismos, como la sobreproducción de acetaldehído que se une al  $\text{SO}_3^{2-}$  y la regulación de la entrada de sulfito al interior celular. Sin embargo, el mecanismo más importante para la tolerancia a sulfito es la expulsión mediada por la permeasa Ssu1. Numerosos estudios han identificado como distintas translocaciones en el promotor del gen *SSU1* aumentan la transcripción del gen, situando el gen bajo la regulación de la región *EMC34* (translocación entre los cromosomas XVI y VIII) (Pérez-Ortín et al., 2002), bajo el promotor constitutivo de la alcohol deshidrogenasa, *ADH1* (cromosomas XVI y XV) (Zimmer et al., 2014) o mediante una inversión en el propio cromosoma XVI (cromosoma nativo del gen *SSU1*) (García-Ríos et al., 2019). Parece que las translocaciones en *SSU1* que aumentan la resistencia a sulfito contribuyen al aislamiento reproductivo de las cepas vínicas (Hyma y Fay, 2012; Hou et al., 2014; Clowers et al., 2015).

Otro fenómeno genético que ha permitido la especialización de *S. cerevisiae* es la introgresión genómica a partir de otras especies de levaduras (Tabla 1). Parece que más de 900 marcos abiertos de lectura (ORF) del pangenoma de la especie *S. cerevisiae* provienen de una introgresión desde el genoma de su pariente más cercano, *S. paradoxus* (Peter et al., 2018). En el caso de las cepas vínicas, se estima que éste es el origen de entre 25 y 50 ORFs por cepa. Además, se han encontrado introgresiones desde especies mucho más alejadas filogenéticamente. Por ejemplo, en la cepa vínica EC1118 (Lallemand, Inc.), muy utilizada como cultivo iniciador, se han encontrado 3 regiones (denominadas A, B y C) procedentes de *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspota microellipsoides* y *Torulaspota delbrueckii* (Novo et al., 2009; Marsit et al., 2015).

**Tabla 1:** Principales eventos de transferencia horizontal identificados en *Saccharomyces* (modificado de Gonçalves y Gonçalves, 2022).

Donante	Receptor	Genes	Función	Referencias
<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	VDE	Endonucleasa	Koufopanoue et al., 2002
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>	VDE	Endonucleasa	Okuda et al., 2003
<i>Lactobacillales</i> bacterias	<i>Saccharomyces</i> / <i>Kluyveromyces</i>	URA1	Biosíntesis de pirimidinas	Gojković et al., 2004
Alfa-proteobacterias	<i>Saccharomyces spp.</i>	BDS1	Utilización del sulfato	Hall et al., 2005
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>	Ty2	Retrotransposón	Liti et al., 2005
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Ty1	Retrotransposón	Czaja et al., 2020
Gamma-proteobacteria Alfa-proteobacteria	<i>Saccharomycotina</i>	BIO3, BIO4	Síntesis de biotina	Hall y Dietrich, 2007
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Regiones A, B y C	Varias	Novo et al., 2009
<i>Saccharomycotina</i>	<i>Saccharomycotina</i>	FSY1	Transportador de fructosa	Coelho et al., 2013; Galeote et al., 2010
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	ASP3	Degradación de asparagina	League et al., 2012
<i>Torulospira microellipsoides</i>	Cepas enológicas de <i>S. cerevisiae</i>	Genes FOT	Transporte de oligopéptidos	Marsit et al., 2015

Algunas de estas transferencias, como el caso de “cesión” desde *T. microellipsoides*, parecen provenir de una fase transitoria heterocariótica en un híbrido inestable entre ambas especies (Legras et al., 2018).

Se han podido relacionar fragmentos de estas regiones transferidas con adaptaciones específicas para la fermentación, como el ayuno de nitrógeno, al portar dos transportadores de oligopéptidos (Devia et al., 2020); o el transportador de fructosa de alta afinidad *FSY1*, localizado en la región C (Galeote et al., 2010) que al ser inducido por etanol conferiría una gran ventaja en la fase final de la fermentación cuando existe una escasa concentración de fructosa (la glucosa es consumida mucho antes) y grandes cantidades de etanol.

### 3.2.2. Efecto Crabtree

*S. cerevisiae* es un microorganismo anaerobio facultativo. Sin embargo, en condiciones de aerobiosis la mayoría de su metabolismo sigue siendo

fermentativo (Swanson y Clifton, 1948). En 1954, Lemoigne, Aubert y Millet describieron el crecimiento diáuxico de *S. cerevisiae*. En ambiente aerobio y altas concentraciones de azúcar existía un primer crecimiento muy rápido, asociado a metabolismo fermentativo, para después, cuando la cantidad de azúcares disponibles era menor de 10g/L, pasar a una segunda fase de crecimiento más lento donde se oxidaba el etanol. Sin embargo, en las mismas condiciones de aerobiosis, pero bajo una menor concentración de azúcares no parecía existir este crecimiento diauxico, no existiendo metabolismo fermentativo.

Este efecto, inicialmente llamado “contre-effect Pasteur” (ya que el efecto Pasteur es la inhibición de la fermentación cuando hay disponibilidad de oxígeno) y más tarde efecto Crabtree (Crabtree, 1929), consiste en la inhibición de la respiración cuando existe una concentración umbral de azúcar en el medio, independientemente de la disponibilidad de oxígeno que exista (De Deken, 1966). Según su regulación respiro-fermentativa podemos encontrar levaduras Crabtree-negativas (uso exclusivo de la respiración en ambiente aerobio) o Crabtree-positivas, si presentan el comportamiento descrito.

Aunque desde su descubrimiento se han propuesto distintas hipótesis sobre el origen del efecto Crabtree, los trabajos realizados con mutantes de la enzima piruvato descarboxilasa, parecen indicar que la causa primera del efecto Crabtree es un desbordamiento en el metabolismo del piruvato, fruto de un consumo intensivo de azúcares (lo que se ha denominado efecto Crabtree a corto plazo) (Flikweert et al., 1996; Pronk et al., 1996; Dai et al., 2018). Por otro lado, la represión transcripcional de la función mitocondrial y respiratoria contribuyen al denominado efecto Crabtree a largo plazo (Hagman et al., 2013).

El hecho de mantener un metabolismo fermentativo en condiciones aeróbicas bajo cierta concentración umbral de azúcares (Crabtree-positivas) ofrece numerosas ventajas. Es cierto que la respiración es más eficiente en términos de energía y biomasa, pero la fermentación supone un consumo más rápido de las hexosas del medio, es más competitiva que la respiración en términos de inversión enzimática (Nilsson y Nielsen 2016) y genera como subproducto una molécula que además de ser tóxica para potenciales competidores, puede a su vez ser fuente de carbono cuando se han consumido los azúcares del medio, ya que en ese entorno cesa la inhibición del metabolismo respiratorio. Esta estrategia metabólica, asociada al efecto Crabtree se ha denominado *make-accumulate-consume* (Piskur et al., 2006).

En levaduras, el efecto Crabtree es la consecuencia de varios eventos evolutivos, como la WGD, la duplicación de transportadores de hexosas y modificaciones en el metabolismo energético (Wolfe y Shields, 1997; Piškur et al., 2006; Conant y Wolfe, 2007; Hagman et al., 2013). Sin embargo, la estrategia *make-accumulate-consume* es posible en gran parte por la duplicación de las enzimas alcohol deshidrogenasa (Adh). En la fermentación las levaduras reciclan el NADH a través de la conversión de acetaldehído hacia etanol, gracias a la acción de esta enzima. *S. cerevisiae* posee al menos 5 copias del gen *ADH*. Las isoenzimas I, III, IV y V reducen el acetaldehído hacia etanol durante la fermentación alcohólica, mientras que la isoenzima II se encuentra reprimida bajo altas concentraciones de glucosa (represión por catabolito, que se describirá más adelante) y cataliza la reacción contraria, la oxidación del etanol hacia acetaldehído, que puede incorporarse al ciclo de Krebs. Cabe destacar que, pese a que los genes *ADH1* y *ADH2* comparten el 89% de su secuencia, las enzimas que codifican difieren en su afinidad por el sustrato. La isoenzima II presenta una  $K_m$  por el etanol 10 veces menor que el resto de las isoenzimas (Ciriacy, 1975; Russell et al., 1983; Thomson et al., 2005).

### **3.2.3. Represión por catabolito de carbono (CCR)**

La represión por catabolito de carbono está presente tanto en *S. cerevisiae* como en muchos otros microorganismos (Santangelo, 2006; Papini et al., 2012). Se trata de un mecanismo por el cual la presencia de una fuente de carbono concreta (principalmente glucosa) reprime la transcripción de genes implicados en la catálisis de otras fuentes de carbono. Esta represión permite la optimización del consumo del azúcar mayoritario del medio (Gancedo et al., 1992), “especializando” el metabolismo de manera transitoria.

Entre otros efectos, la glucosa inhibe en *S. cerevisiae* la síntesis de enzimas respiratorias (y con ello el ciclo de Krebs) (Ephrussi et al., 1956; Lynen et al., 1959); de enzimas del ciclo del glioxilato (Polakis et al., 1965; Witt et al., 1966); de enzimas de la gluconeogénesis (Gancedo et al., 1965; Haarasilta et al., 1975); y de enzimas que catalizan la hidrólisis de disacáridos (Sutton et al., 1962; Dodyk et al., 1964; van Wijk et al., 1969).

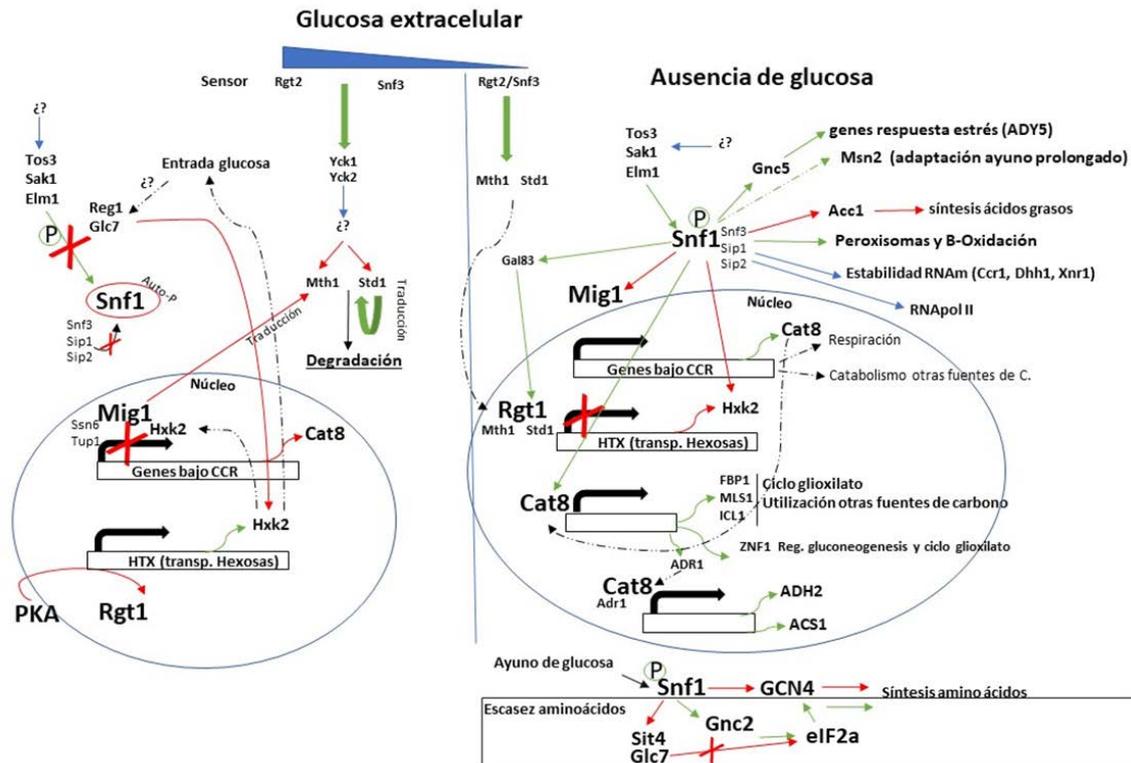
Este complejo entramado de regulación se origina a partir de una ruta de señalización por cascada de proteínas quinasa (Figura 2). Las proteínas Snf3 y Rgt2 detectan distintas concentraciones de glucosa extracelular según el ratio de glucosa interno/externo (bajas y altas concentraciones, respectivamente), (Kaniak

et al., 2004; Özcan y Johnston, 1999; Özcan, 2002). Aunque ambos sensores pertenecen a la familia de los transportadores de hexosas (*HXT*) y son estructuralmente similares a estos, no pueden actuar como transportadores de glucosa (Özcan, Dover y Johnston, 1998). De hecho, la detección de glucosa extracelular modula la propia regulación transcripcional de los genes *HXT*. Cuando la glucosa es abundante se expresan transportadores de baja afinidad como Hxt1, mientras que cuando la disponibilidad de glucosa baja, se expresan transportadores de alta afinidad, como Hxt7, mientras que la expresión de los contrarios se reprime (Özcan, 2002).

Cuando Snf3 y Rgt2 detectan glucosa extracelular, las proteínas kinasa de membrana *Yck1* e *Yck2*, adheridas a los sensores, se activan. *Yck1* e *Yck2* parecen fosforilar un intermediario (Pasula et al., 2010) que a su vez actúa sobre *Mth1* y *Std1*, dos proteínas reguladoras cuya fosforilación lleva a su ubiquitinación y degradación (Spielewoy et al, 2004). Si la detección de glucosa no se produce, ambos reguladores se unirán a *Mig1*, diana principal de la represión por CCR, mediante la acción de *Snf1*, el efector principal de la cascada de regulación (Figura 2).

*Snf1* es una kinasa central para la represión por glucosa. Cuando los niveles de glucosa extracelular son altos, *Snf1* está auto-reprimido por la interacción entre el extremo N-terminal, catalítico, y el C-terminal, regulatorio (Celenza y Carlson 1989; Jiang y Carlson 1996; Ludin, Jiang y Carlson 1998; Leech et al., 2003). Cuando los niveles de glucosa bajan esta auto-inhibición se interrumpe y permite la interacción entre la subunidad *Snf4* y la subunidad *Snf1*, produciéndose su activación. Al contrario que la AMPK de mamíferos, *Snf1* no está regulada por AMP sino por ADP, lo que asegura una coordinación directa entre el metabolismo energético y este regulador clave (Mayer et al., 2011).

Para su total funcionalidad *Snf1* requiere la fosforilación del residuo Thr<sup>210</sup>, (McCartney y Schmidt 2001), mediada por *Sak1*, *Elm1* y *Tos3* (Hong et al., 2003; Nath, McCartney y Schmidt 2003; Sutherland et al., 2003), cuya actividad no parece estar afectada por la concentración de glucosa (Rubestein et al., 2008), siendo la desfosforilación de *Snf1* por parte del complejo *Glc7/Reg1* fosfatasa (PP1), (Feng et al., 1991; Tu y Carlson, 1995) la causa de la represión por CCR. La adición de glucosa causa un rápido incremento de la actividad de *Reg1*, lo que genera a su vez una inactivación de *Snf1* (Castermans 2012), (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de los principales elementos de la represión por catabolito de glucosa. Las flechas verdes indican activación, mientras que las rojas indican represión. Las flechas azules indican modulación en ambos sentidos. Las flechas punteadas indican traslado o efecto a largo plazo. Elaborado a partir de la revisión bibliográfica de Kayikci y Nielsen, 2015.

Snf1 interacciona como activador o represor de varios factores de transcripción. El represor transcripcional Mig1 es su principal diana en la regulación mediada por CCR (Figura 2). Mig1 media la represión de genes reprimidos por glucosa, reclutando al complejo Ssn6/Tup1 (Treitel y Carlson, 1995; Lutfiyya et al., 1998).

Cuando Mig1 es fosforilado por Snf1 (en ausencia de glucosa), deja de localizarse en el núcleo, permitiendo la transcripción de los genes reprimidos por glucosa (Figura 2). Mig1 también interacciona con Hxk2 para silenciar la transcripción de genes inducidos por glucosa. Aunque Hxk2 es una kinasa de glucosa y fructosa, también modula la represión de genes regulados por CCR. En presencia de glucosa, Hxk2 fosforila Mig1 en la Ser<sup>311</sup> un residuo que es también diana de la fosforilación de Snf1 (Ahuatzi et al., 2007; Peláez, Herrero y Moreno 2010). Al ocupar ese sitio, Hxk2 evita la fosforilación por parte de Snf1 y la eliminación del núcleo de Mig1. Hxk2 es fosforilado y desfosforilado en la Ser<sup>14</sup> por Snf1 y Reg1/Glc7 respectivamente (Fernandez-García et al., 2012), estando a su vez bajo doble regulación; directa (por cascada de kinasas) e indirecta (por

represión de su transcripción ante escasez de glucosa, que se explicará a continuación) (Figura 2).

Cuando hay altas concentraciones de glucosa Snf1 está inactivo, lo que permite que Mig1 pueda localizarse en el núcleo y reprimir junto al complejo Ssn6/Tup1 genes necesarios para la utilización de otras fuentes de carbono (Gancedo, 1998; Hedbacker y Carlson, 2008). En este escenario, Mig1 reprime la expresión del gen *MTH1* evitando la represión de la transcripción de los genes *HXT* (Figura 2). Por el contrario, mientras Std1 se degrada, su transcripción se incrementa actuando como un mecanismo fino de control de la transcripción de los genes *HXT* cuando la glucosa se acaba (Kim y Johnston, 2006).

Mientras los represores Std1 y Mth1 se degradan, PKA se transloca al núcleo, lo permite que actúe sobre Rgt1 (Griffioen et al., 2000; Kim y Johnston, 2006; Roy et al., 2013, 2014) impidiendo también la represión de los genes *HXT* (Figura 2). Al permitir la síntesis de los transportadores permite mantener una entrada constante de glucosa incluso a niveles subóptimos. Cuando la glucosa cae por debajo de un nivel umbral, Mth1 y Std1 dejan de degradarse, quedando disponibles para interactuar con Rgt1 impidiendo el acceso de la PKA a los sitios de fosforilación de Rgt1 de forma que el represor permanece unido a los promotores, evitando la transcripción de los genes *HXT* cuando ya no queda glucosa que transportar en el medio (Flick et al., 2003). Paralelamente, Snf1 fosforila a Rgt1 incrementando su afinidad por el DNA y su actividad como represor transcripcional (Palomino, Herrero y Moreno, 2006).

Este complejo entramado de regulación permite que cuando no hay glucosa disponible en el medio, la levadura cambie su metabolismo de fermentativo a respiración, activando mecanismos para catabolizar otras fuentes de carbono, como etanol. Snf1 juega un papel fundamental en este cambio, regulando tanto la función represora de Mig1 como la transcripción de los transportadores de hexosas. Además de todo lo anterior, cuando Snf1 impide la represión por Mig1 permite la expresión del gen *CAT8* (Figura 2) (a su vez, Snf1 fosforila al propio regulador Cat8, activándolo (Hedges, Proft y Entian, 1995; Randez-Gil et al., 1997). Cat8 es un regulador cuya unión a los elementos de respuesta a fuentes de carbono (*Carbon source-responsive elements*, CSREs) permite la transcripción de genes necesarios para la utilización de otras fuentes de carbono (Young et al., 2003; Roth, Kümme y Schüller, 2004), como genes implicados en el ciclo del glioxilato y en la utilización de fuentes de carbono no

fermentables (Randez-Gil et al., 1997; Tachibana et al., 2007; Biddick, Law y Young, 2008; Weinhandl et al., 2014) (Figura 2).

La CCR es sobre todo un mecanismo de protección, que optimiza la utilización de energía. Bajo ayuno de glucosa, Snf1 reduce la biosíntesis de aminoácidos mediante la inhibición de la transcripción y traducción de *GCN4*, reduciendo el gasto energético en un entorno de ayuno. Sin embargo, si los aminoácidos son el factor limitante, Snf1 cambia su papel, activando a Gcn2 que lleva a la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (factor de iniciación eukariótico), iniciando la traducción de Gcn4. Cuando Snf1 está activo inhibe las fosfatasa Sit4 y Glc7 promoviendo el estado fosforilado de eIF2 $\alpha$  por lo que Gcn4 puede traducirse (Cherkasova, Qiu y Hinnebusch, 2010). Paralelamente, en condiciones de ayuno, Snf1 contribuye directamente a la inhibición de la síntesis de ácidos grasos, fosforilando e inactivando la acetilCoA carboxilasa 1, (*ACC1*) (Woods et al., 1994; Shirra et al., 2001), que cataliza el primer paso de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, siendo una reacción limitante de la ruta. A la vez, Snf1 aumenta la catálisis de ácidos grasos promoviendo la proliferación de peroxisomas y la  $\beta$ -oxidación. Finalmente, bajo condiciones de ayuno prolongado Snf1 fosforila al factor de transcripción general de respuesta a estrés Msn2, generando una respuesta adaptativa a la falta de glucosa (De Wever et al., 2005).

El doble papel represor/activador que ejerce Snf1 sobre distintos niveles de tan diferentes rutas metabólicas, subrayan su papel como orquestador de la regulación general del estado energético celular.

### 3.3. Contribución organoléptica

El vino es el resultado de un numeroso conjunto de reacciones bioquímicas que no se limitan a la fermentación alcohólica, sino que comienzan durante la maduración de la uva y continúan incluso más allá del embotellado. Su calidad viene definida por la combinación de aspectos como color, densidad y por supuesto sabor y aroma. La composición aromática del vino es enormemente compleja, con más de 800 compuestos aromáticos identificados (Rapp et al., 1990), provenientes tanto de la uva (aromas varietales o aroma primario), como de los tratamientos del mosto (aromas prefermentativos) y de la fermentación alcohólica y maloláctica (aromas fermentativos o aromas secundarios) (Schreier, 1979), además de aromas generados por el envejecimiento del vino (aromas terciarios o *bouquet*).

Aunque de esta plétora de compuestos los provenientes de la fermentación resultan estar en minoría (Robinson et al., 2011), tanto profesionales como consumidores pueden distinguir vinos cuya única diferencia radica en la selección de cepas usadas como cultivo iniciador (King et al., 2008; Swiegers et al., 2009; King et al., 2010), lo que indica que el componente “fermentativo” del perfil aromático (aroma secundario o *yeast-bouquet*), tiene un gran impacto en las propiedades organolépticas del vino. Estos aromas fermentativos son generados por el metabolismo secundario de las levaduras (Fleet, 1990; Lambrechts y Pretorius, 2000), siendo los compuestos más relevantes los alcoholes de cadena larga, sintetizados por el metabolismo de glúcidos y la ruta de Ehrlich (metabolismo de aminoácidos), (Hazelwood et al., 2008; Stewart, 2017); y los ésteres, que son producidos *de novo* por las levaduras (Cordente et al., 2012). En menor medida, aunque con un gran impacto estarían los ácidos (Hazelwood et al., 2008), el sulfuro de hidrógeno y el dióxido de azufre (Sumby et al., 2010; Styger et al., 2011; Styger et al., 2013). Ejemplos de alcoholes de cadena larga serían el 2-feniletanol, que aporta aromas a rosa, el isobutanol, asociado al olor a alcohol y el alcohol isoamílico, que otorga notas a mazapán (Dimitrov et al., 2018; Lai et al., 2022). Dentro de los ésteres podemos encontrar el acetato de etilo, asociado a sabores afrutados, el hexanoato de etilo, que aporta notas a manzana y plátano, o el octanoato de etilo, asociado a aromas de piña y pera, entre otros (Saerens et al., 2010). La concentración de la mayoría de los ésteres en el vino está cerca del límite de percepción humana, por lo que cualquier ligero cambio en su concentración tiene un impacto significativo en la percepción sensorial del producto (Saerens et al., 2010; Parapouli et al., 2020).

Las levaduras no solo contribuyen al perfil aromático por la generación directa de compuestos. Muchos componentes del aroma primario se encuentran en la uva como precursores, no teniendo impacto sensorial sino hasta que se hidrolizan al ser metabolizados por las levaduras (Mele et al., 2021). La síntesis de  $\beta$ -glucosidasas por parte de las levaduras, tiene un papel fundamental en la hidrólisis de estos precursores. Un compuesto clave para el aroma primario son los terpenos, que otorgan notas florales, cítricas y melosas. Ejemplos de éstos son el linalol, el terpineol o el geraniol, que comunican aromas florales a rosa y cítrico, siendo además perceptibles a bajas concentraciones (Dickinson et al., 2009; Bauer et al., 1990; Melé et al., 2021).

La literatura científica indica no solo que el aroma fermentativo es un factor fundamental para las propiedades organolépticas del vino, sino que existe

una gran diversidad de perfiles aromáticos en función de la cepa utilizada como cultivo iniciador. Por un lado, parece que los vinos elaborados por la inoculación de una única cepa difieren aromáticamente de aquellos producidos mediante fermentación espontánea (Valera et al., 2009). Como ya se ha comentado, la microbiota autóctona de la uva ejerce un papel sobre la composición química y aromática del vino (Lambrechts y Pretorius, 2000; Torija et al., 2001). Pero parece que además existe una interacción entre estas levaduras no-*Saccharomyces* y la cepa específica de *S. cerevisiae* utilizada como cultivo iniciador (Romano et al., 2003). Las interacciones también pueden tener lugar entre diferentes cultivos iniciadores cuando se recurre a prácticas como la co-inoculación y la inoculación secuencial, por la incorporación de cultivos iniciadores de especies no-*Saccharomyces* (Mencher et al., 2021). Además, parece existir una gran diferencia en cuanto a perfil sensorial entre vinos fermentados por cepas de *S. cerevisiae* enológicas y de otros orígenes (Varela et al., 2009; Hyma et al., 2011). Algunos autores hablan de la existencia de un fenotipo “sabor” como un posible rasgo de selección durante la domesticación de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Pretorius, 2000, Cordente et al., 2012).

Por último, las levaduras contribuyen también al “cuerpo” del vino, que es un importante factor de calidad. El glicerol, y en parte las manoproteínas liberadas por las levaduras, son las principales contribuciones a este carácter. El glicerol se produce fundamentalmente durante las primeras fases de la fermentación, tanto como osmolito compatible frente al estrés osmótico como para mantener el equilibrio redox de las células (Walker, 1998). Las manoproteínas son constituyentes estructurales de la pared celular de *S. cerevisiae*. Son liberadas por las células de levadura durante la fermentación, pero se puede incrementar su abundancia mediante procesos de crianza sobre lías (Caridi, 2006).

## 4. AUMENTO DEL GRADO ALCOHÓLICO DE LOS VINOS

### 4.1. Causas y efecto

Durante las últimas décadas la temperatura global ha aumentado a un ritmo sin precedentes históricos (NOAA *Global Climate Report for 2020*). Esto ha afectado a multitud de cultivos, incluyendo, por supuesto, a la vid.

Conforme las uvas maduran su contenido en azúcares va aumentando y su acidez se va reduciendo (madurez tecnológica), a la vez, la fruta va acumulando compuestos fenólicos y aromáticos hasta que alcanza el punto

óptimo de maduración (Olego et al., 2016). Con el aumento de las temperaturas y el cambio en las precipitaciones este patrón de maduración se altera, creándose un desfase temporal que es cada vez más pronunciado entre el momento de madurez tecnológica de la uva y su madurez fenólica y aromática (Jones y Webb, 2010; Holland y Smith, 2010; Keller, 2010; Mira de Orduña, 2010), de forma que el punto óptimo para su vendimia, de acuerdo con los criterios enológicos, llega cuando la uva ha alcanzado unos niveles excesivos de azúcares y presenta una acidez muy baja (Conibear, 2006; Mira de Orduña, 2010; Olego et al., 2016).

A consecuencia de la fermentación este aumento de azúcares se traduce en un aumento del etanol. Se estima que desde 1980 los vinos comerciales han incrementado, cada década, un 1% su contenido alcohólico. Aunque esta tendencia se ha observado en todo tipo de vinos y áreas de producción (Jones et al., 2005; van Leeuwen y Darriet, 2015), es aún más pronunciada en las regiones más cálidas (Alston et al., 2011; Godden et al., 2015), que son precisamente las áreas con mayor tradición vitivinícola.

El incremento del grado alcohólico supone un problema grave para la industria desde varios puntos de vista. Respecto a la fermentación hay que considerar que el etanol es una sustancia tóxica que a altas concentraciones puede perjudicar gravemente el crecimiento de las levaduras generando paradas fermentativas (Bisson, 1999; Bruescher et al., 2001; Coulter et al., 2008). A su vez, la fermentación maloláctica puede verse severamente afectada por el exceso de alcohol y la presencia de azúcares no consumidos debido a una parada de fermentación (Graça da Silveira et al., 2002). Por otro lado, un exceso de grado alcohólico se traduce en un desequilibrio sensorial (Goldner et al., 2009; Pickering et al., 1998), debido principalmente a que el etanol aumenta la solubilidad de algunos compuestos volátiles, reduciendo su percepción (Hartmann et al., 2002; Le Berre et al., 2007; Robinson et al., 2009). Esto enmascara aromas afrutados, aumenta el amargor y la percepción de astringencia y picor. En conclusión, un vino con un desequilibrio en la proporción de alcohol es percibido por el consumidor como desagradable y de baja calidad.

En cuanto a la comercialización, cada vez existe un mayor interés social por un estilo de vida saludable (Schmidtke et al., 2012), amparado también por la legislación (medidas de salud pública, regulaciones de tráfico etc.), de forma que bebidas con alta graduación alcohólica tienen cada vez menor aceptación (Saliba et al., 2013). El aumento de la graduación alcohólica afecta también al comercio internacional, al existir legislaciones que imponen distintas cargas tributarias en

función del contenido alcohólico (de Barros Lopes et al., 2003; Contreras et al., 2014).

#### **4.2. Soluciones frente al aumento de grado alcohólico**

Debido al interés del consumidor, el mercado lleva varios años ofreciendo vinos con un contenido alcohólico limitado, existiendo un abanico amplio de graduaciones, desde totalmente desalcoholizados (<0.5% v/v) hasta de baja graduación (7% - 11% v/v), pasando por prácticamente todos los valores intermedios (Pickering, 2000; Akyereko et al., 2021). Estos vinos, por lo general, son resultado de la desalcoholización del vino y su aceptación por los consumidores no es tan buena como cabría desear (Stasi et al., 2014; Sorio et al., 2019). Por el efecto que el alcohol ejerce sobre la composición aromática, la mayoría de los productores están interesados en vinos más equilibrados, fijando el objetivo en una reducción más limitada (12%-14% v/v) que simplemente compense el exceso provocado por el cambio climático (Meillon et al., 2010; Gambuti et al., 2011).

Las posibles soluciones para el aumento de grado alcohólico abarcan prácticamente la totalidad del proceso de producción. Hay estrategias que se centran en la reducción del contenido de azúcar de la uva; a través del deshojado, la deslocalización de viñedos; el manejo de suelos; la selección clonal y varietal, o el adelantamiento de la vendimia (Stoll et al., 2010; Whiting, 2010; Schmidtke et al., 2011; Ozturk y Anli, 2014). Todos estos abordajes tienen ciertas limitaciones, en muchos casos son costosos en tiempo y dinero (como la deslocalización de las viñas o la selección clonal) y no ofrecen soluciones globales al problema, ya que son dependientes del área climática donde se encuentre el viñedo y pueden afectar a otros factores relacionados con la calidad de la uva, como el deshojado (Olego et al., 2016), o la vendimia temprana, que impide la producción de precursores aromáticos, generando vinos de alta acidez y carácter herbáceo (Schmidtke et al., 2011; Ozturk y Anli, 2014).

La siguiente aproximación sería la eliminación de parte de los azúcares del mosto. Sin embargo, este abordaje es complicado. Se han propuesto soluciones como la dilución, agregando agua al mosto antes de la fermentación, algo controvertido e ilegal en algunos países productores, entre ellos España; o la oxidación enzimática de la glucosa a ácido glucónico, aunque resulta difícil de implementar por las propiedades de las enzimas disponibles, la necesidad de oxígeno y el propio ácido glucónico producido (Pickering et al., 1998; 1999).

Un abordaje que permitiría tanto la reducción de azúcares como la eliminación de parte del etanol sería la filtración mediante el uso de membranas (Mira et al., 2017). Sin embargo, este proceso no es tan selectivo como cabría desear, al eliminar el etanol se extrae también gran cantidad de agua y compuestos volátiles, exigiendo un segundo filtrado de estos compuestos para su reintegración (Akyereko et al., 2021; Catarino y Mendes, 2011; Labanda et al., 2009; Gonçalves et al., 2013; Diban et al., 2008; Fedrizzi et al., 2014). Este doble proceso complica tanto el escalado como la viabilidad económica y puede llegar a alterar las propiedades organolépticas del producto final.

Para la obtención de vinos desalcoholizados se están utilizando distintas técnicas de destilación a baja temperatura, pero, de nuevo, este proceso elimina muchos otros compuestos volátiles que requieren de algún otro proceso de recuperación y reintroducción en el vino. Debido a la distinta naturaleza química de los compuestos con impacto sensorial en el vino este proceso de reestructuración podría resultar excesivamente complejo. La técnica de destilación más utilizada para esta aplicación es el uso de columnas de conos giratorios (Margallo et al., 2015).

#### **4.2.1. Soluciones microbiológicas**

Una posible solución para la reducción del grado alcohólico del vino sería modificar el proceso fermentativo a través de las levaduras. En este caso, el objetivo sería lograr una conversión menos eficiente de los azúcares del mosto a etanol, reduciendo el rendimiento. Este abordaje se espera que resulte más respetuoso con las propiedades organolépticas del vino que los descritos anteriormente, y puede lograrse mediante una combinación de estrategias, como la selección de levaduras, la utilización de levaduras no-*Saccharomyces*, la mejora genética, o la aireación del mosto.

##### **4.2.1.1. Levaduras no-*Saccharomyces***

Entre la microbiota propia de la uva encontramos especies no pertenecientes al género *Saccharomyces* con menor capacidad fermentativa que, si hay oxígeno disponible, derivan parte del consumo de azúcares hacia la respiración (Crabtree-negativas), presentando un menor rendimiento en etanol (Contreras et al., 2014; Gobbi et al., 2014; Gonzalez et al., 2013; Gonzalez et al., 2021; Mestre et al., 2017; Quirós et al., 2014; Röcker et al., 2016). La principal dificultad para poder aplicar estas levaduras en la reducción del grado alcohólico radica en su baja adaptación a la fermentación industrial. Hay que considerar que

si no llegan a imponerse habitualmente en la fermentación es precisamente porque son menos competitivas que *S. cerevisiae* debido a una menor resistencia al sulfitado, el etanol, la presión osmótica, las altas temperaturas, etc. La dificultad para terminar la fermentación hace necesaria la presencia de *S. cerevisiae*, bien en inoculación secuencial, bien en co-inoculación (Jolly et al., 2014), lo que a su vez requiere un esfuerzo de puesta a punto. Además, su utilización a escala industrial requiere de su producción como levadura seca activa, algo que en algunos casos resulta complicado (Garre et al., 2010; Gamero-Sandemetrio et al., 2018).

#### **4.2.1.2. Mejora genética de *Saccharomyces cerevisiae***

Aunque sea posible la reducción del grado alcohólico mediante la utilización de levaduras alternativas, hay que considerar los alicientes de mantener a *S. cerevisiae* como agente principal de la vinificación, ya que posee todas las ventajas con las que no cuentan las levaduras no-*Saccharomyces*: tiene una gran resistencia a la toxicidad del etanol, gran tolerancia a sulfitado y tolerancia a un amplio rango de temperaturas y pH. Además, se simplificaría el proceso de inoculación, se minimizarían los problemas de imposición y tendría una producción comercial más sencilla, sin necesidad de adaptar procesos de producción de biomasa, secado y acondicionamiento.

Como ya se ha desarrollado anteriormente, *S. cerevisiae* presenta una gran especialización para la fermentación del mosto gracias a siglos de selección. Esto implica que, pese a que hay variedad fenotípica dentro de la especie, como se verá en el capítulo 1 existe una enorme homogeneidad en la producción de etanol, por lo que la bajada en el rendimiento alcohólico debe obtenerse mediante mejora genética y no tanto mediante la diversidad natural de las cepas.

Para reducir el rendimiento alcohólico debe desviarse el flujo de carbono hacia rutas metabólicas distintas y la elección de estas rutas es fundamental, pues puede alterar enormemente la composición química del vino. Un posible planteamiento sería la expresión heteróloga de genes de otras especies. Por ejemplo, existen trabajos con cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que expresan la enzima lactato deshidrogenasa procedente de *L. casei* (Dequin y Barre, 1994), de forma que el flujo metabólico del carbono procedente de los de azúcares se reparte entre la fermentación alcohólica y la fermentación láctica. Sin embargo, pese a que se consigue la reducción del grado alcohólico también aumenta la acidez. No hay que olvidar además de que la utilización de organismos modificados genéticamente (OMG) está estrictamente regulada en Europa, necesitando

evaluación de riesgos para la salud humana y medioambiental durante un largo periodo de tiempo y un pormenorizado sistema de trazabilidad. También requeriría un etiquetado como OMG, lo que podría afectar negativamente a la aceptación por parte de los consumidores (Schuller y Casal, 2005; Cebollero et al., 2007), como ocurre con otros alimentos.

Si se observa la ruta metabólica de la fermentación (Figura 1) existen pasos clave, cuya regulación podría generar una reducción del rendimiento alcohólico. Además, al tratarse de genes endógenos, la mejora genética podría llegar a obtenerse sin entrar en el ámbito de los OMGs, mediante evolución dirigida, o mutagénesis y posterior selección. En las últimas décadas existe un creciente interés por la aplicación de CRISPR en la mejora genética de levaduras enológicas, habiéndose conseguido por ejemplo una menor producción de ácido acético (van Wyk et al., 2020). Pese a que su consideración legal no está aun totalmente definida en Europa (Vilela, 2021) parece que podría llegar a tratarse de forma menos estricta que los OMG. Ya existen algunas cepas comercializadas para la producción de vinos con menor grado alcohólico, obtenidas por mejora genética mediante evolución experimental (Tilloy et al., 2014). De acuerdo con la legislación europea, esta técnica no genera OMGs. Sin embargo, someter a los organismos a la presión de selección (o conjunto de presiones) idóneas para el objetivo de mejora puede llegar a ser enormemente complejo. Además, la adaptación al medio de selección puede causar la aparición de efectos pleiotrópicos o efectos secundarios indeseables.

## 5. LA RESPIRACIÓN COMO SUMIDERO DE CARBONO

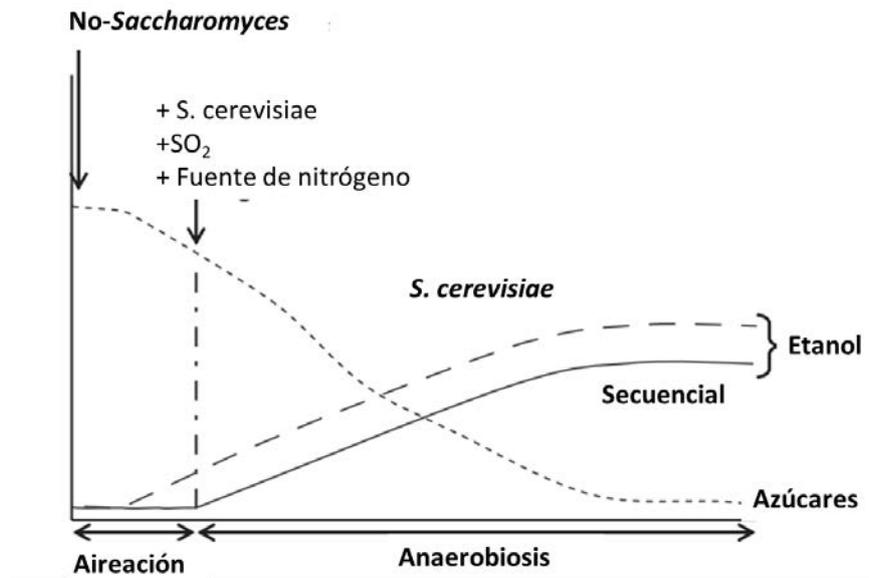
La literatura científica muestra numerosos ejemplos en los que la modificación metabólica tiene consecuencias distintas a las deseadas sobre la composición del vino. El CO<sub>2</sub> ha sido identificado como un sumidero inerte, cuya sobreproducción no tendría impacto sensorial. Por ese motivo la respiración parece una diana muy adecuada para la reducción del grado alcohólico.

Esta idea fue propuesta por Smith en 1995, y ha ido siendo retomada por varios autores (Gonzalez et al., 2013). Pese a tener indiscutibles ventajas, la utilización de esta estrategia no está exenta de complicaciones. En primer lugar, para llevar a cabo la respiro-fermentación del mosto es necesario airear de forma homogénea los tanques de fermentación, algo que puede ser costoso. Por otro lado, la entrada de aire puede promover la oxidación de compuestos, alterando la composición final de los vinos, por lo que sería necesario encontrar un

equilibrio entre cubrir las necesidades de la respiración y limitar los procesos de oxidación.

Además, como ya se ha discutido en el epígrafe 3.2.2, *S. cerevisiae* es una levadura Crabtree positiva. En presencia de la alta concentración de azúcares del mosto, e independientemente de la disponibilidad de oxígeno, la mayor parte de su metabolismo es fermentativo. Pese a ello, la proporción de azúcares consumidos a través de respiración consigue reducir el rendimiento alcohólico, (Quirós et al., 2014) siendo en algunos casos suficiente para paliar la subida causada por el cambio climático. Sin embargo, se ha observado que cuando *S. cerevisiae* se encuentra en condiciones aeróbicas aumenta su producción de ácido acético (Giovanelli et al., 1996; Papini et al., 2012; Quirós et al., 2014; Contreras et al., 2015) hasta niveles que no permiten de ninguna forma la comercialización de estos vinos. Es este aumento en la producción de ácido acético, y no tanto el efecto Crabtree, el que imposibilita la utilización de la respiro-fermentación de *S. cerevisiae* para reducir el grado alcohólico del vino. Siendo este problema el objeto de estudio de esta tesis doctoral.

Algunos de estos inconvenientes se pueden resolver mediante una fermentación mixta, donde parte del azúcar sea respirado inicialmente por levaduras Crabtree negativas fuera del género *Saccharomyces*, para, una vez alcanzada cierta reducción de azúcares, restringir la aireación e inocular con *S. cerevisiae* que completaría la fermentación en condiciones estándar de anaerobiosis, (Gonzalez et al., 2013), (Figura 3). Esta estrategia, al limitar el tiempo de aireación, se espera que sea menos problemática en cuanto a oxidación de otros componentes del mosto. Sin embargo, puesto que *S. cerevisiae* está presente desde el inicio de la fermentación sigue existiendo un alto riesgo de sobreproducción de ácido acético durante los primeros estadios de la fermentación. Los objetivos que se plantean en esta tesis pretenden aportar soluciones a este problema.



**Figura 3.** Esquema idealizado de la evolución esperada en una fermentación secuencial (línea continua) de levaduras Crabtree-negativas (*no-Saccharomyces*) y *S. cerevisiae*. La aireación se aplicaría tan solo en los momentos iniciales de la fermentación y antes de la inoculación de *S. cerevisiae* (indicada con una flecha). La producción esperada de etanol de una fermentación estándar con *S. cerevisiae* se indica con la línea discontinua. Para simplificar se asume un consumo de azúcares (línea punteada) similar tanto en condiciones estándar como en la co-inoculación. Modificado de González et al., (2023).



---

## **OBJETIVOS**

---



El objetivo principal de esta tesis doctoral es desarrollar estrategias que permitan reducir la producción de ácido acético que presenta *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones aeróbicas, con el fin de poder utilizar el metabolismo respiratorio de esta especie para reducir el grado alcohólico del vino.

Para conseguir avanzar hacia este objetivo general se han propuesto distintos objetivos específicos:

- La exploración de la diversidad natural de *S. cerevisiae* para identificar cepas de interés.
- El desarrollo de estrategias de aireación que limiten la sobreproducción de ácido acético de *S. cerevisiae*.
- La obtención, mediante evolución dirigida, de cepas de *S. cerevisiae* que no generen un exceso de ácido acético bajo condiciones de aerobiosis.
- Aportar información sobre la relación existente entre la producción de ácido acético y la flexibilización de la represión por catabolito de carbono.
- La optimización de estrategias de aireación y co-inoculación con cepas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* seleccionadas para la reducción del grado alcohólico.



---

## CAPÍTULO 1

# Exploración de la diversidad natural de *S. cerevisiae* para su utilización en fermentaciones aeróbicas

---

Correspondiente parcialmente al artículo publicado por Tronchoni, J., Gonzalez, R., Guindal, A.M., Calleja, E., Morales, P. (2022). Exploring the suitability of *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking under aerobic conditions. *Food Microbiol.* 101:103893.



## 1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha expuesto en la introducción general, el principal objetivo de esta tesis doctoral es la reducción del grado alcohólico del vino, cuyo aumento, debido entre otras causas al cambio climático, genera un gran número de consecuencias negativas para el sector enológico.

*Saccharomyces cerevisiae* es, sin lugar a duda, la especie de levadura mejor adaptada a la fermentación de mosto de uva. En fermentaciones espontáneas es la especie principal que lleva a cabo el proceso de fermentación, lo que indica, no solo su presencia en la uva, sino su capacidad de imposición sobre el resto de la microbiota durante la fermentación. En vinificaciones inoculadas también es el agente principal, puesto que, desde el inicio del uso de cultivos iniciadores, hacia la década de los 60 del s. XX, hasta hace muy pocos años, *S. cerevisiae* ha sido la única especie comercializada para tal fin. En la actualidad los cultivos iniciadores de otras especies son utilizados en su mayoría para aportar mayor complejidad organoléptica, no sustituyendo a *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica.

Se ha observado que incluso entre aislados procedentes de los más diversos orígenes (levaduras panaderas, muestras clínicas, alimentos y bebidas fermentadas, suelo, frutos...) el rendimiento de etanol durante la fermentación (producción de etanol/consumo de glucosa) es asombrosamente homogéneo entre todas las cepas de *S. cerevisiae* (Camarasa et al., 2011; Palacios et al., 2007). Teniendo en cuenta esta baja diversidad de rendimiento, la búsqueda mediante cribado de cepas con un menor rendimiento en etanol supone una gran inversión en tiempo, mayor aún si se considera que las cepas de baja producción alcohólica halladas podrían ser inadecuadas para la vinificación industrial, requiriendo un esfuerzo posterior para su adaptación a este ambiente. Por todo ello, las estrategias biotecnológicas para la reducción del rendimiento alcohólico de *S. cerevisiae* se centran en modificar el metabolismo del carbono de cepas ya utilizadas en la industria. El objetivo sería derivar parte del consumo de azúcares hacia la producción de otros metabolitos con ningún o bajo impacto enológico, principalmente a través de ingeniería metabólica y evolución dirigida (ALE por sus siglas en inglés) (ver capítulo 2), (Tilloy et al., 2015).

Un abordaje que permitiría la reducción del grado alcohólico sin tener que enfrentarse a la rigidez fenotípica de *S. cerevisiae*, sería la utilización de cepas de levaduras de otras especies y/o géneros. Varios autores han explorado la

variabilidad intra e interespecífica del rendimiento en etanol de distintas especies de levaduras enológicas (Rossouw y Bauer, 2016; Mestre et al., 2017; Zhu et al., 2020; García et al., 2020), encontrando una alta variabilidad en cuanto al rendimiento de etanol, frente a la homogeneidad que presenta *S. cerevisiae*.

Algunas de estas cepas, no perteneciente al género *Saccharomyces*, podrían lograr una bajada en el grado alcohólico. Sin embargo, hay que considerar varios aspectos: por un lado la diversidad en la producción de etanol viene ligada a rendimientos diferentes tanto de biomasa como de otros metabolitos durante la fermentación, lo que podría tener consecuencias sobre el vino; por otro lado, cualquier cultivo iniciador ha de imponerse a la microbiota ya presente en el mosto de uva, lo cual implica una alta competitividad durante la fermentación alcohólica, que por lo general no presentan las levaduras no-*Saccharomyces*. Como consecuencia de esto, para garantizar la fermentación óptima del mosto en un entorno industrial sería necesario seguir contando con la presencia de *S. cerevisiae*. Por tanto, estas nuevas especies deberían ser utilizadas en combinación, bien en inoculación simultánea, bien en inoculación secuencial, con *S. cerevisiae* (Ciani et al., 2016), (ver capítulo 3).

En nuestro grupo se propuso hace unos años la utilización del metabolismo respiratorio de las levaduras como forma de desviar el catabolismo del azúcar de la producción de etanol hacia la generación de un metabolito inocuo, el CO<sub>2</sub> (Gonzalez et al., 2013). Esta estrategia se ha utilizado con levaduras fuera del género *Saccharomyces*, con una alta capacidad respiratoria bajo condiciones aerobias (Crabtree negativas), con un éxito aceptable (Tronchoni et al., 2018).

Sin embargo, la posibilidad de utilizar exclusivamente *S. cerevisiae* en fermentaciones aeróbicas conlleva ciertas ventajas. Al ser una especie tan sumamente bien adaptada al entorno enológico no presenta problemas de imposición durante la fermentación, siendo un proceso más controlado y simple en comparación con el uso de no-*Saccharomyces*. El proceso industrial de aplicación de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas constaría de dos pasos: una fase inicial aeróbica, que permitiría el consumo de azúcares mediante respiración, aportando apenas etanol, y una fase final estándar (anaeróbica) que permitiría el consumo total de los azúcares y la producción de etanol hasta el grado alcohólico requerido (Gonzalez et al., 2013).

En un trabajo previo, el cribado de cepas y las pruebas de laboratorio mostraron que, pese al efecto Crabtree, el rendimiento en etanol de *S. cerevisiae* es

considerablemente más bajo en condiciones de aerobiosis que en fermentaciones anaeróbicas estándar (Morales et al., 2015; Quirós et al., 2014), lo que efectivamente abre la posibilidad de aplicar este enfoque como estrategia de reducción alcohólica. Sin embargo, se observó que bajo las necesarias condiciones de aerobiosis *S. cerevisiae* da lugar a una sobreproducción de ácido acético que imposibilita la utilización de esta estrategia para la vinificación. Esto provoca que el obstáculo a salvar ya no sea la reducción del rendimiento en etanol, sino la reducción del rendimiento en ácido acético bajo condiciones de aerobiosis.

En este capítulo se explora el rendimiento de ácido acético en condiciones aeróbicas de diversas cepas de *S. cerevisiae*, de origen tanto natural (de ambiente enológico), como comercializadas como cepas iniciadoras, en busca de aquellas con mejor potencial para el objetivo de reducción del contenido alcohólico mediante respiración, probando además diferentes formas de llevar a cabo la vinificación en dos fases de aireación, aeróbica-anaeróbica.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas y medios de cultivo

En este trabajo se caracterizaron veinticinco cepas de *S. cerevisiae*, 9 cepas iniciadoras comercializadas, junto con 16 aislados de distintos entornos enológicos (aislados naturales) mantenidos en la colección del grupo de investigación (colección PRICVV), (Tabla S1.1). Las cepas se mantuvieron a 4°C en placas de YPD (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura y 2% agar), y/o conservadas a -80°C (20% glicerol). Los inóculos se crecieron en YPD a 25°C durante 48 h, posteriormente se lavaron y resuspendieron con agua estéril.

Todo el mosto natural utilizado procedía de uva blanca, cosecha de 2019, conservado a -20°C. Este mosto contenía 220 g/L de azúcar y 186 mg/L de nitrógeno asimilable y un pH de 3.45. El volumen de mosto requerido para cada experimento fue descongelado y pasteurizado en autoclave. La pasteurización consistió en calentar hasta alcanzar una temperatura de 105°C durante menos de un minuto y dejar enfriar dentro del autoclave cerrado.

En cuanto a los ensayos realizados en mosto sintético, se utilizaron dos recetas diferentes:

Mosto MS300 (Bely et al., 1990). Contiene por litro: 100 g glucosa, 100 g fructosa, 5 g ácido málico-DL, 546 mg ácido cítrico monohidratado, 3 g ácido tartárico, 460 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 750 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 500 mg  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 250 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 160 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 200 mg  $\text{NaCl}$ , 4 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg  $\text{KI}$ , 0.4 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1.06 mg  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 15 mg ergosterol, 4.8 mg oleato de sodio, 0.5 mL *Tween* 80, 19.5 mg L-tirosina, 0.6 g L-prolina, 0.5 g L-glutamina, 0.445 g L-arginina, 0.175 g L-triptofano, 145.6 mg L-alanina, 0.12 g ácido L-glutámico, 78 mg L-serina, 75.4 mg L-treonina, 48 mg L-leucina, 44.2 mg ácido L-aspártico, 44.2 mg L-valina, 37.7 mg L-fenilalanina, 32.5 mg L-isoleucina, 45.7 mg L-histidina  $\text{H}_2\text{O HCl}$ , 31.2 mg L-metionina, 18.2 mg L-glicina, 21.1 mg L-lisina, 27 mg L-cisteína, 20 mg mio-inositol, 1.5 mg pantotenato de calcio, 0.25 mg tiamina hidroclicida, 2 mg, ácido nicotínico, 0.25 mg piridoxal 5'fosfato  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.003 mg biotina; pH 3.5.

Mosto "Cenit", modificado desde MS300 (Vázquez-Lima et al., 2014) que contiene por litro: 100 g glucosa, 100 g fructosa, 6 g ácido málico, 6.7 g ácido cítrico monohidratado, 1.7 g YNB sin aminoácidos (BD Difco, Thermo Fisher Scientific Inc.), 15 mg ergosterol, 5 mg ácido oleico, 0.5 mL *Tween* 80, 13 mg L-tirosina, 0.4 g L-prolina, 0.333 g L-glutamina, 0.296 g L-arginina, 0.116 g L-triptófano, 97 mg L-alanina, 80 mg ácido L-glutámico, 52 mg L-serina, 50 mg L-treonina, 32 mg L-leucina, 29 mg ácido L-aspártico, 29 mg L-valina, 25 mg L-fenilalanina, 22 mg L-isoleucina, 31 mg L-histidina  $\text{H}_2\text{O HCl}$ , 21 mg L-metionina, 12 mg L-glicina, 13.7 mg L-lisina, 18.2 mg L-cisteína, 306 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 18mg inositol.

## 2.2. Fermentación aeróbica en mosto natural y mostos sintéticos

Para las fermentaciones en matraz, realizadas por triplicado, se utilizaron matraces de 100 mL de volumen nominal que se llenaron con 20 mL de mosto natural pasteurizado. Estos matraces fueron cubiertos con papel de aluminio de manera que permitiese la entrada de aire y se incubaron a 25 °C con agitación (180 rpm). Las levaduras se inocularon a partir de los precultivos ya descritos a una densidad óptica final ( $\text{OD}_{600}$ ) de 0.2. Tras 4 días de incubación se tomaron muestras de los cultivos para su análisis por HPLC. Se realizó el muestreo a cuatro días, cuando aún quedan azúcares en el medio, para evitar el consumo de etanol que ocurre en condiciones aeróbicas ante la ausencia de azúcares, de forma que los cálculos de rendimiento fueran lo más precisos posibles.

Tanto para la caracterización de las cepas seleccionadas (PR543, PR1018 y PR117) como para los ensayos de comparación de medios en biorreactor se utilizaron cultivos tipo *batch* dentro de los biorreactores MiniBio de Applikon, con un volumen nominal de 250 mL. Se llenaron con 150 mL de mosto pasteurizado a los que se añadieron 200  $\mu$ L de antiespumante (*antifoam* 204, Sigma-Aldrich, España). La temperatura se fijó a 25 °C y la agitación a 1000 rpm. El aire se suministró a través de un difusor situado en el fondo del vaso. El control de flujo de aire o N<sub>2</sub> especificado en cada experimento se llevó a cabo mediante el controlador de flujo másico MFC17 (Aalborg Instruments and Controls, Inc., Orangeburg, NY), cuya calibración fue regularmente verificada mediante un flujómetro electrónico (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El oxígeno disuelto fue medido mediante sensores polarográficos (Applikon).

Los biorreactores se inocularon a una OD<sub>600</sub> final de 0.2. Cada réplica fue inoculada con un precultivo independiente, preparado como se ha descrito anteriormente. Durante el desarrollo de las fermentaciones se recogieron muestras de 1 mL en los tiempos indicados en las diferentes figuras para su análisis por HPLC. En el experimento de caracterización se recogieron adicionalmente 10 mL más de muestra a tiempo final para el análisis de compuestos volátiles. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante congelado para los análisis cromatográficos.

### 2.3. Optimización del régimen de aireación

En un primer experimento se realizó una fermentación a réplica única con las cepas PR117 y PR1018 bajo distintos caudales de aireación (expresados como volumen de gas/volumen de cultivo/hora; v/v/h), 2 v/v/h, 5 v/v/h y 10 v/v/h. La fermentación fue llevada a cabo en biorreactor MiniBio de Applikon y mosto natural pasteurizado. El flujo de aire fue ajustado mediante el controlador de flujo másico citado anteriormente. Tras 48 h la entrada de aire y la agitación fueron interrumpidas. Periódicamente se tomó 1 mL de muestra para su análisis mediante HPLC.

El ensayo de interrupción de la aireación a distintas horas tras la inoculación se realizó igualmente a réplica única, con ambas cepas PR117 y PR1018. En este caso y por razones logísticas se utilizó el otro sistema de biorreactores disponible, el sistema DASGIP (DASGIP AG, Jülich, Alemania), equipado con cuatro vasos SR0400SS, utilizando 200 mL de mosto natural blanco

pasteurizado, añadiendo al medio 200  $\mu\text{L}$  de antiespumante (*antifoam* 204, Sigma-Aldrich, España) y manteniendo los inóculos como ya se ha detallado. La agitación se garantizó mediante agitador magnético a 250 rpm y la temperatura fue mantenida a 25 °C mediante baño de agua y sistema de enfriado por 1:1 agua/etilenglicol. La aireación se controló a 10 v/v/h mediante el controlador de flujo másico MFC17 (Aalborg Instruments and Controls, Inc., Orangeburg, NY) inyectándose la corriente de aire a través de difusor en el fondo del vaso. Ambas cepas fueron sometidas a cortes en la aireación y agitación a distintas horas (120 h, 144 h, 150 h y 168 h) tomándose 1 mL de muestras periódicamente para su análisis mediante HPLC, como se detalla más abajo.

Para ensayar el cambio abrupto de ambiente aerobio-anaerobio se realizó una fermentación por duplicado en los fermentadores DASGIP, cortando la entrada de aire (régimen 10 v/v/h) a las 96 h de cultivo para PR1018 y a las 120 h para PR117, quedando en torno a 80 g/L de azúcares residuales. Inmediatamente tras el corte comenzó la entrada de  $\text{N}_2$  a 10 v/v/h, no alterando ningún otro parámetro del cultivo.

El último experimento de optimización se realizó por triplicado con la cepa PR1018, utilizando los biorreactores MiniBio de Applikon. El flujo de aire fue ajustado a los volúmenes requeridos mediante el controlador de flujo másico y, en los casos donde se indica, el nivel de oxígeno disuelto fue fijado al 50% o al 80% de saturación según se indique, manteniéndose mediante el control automático de la apertura de las válvulas de gas de cada biorreactor. La aireación fue interrumpida abruptamente tras 4 días, o fue gradualmente disminuida en el plazo de 24 h hasta un 0% de oxígeno disuelto (según se indique). La agitación (1000 rpm) se interrumpió una vez la aireación se cerró definitivamente. Para las condiciones de 10 v/v/h aire o  $\text{N}_2$  se mantuvo un flujo constante de aire o nitrógeno durante los 4 días, al igual que para la condición control.

## 2.4. Determinación de la concentración de metabolitos

La concentración de glucosa, fructosa, glicerol, etanol y ácido acético se determinó mediante cromatografía líquida (HPLC) con un equipo Surveyor Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), equipado con índice de refracción y un detector de fotodiodo (Surveyor RI Plus y Surveyor PDA Plus, respectivamente) en una columna de 300 x 7.7 mm PL Hi-Plex H<sup>+</sup> (8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y una precolumna Carbo-H 4 x 3mm

(Phenomenex, Torrance, CA). La columna se mantuvo a 50 °C y como fase se usó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 mM con un flujo de 0.6 mL/min. Antes de ser inyectadas, por duplicado, las muestras se filtraron a través de un filtro de nailon de 0.22 µm (Micron Analítica).

## 2.5. Análisis de compuestos volátiles

Las muestras para cromatografía gases-masas (GC-MS) contenían 1800 µl de la muestra de cultivo en un volumen final de 2000 µl, enrasando con una mezcla de etanol y agua para igualar la cantidad de etanol en las muestras (12% etanol), 1 g NaCl y 20 µl de patrón interno, en matraces de 20 mL. El patrón interno contiene 1000 ppm de 4-metil 2-pentanol y ácido heptanoico; y 100 ppm cada uno de nonanoato de etilo y 1-nonanol en agua, preparado desde soluciones individuales de 10000 ppm en etanol.

Las muestras fueron preincubadas durante 10 minutos a 45°C, seguido de una incubación de 30 min a 45°C con fibra de 50/30 µm DBV/CAR/PDMS/SPME (Stableflex, SUPELCO, Bellefonte, PA). La fibra sufrió un proceso de desorción durante 5 min a 250°C.

El análisis gases-masas fue llevado a cabo en el equipo Thermo TRACE GC Ultra, acoplado a un detector de masas Thermo ISQ, equipado con un Thermo TriPlus autosampler.

La cromatografía de gases se llevó a cabo en una columna capilar Thermo Scientific fused-silica TG-WAXMS A (30 m de largo; 0.25 mm DO; 0.25 µm de grosor). Las condiciones para la cromatografía fueron como siguen: 5 min a 40 °C subiendo 3 °C/min hasta alcanzar 200 °C, tras lo cual se aumentó 15 °C/min hasta alcanzar los 240 °C, donde se mantuvo durante 10 minutos. Como gas de transporte se utilizó helio a un flujo de 1 mL/min trabajando en modo *Split* (ratio 30). El tiempo total de análisis fue de 71 minutos. La detección fue llevada a cabo con el espectrómetro de masas en modo *Full Scan* (tiempo de permanencia 500 ms) con energía de ionización 70 eV y temperaturas de fuente y cuadrupolo de 250°C. La detección se paró durante la ventana de elución del etanol. La identificación de picos se hizo mediante comparación de espectro iónico con la librería de espectro de masas NIST. Para cada compuesto, incluidos los patrones internos, se cuantificaron las áreas de los iones característicos elegidos. La cantidad de cada compuesto se expresa como la suma de sus iones característicos referida a la de su patrón interno.

## 2.6. Análisis estadísticos

Los niveles y rendimientos de los metabolitos de interés durante la fermentación, así como la producción de compuestos volátiles se compararon mediante análisis de la varianza. La comparación de medias fue llevada a cabo mediante un test de Tukey.

Todos los análisis estadísticos, incluyendo la PCA fueron realizados usando el programa estadístico SPSS Statistics v.25 (IBM, Armonk, NY, Estados Unidos).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Exploración de la fermentación aeróbica de *Saccharomyces cerevisiae*

Con el objetivo de explorar el comportamiento de *S. cerevisiae* bajo condiciones aeróbicas se estudiaron 25 cepas distintas, procedentes tanto de aislados enológicos naturales (16 cepas) como comercializadas como cultivos iniciadores (9 cepas), (Tabla S1.1).

Para llevar a cabo este estudio, se realizó una fermentación en mosto natural por triplicado con cada una de las cepas (Figura 3). La fermentación se llevó a cabo en matraces con agitación, garantizando las condiciones de aerobiosis. Tras 4 días de cultivo se tomaron muestras de las fermentaciones para su análisis por HPLC. Por limitación de espacio de incubación este ensayo tuvo que dividirse en dos lotes, por lo que la cepa utilizada como referencia, PR50, (correspondiente a EC1118 de Lallemand Inc., Canadá) se trató como dos cultivos independientes en cada uno de los lotes (PR50R1 y PR50R2). Los análisis estadísticos no muestran diferencia alguna entre ambas repeticiones para ninguno de los parámetros estudiados (Figura 3), por lo que se pueden descartar diferencias entre las dos tandas de cultivos.

Tras 4 días de fermentación aeróbica el consumo de azúcares se situó entre el 52% y el 75% de la concentración original. Las tres cepas con menor consumo de azúcares (PR699, PR705 y PR1272) correspondieron a cepas naturales, mientras que las cuatro cepas de mayor consumo (PR543, PR1269, PR1270 y PR1272) fueron cepas comerciales (Figura 3).

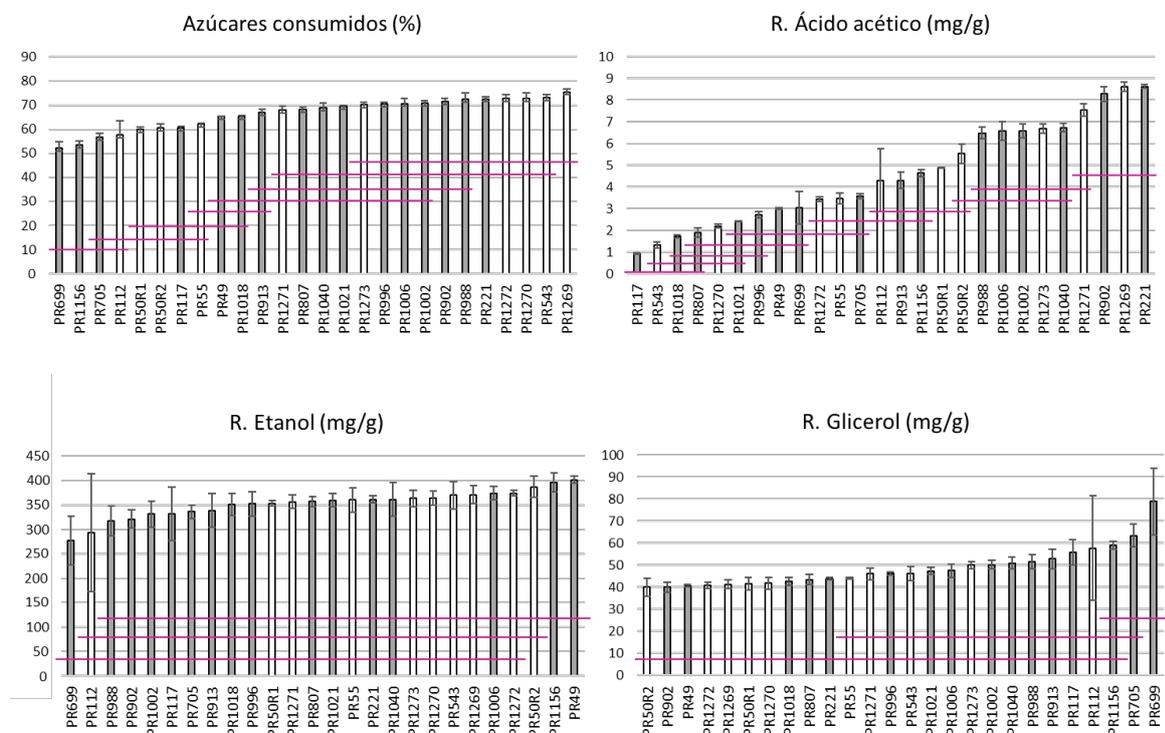
En cuanto al rendimiento en etanol (gramos de etanol producidos por cada gramo de azúcar consumido), los valores oscilan entre ~280 mg/g y ~400 mg/g, encontrándose diferencias estadísticamente significativas tan solo entre la cepa de menor producción (PR699) y las dos cepas de producciones máximas (Figura 3). Esta producción tan homogénea era de esperar debido a la alta especialización que presenta *S. cerevisiae* para la fermentación alcohólica, como ya se ha comentado anteriormente. Este resultado permite extender dicha observación también al metabolismo aeróbico de *S. cerevisiae*.

En cualquier caso, incluso el rendimiento de etanol más alto obtenido, de 400 mg/g, queda por debajo de los 450 mg/g que constituyen el valor teórico del rendimiento en etanol de una fermentación anaeróbica (Camarasa et al., 2011). En este ensayo no puede descartarse que la reducción observada en el rendimiento de etanol sea debida a evaporación. Sin embargo, en trabajos anteriores del grupo, realizados con fermentador, donde se equiparaba la evaporación entre condiciones mediante la entrada de flujo de nitrógeno en condiciones de anaerobiosis (Morales et al., 2015), también se aprecia una menor producción de etanol en condiciones de aerobiosis. Por lo tanto, puede considerarse que al menos una buena parte de la bajada del rendimiento en etanol en aerobiosis se debe a una menor producción

En cuanto a la producción de glicerol, el rendimiento se sitúa entre 31 mg/g y 79 mg/g (Figura 3). Curiosamente, el aislado natural PR699 es el de mayor producción, lo que parece indicar que los diferentes rendimientos en glicerol podrían explicar parcialmente las diferencias en el rendimiento en etanol entre las cepas de menor (PR699) y mayor (PR49) producción. Entre estas cepas de producción máxima y mínima, se observó una relación de 2.5x, relación similar a la encontrada en condiciones anaerobias entre cepas de *S. cerevisiae* de diferentes orígenes (Camarasa et al., 2011). Hay que considerar que la producción de glicerol es un criterio de selección común a la hora de comercializar cultivos iniciadores, por lo que esta variabilidad en el rendimiento debe ser tenida en cuenta incluso en el contexto de una fermentación aerobia.

El parámetro de mayor interés en este cribado, la producción de ácido acético, es también el que mayor variabilidad presenta, con valores que oscilan entre 0.93 mg/g (PR117) y 8.64 mg/g (PR221), (Figura 3). Un pequeño grupo de las cepas cribadas mostraron un rendimiento muy bajo para lo esperado en condiciones de aerobiosis, produciendo ácido acético a niveles similares o incluso menores a los que presentan algunas cepas comerciales de *S. cerevisiae* bajo

condiciones anaeróbicas, cuya producción, de acuerdo con Camarasa et al., (2011), se situaría en  $0.6 \pm 0.1$  g/L de ácido acético (aproximadamente 2.5 mg/g). Sin embargo,



**Figura 3.** Parámetros principales de la fermentación de *S. cerevisiae* tras 4 días de cultivo en condiciones de aerobiosis (matraz) sobre mosto natural esterilizado (220 g/L azúcares). El rendimiento (R.) es calculado en función de la cantidad de sustancia producida por gramo de azúcar consumido. En gris aislados naturales, en blanco cepas comerciales. Las líneas moradas indican el grupo estadístico (p.-valor < 0.005).

hay que tener en cuenta que la mayoría de las cepas mostraron rendimientos inaceptables en términos de acidez volátil, superando a los 4 días de fermentación los 0.8 g/L de ácido acético, quedando por tanto descartado su uso en fermentaciones aeróbicas. En cuanto a la cepa utilizada como control para el ensayo, PR50, que ya había mostrado una elevada producción de acético en trabajos anteriores (Morales et al., 2015; Quirós et al., 2014), en este experimento muestra un valor intermedio entre los rendimientos presentados por las cepas analizadas.

No parecen existir rasgos claramente diferenciados entre cepas comercializadas, especializadas en un ambiente industrial, y los aislados procedentes de entorno enológico (Tabla S1.1). Sin embargo, dentro de las cepas de menor rendimiento en ácido acético encontramos una cepa comercial junto a

tres cepas naturales, y en relación con el consumo de azúcares, el grupo de mayor consumo se corresponde con cepas comerciales, mientras que las de menor consumo son aislados naturales.

### **3.2.Principales parámetros de fermentación bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas**

Las cepas con menor rendimiento en ácido acético se seleccionaron para una caracterización más profunda, una cepa comercial (PR543) y dos aislados naturales (PR117 y PR1018). PR50 se mantuvo como cepa de referencia.

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en biorreactores con un flujo constante e idéntico de gas (aire o N<sub>2</sub>), lo que permite igualar las pérdidas por evaporación y obtener una comparación fiable del rendimiento en etanol en ambas condiciones.

En los cultivos aeróbicos, el oxígeno disuelto (OD) cayó tras la inoculación de todas las cepas. Tras alcanzar un valor mínimo (entre 15 y 30 horas tras la inoculación), los valores de OD fueron aumentando progresivamente. Sin embargo, cada cepa exhibió un patrón de consumo distintivo y consistente entre réplicas. La cepa PR1018 mostró el consumo de oxígeno más rápido en las fases iniciales de la fermentación, con un marcado patrón en forma de "V" durante el primer día de cultivo tras el cual su comportamiento fue más similar al presentado por el resto de las cepas (datos no mostrados).

El consumo de oxígeno, sostenido en el tiempo, confirma que las cuatro cepas presentaron metabolismo respiratorio bajo condiciones aeróbicas. La existencia de metabolismo respiratorio es también corroborada por un menor rendimiento alcohólico para las cuatro cepas, en comparación con los rendimientos presentados en condiciones anaeróbicas (Figura 5).

Bajo condiciones aeróbicas el etanol puede ser respirado por *S. cerevisiae* tras el consumo total de los azúcares del mosto, como ya se ha comentado anteriormente. Para evitar que esto pudiera alterar la comparación de los rendimientos se tomaron los datos del día 5 (cuando aún existe una considerable concentración de azúcares) para efectuar los cálculos (Tabla 2). En este punto el rendimiento en etanol bajo condiciones anaerobias se encontró entre los 380 mg/g y los 400 mg/g (Tabla 2), siendo, curiosamente, las dos cepas naturales las de mayor producción. Si bien este valor es menor al rendimiento teórico (450 mg/g),

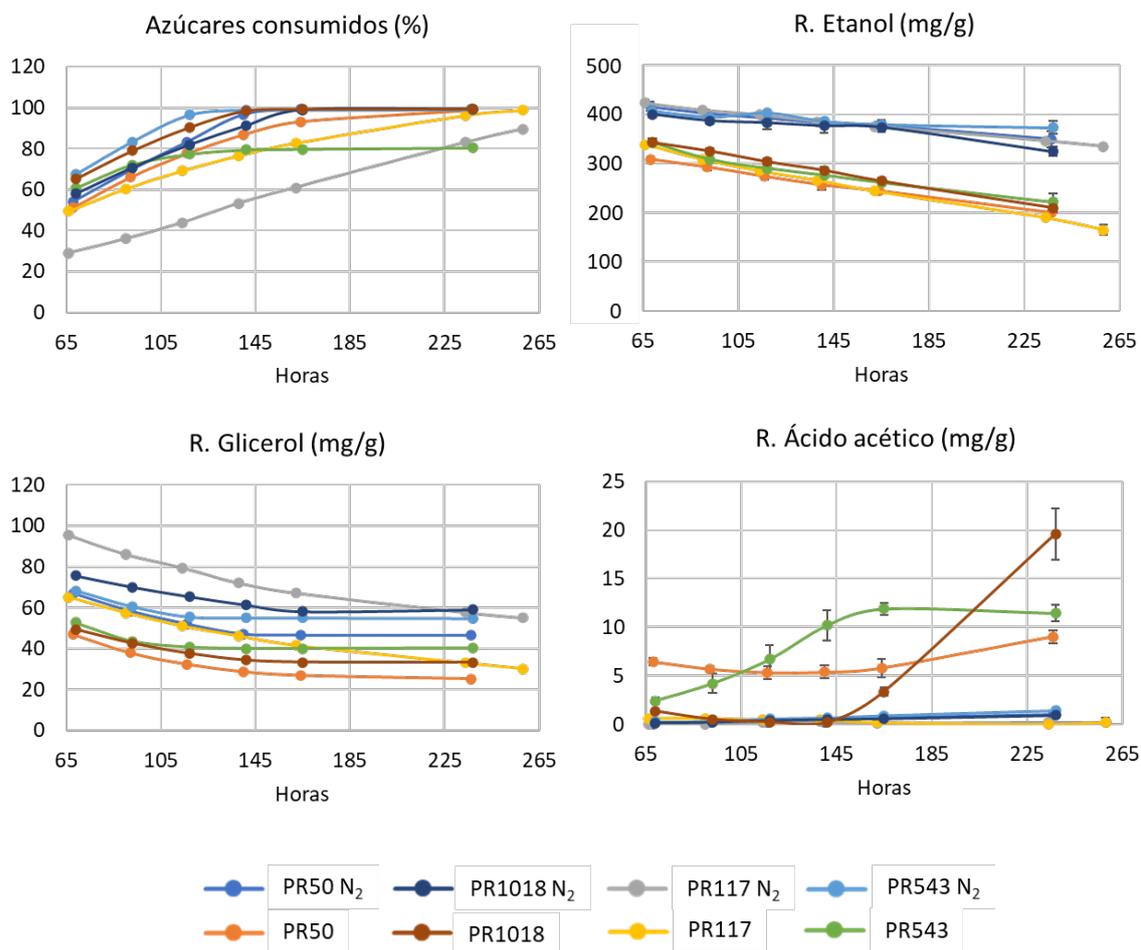
esto es debido, con toda probabilidad, a la evaporación causada por el flujo constante de N<sub>2</sub>. En el mismo punto de muestreo y presumiblemente con las mismas pérdidas por evaporación, el rendimiento de etanol en aerobiosis se encontró entre 270-300 mg/g (Tabla 2), un valor significativamente menor, en torno a una cuarta parte, que el presentado en anaerobiosis, lo que indicaría que una proporción sustancial del azúcar del mosto ha sido metabolizado, no hacia la formación de etanol sino hacia otro sumidero de carbono, presumiblemente mediante el metabolismo respiratorio.

El comportamiento del consumo de azúcares con relación al régimen de aireación fue opuesto entre los dos aislados naturales (PR117 y PR1018), que mostraron un consumo más rápido bajo condiciones aeróbicas, y las dos cepas comerciales (PR53 y el control, PR50) que mostraron un consumo más rápido en anaerobiosis (Figura 5). La cepa PR117 exhibió un consumo más lento que el resto, tras 11 días de fermentación el mosto en aerobiosis aún presentaba ~2.67 g/L de azúcares residuales, mientras que en anaerobiosis aún quedaban 22.48 g/L de azúcares sin consumir. Las cepas PR1018 y PR50 consumieron la totalidad de los azúcares al cabo de 7 días en anaerobiosis, mientras que en aerobiosis PR1018 tardó solo 6 días y PR50 algo más de tiempo que en la condición anterior. PR543 consumió los azúcares disponibles tras 6 días en anaerobiosis, mientras que en aerobiosis la fermentación se estancó al cabo de 5 días, dejando más de 43 g/L de azúcares sin consumir (Figura 5).

Para todas las cepas el rendimiento en glicerol presentado en anaerobiosis fue mayor que en aerobiosis (Tabla 2). En los cuatro casos el rendimiento se reduce con el tiempo hasta que se consumen todos los azúcares (Figura 5). Esto se debe probablemente a que el glicerol es mayoritariamente producido durante las primeras etapas de la fermentación tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Hay grandes diferencias entre los rendimientos en glicerol de las cuatro cepas, siendo el aislado natural PR117 el de mayor rendimiento en ambas condiciones.

El rendimiento en ácido acético se mantuvo bajo para las cuatro cepas durante toda la fermentación en condiciones anaeróbicas (Figura 5). Hacia el día 5 dos de las cepas produjeron claramente una mayor cantidad de ácido acético bajo condiciones aeróbicas que bajo condiciones anaeróbicas (Tabla 2). La cepa PR1018 presentó un rendimiento en ácido acético marcadamente bajo durante los primeros días en fermentación aerobia, para aumentar drásticamente una vez la totalidad de los azúcares fueron consumidos hacia el día 6 (Figura 5), lo que

podría deberse a la existencia de una reprogramación metabólica. La cepa PR117 mostró un rendimiento de ácido acético muy bajo en condiciones de aerobiosis a lo largo de todo el ensayo. Sin embargo, los azúcares no llegaron a consumirse por completo (Figura 5). En cuanto a la cepa control, PR50, mostró un alto



**Figura 5.** Principales parámetros de fermentación de las cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* sobre mosto natural esterilizado (220g/L de azúcar) en biorreactor, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Los resultados mostrados son el promedio de las tres réplicas biológicas.

rendimiento en ácido acético bajo condiciones aeróbicas, tal y como ya se ha determinado en otros trabajos (Morales et al., 2015; Quirós et al., 2014), aumentando de manera moderada tras el consumo total de azúcares. La cepa PR543 había sido seleccionada para este ensayo por el bajo rendimiento en ácido acético presentado durante el cribado en matraz. Sin embargo, en este ensayo en biorreactor la cepa mostró un alto rendimiento en aerobiosis, probablemente debido a la diferencia en la disponibilidad de oxígeno entre ambos sistemas de cultivo.

**Tabla 2.** Azúcares consumidos y rendimientos de los principales metabolitos de la fermentación. Datos obtenidos a día 5 tras la inoculación en mosto natural pasteurizado tanto en condiciones anaeróbicas (10v/v/h N<sub>2</sub>) como aeróbicas (10v/v/h aire) en biorreactor. Las letras mayúsculas de cada fila indican diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) entre las cepas.

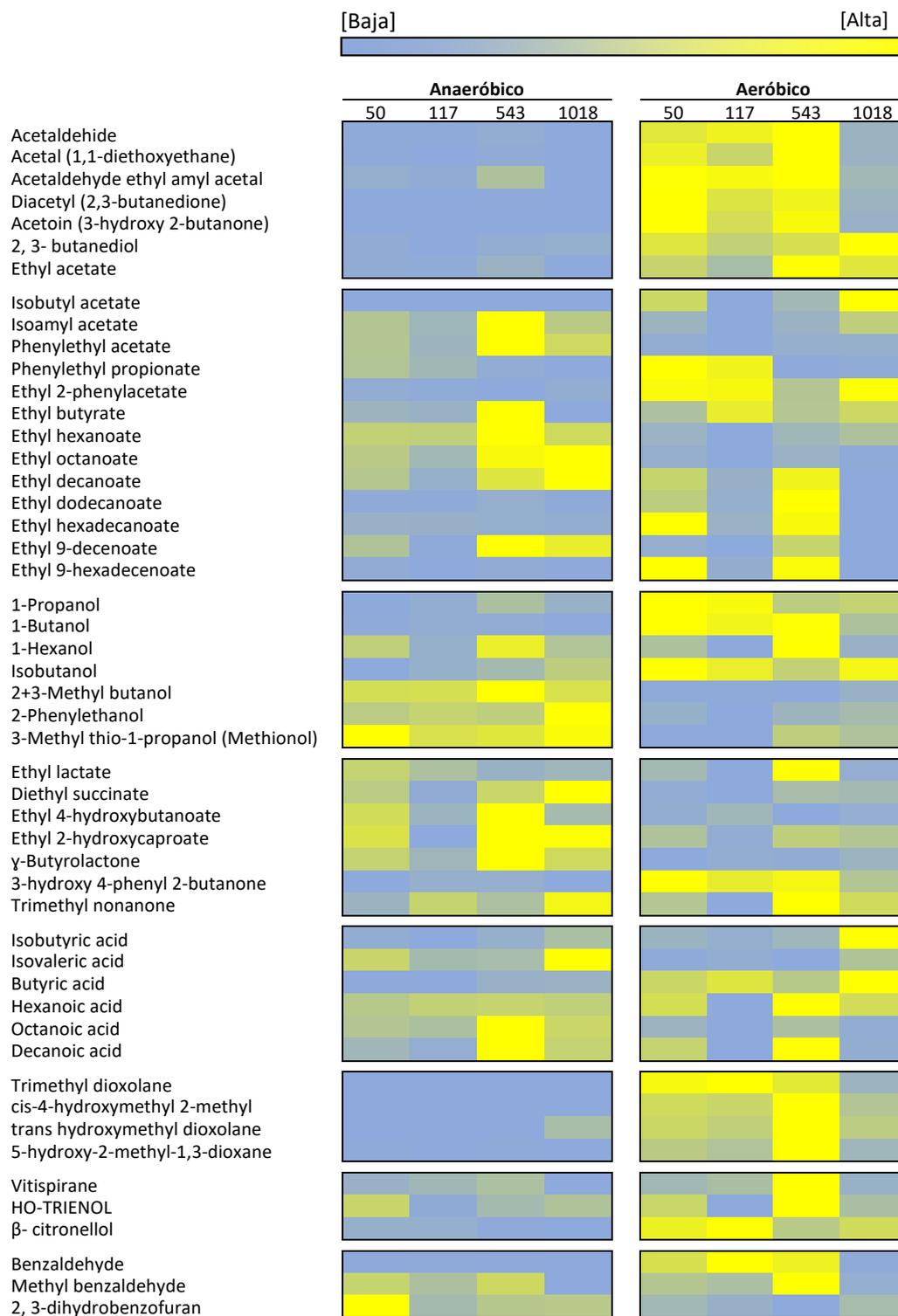
		<b>PR50</b>	<b>PR117</b>	<b>PR543</b>	<b>PR1018</b>
<b>Azúcares consumidos (%)</b>	N <sub>2</sub>	83.34 ±0.95 B	43.84 ±2.63 A	96.49 ±1.64 C	81.93 ±0.72B
	Aire	77.70 ±1.23 B	69.20 ±1.03 A	77.37 ±1.44 B	90.40 ±0.63 C
<b>R. Glicerol (mg/g)</b>	N <sub>2</sub>	52.09 ±2.01 A	79.54 ±4.08 C	55.62 ±2.59 A	65.47 ±2.63 B
	Aire	32.39 ±1.08 A	50.96 ±0.50 D	40.75 ±1.98 C	37.64 ±0.39 B
<b>R. Ácido acético (mg/g)</b>	N <sub>2</sub>	0.22 ±0.02 A	0.24 ±0.01 A	0.58 ±0.05 B	0.41 ±0.17 AB
	Aire	5.34 ±0.65 B	0.47 ±0.02 A	6.70 ±1.47 B	0.23 ±0.01 A
<b>R. Etanol (mg/g)</b>	N <sub>2</sub>	390 ±0.00 AB	400 ±0.00 AB	400 ±0.00B	380 ±0.01 A
	Aire	270 ±0.01 A	280 ±0.00 AB	290 ±0.00B	300 ±0.01 C

### 3.3. Producción de volátiles en condiciones aeróbicas y anaeróbicas

Con el objetivo de evaluar el impacto que podría tener la aireación sobre el perfil aromático se analizaron las concentraciones de diversos compuestos volátiles de las cuatro cepas tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Éstos resultaron considerablemente distintos entre ambas condiciones y para las cuatro cepas (Figura 6).

La producción de acetaldehído y derivados del acetato fue mayor bajo condiciones aeróbicas (Figura 6). Lo mismo se observó para los dioxolanos y dioxanos. Es reseñable que bajo condiciones aeróbicas los niveles de estos compuestos fueron significativamente menores para la cepa PR1018 que para las otras tres.

Las producciones de diacetilo, acetona y 2,3-butanodiol fueron también mayores en condiciones aeróbicas. De nuevo, los niveles de acetona y diacetilo en aerobiosis fueron menores para PR1018. Por el contrario, esta cepa, PR1018, mostró los mayores (aunque no estadísticamente significativos) niveles de



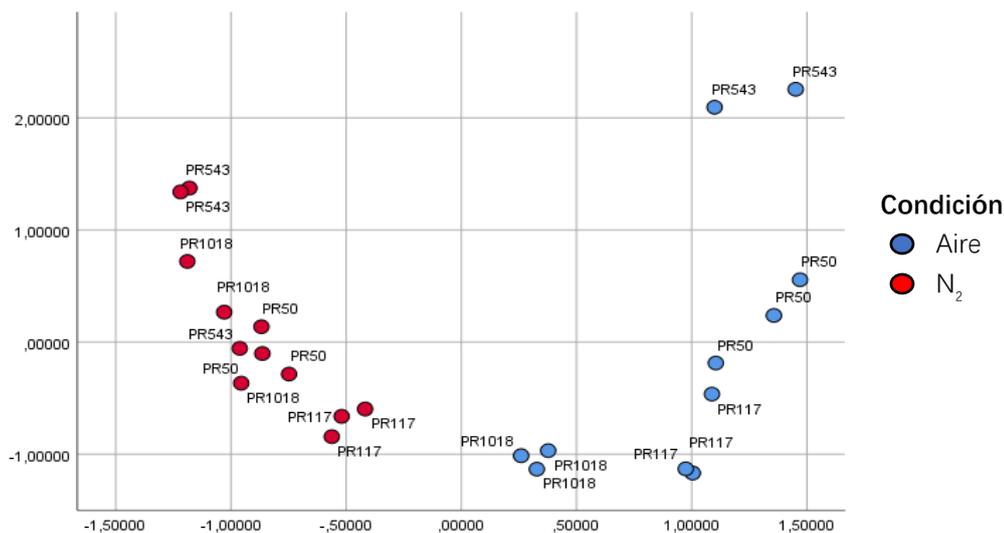
**Figura 6.** Heatmap del rendimiento de compuestos volátiles producidos por los cultivos en biorreactor. La graduación de color se establece para cada compuesto entre los valores mínimos y máximos.

2,3-butanodiol de entre las cuatro cepas para condiciones aeróbicas. Este poliol es, sin embargo, considerado inodoro, y por tanto presenta un impacto organoléptico neutro (Tilloy et al., 2015).

Los niveles de acetato de etilo también se incrementaron en condiciones de aireación. Los mayores valores para este compuesto fueron presentados por la cepa PR543 (Figura 6). Además, en estos experimentos de fermentación se cuantificaron otros tres ésteres de acetato. El acetato de isobutilo fue detectado únicamente bajo aerobiosis y para las cepas PR50, PR543 y PR1018 (Figura 6). El acetato de isoamilo y el acetato de feniletilo fueron más abundantes bajo condiciones anaeróbicas en las cuatro cepas. Los mayores niveles de acetato de isobutilo, acetato de isoamilo y acetato de feniletilo en aerobiosis se encontraron en PR1018, mientras que los valores más bajos fueron presentados por PR117. PR543 fue la cepa que produjo mayor concentración de ésteres de etilo, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. El isobutanol y otros alcoholes lineales mostraron mayor presencia en aerobiosis, mientras que los alcoholes isoamílicos, el feniletanol y el metionol fueron mayoritariamente producidos en anaerobiosis (Figura 6). La cepa PR1018 mostró la mayor concentración de 2-feniletanol bajo ambas condiciones. Los niveles de ácido octanoico y ácido isovalérico fueron menores en condiciones de aerobiosis, mientras que la concentración de ácido isobutírico fue mayor. El valor más alto de etil-lactato se encontró en la cepa PR543 en condiciones aeróbicas (Figura 6).

En resumen, el impacto de la oxigenación en la producción de compuestos depende en gran medida tanto de la cepa ensayada como del compuesto específico. Con los datos presentados en la Figura 6 se realizó un análisis de componentes principales (PCA), obteniéndose un total de 7 componentes. PC1 explica el 50% de la varianza y PC2 un 18% (Figura 7.). La representación de las muestras en el plano definido por las variables PC1 y PC2 divide claramente condiciones anaerobias y aerobias. De acuerdo con esta representación, PR117 y PR1018 muestran la distancia más cercana entre ambas condiciones. Es más, los cultivos aeróbicos de PR1018 son los más cercanos al grupo de cultivos anaeróbicos en PC1 que en cualquier otra cepa, mayoritariamente debido a los bajos niveles de acetaldehído y compuestos relacionados, incluyendo las moléculas de dioxano/dioxolano. Otras moléculas que definen la fermentación aeróbica, como el propanol o el butanol (aunque no el isobutanol) son también menores para los cultivos aeróbicos de PR1018. PC2 aparentemente captura

compuestos específicos de cepa, ya que las muestras presentan valores relativamente semejantes en ambos ambientes.



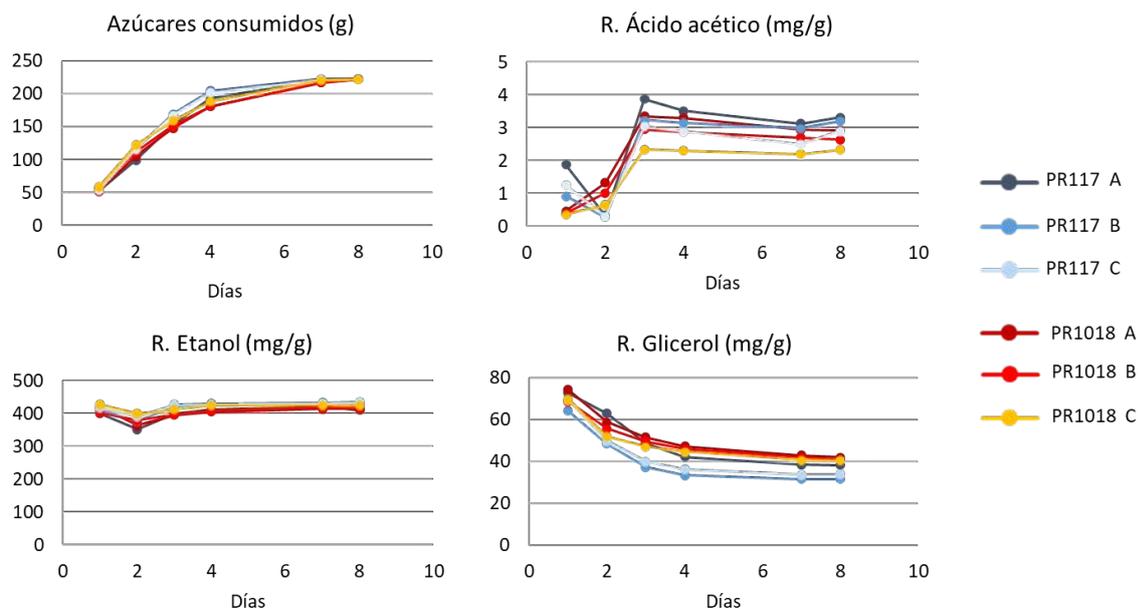
**Figura 7.** Análisis de componentes principales basado en los compuestos volátiles presentados en la Figura 6 para las cepas de *S. cerevisiae* bajo dos condiciones de aireación.

### 3.4. Optimización del proceso de fermentación aeróbica

Tras el ensayo en biorreactor, las cepas PR117 y PR1018 se consideraron buenas candidatas para el objetivo de reducción del grado alcohólico mediante respiración. Sin embargo, cada una presentaba una importante desventaja. Si bien PR117 no produce apenas acético durante la fermentación, no consiguió consumir la totalidad de los azúcares al término del experimento, mientras que PR1018 pasa de una producción sumamente baja a un incremento dramático del ácido acético tras el consumo total de los azúcares del mosto. Por ese motivo se planteó optimizar las condiciones de fermentación con el objetivo de lograr una fermentación completa, sin azúcares residuales, con menor producción de etanol y sin exceso de ácido acético.

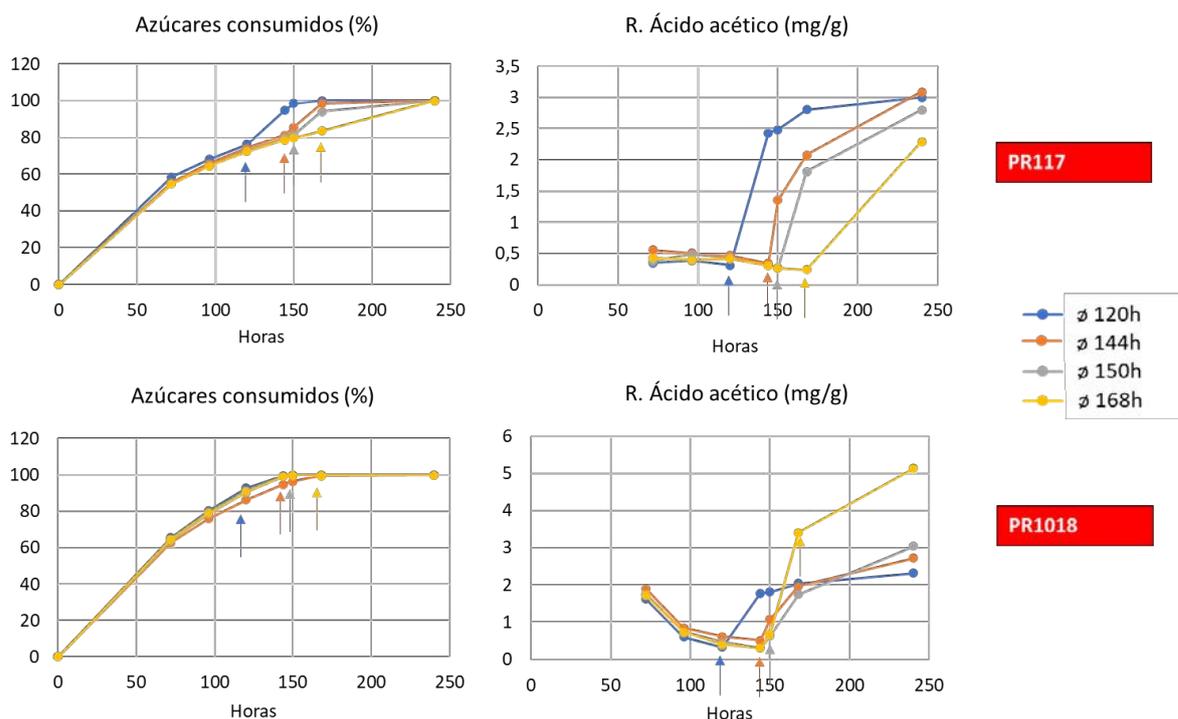
En un primer experimento se trató de determinar si existía una reducción en la producción de ácido acético cuando se reducía el nivel de aireación. Para ello se realizó una primera aproximación con una fermentación a réplica única donde ambas cepas se ensayaron bajo tres caudales de aire distintos, 2 v/v/h, 5 v/v/h y 10 v/v/h y tan solo durante 48 h, para después interrumpir tanto aireación como agitación. En estas condiciones el consumo total de azúcares tuvo lugar a los 7 días para PR117 y a los 8 días en el caso de PR1018 (Figura 8). Teniendo en cuenta las limitaciones de ser un ensayo con una única réplica,

parece que no existen diferencias para el consumo de azúcares y la producción de etanol entre ninguno de los regímenes de aireación ensayados. En cuanto al ácido acético, si bien ambas cepas presentaron valores intermedios entre condiciones aeróbicas y anaeróbicas, parece existir cierta relación entre el aumento de caudal de aire y de producción de ácido acético. No obstante, el resultado más sorprendente fue un dramático ascenso en la producción de ácido acético cuando se interrumpió la aireación (a día 2), en las tres condiciones (Figura 8).



**Figura 8.** Principales parámetros de fermentación de PR117 y PR1018 a replica única bajo tres regímenes de aireación: (A) 10 v/v/h, (B) 5 v/v/h, (C) 2 v/v/h.

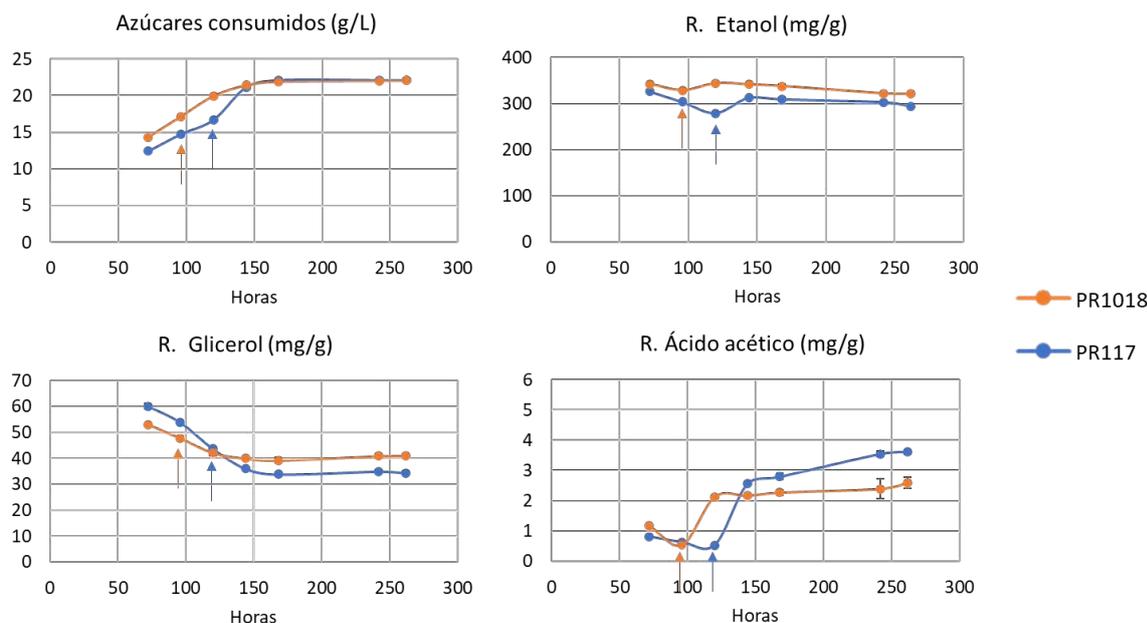
Al observar la asociación entre este incremento en la producción de ácido acético y el cese de la aireación, se decidió llevar a cabo un ensayo realizando el corte de aireación a distintas horas de fermentación, 120h, 144h, 150h y 168h. En el caso de PR117 se aprecia una clara influencia del cambio de condiciones tanto en la producción de ácido acético como en el consumo de azúcar, mientras que para PR1018 solo se ve afectado el rendimiento en ácido acético (Figura 9). En cualquier caso, se aprecia claramente en ambas cepas como la interrupción de la aireación provoca un aumento abrupto en la producción de ácido acético, independientemente de la cantidad de azúcares restantes en el medio, lo que parece indicar que el aumento de ácido acético se debe a una alteración metabólica relacionada con el cambio de condiciones en la disponibilidad de oxígeno.



**Figura 9.** Principales parámetros de fermentación de PR117 y PR1018 a replica única bajo tres cortes de aireación y agitación, marcados por la leyenda y las flechas.

Bajo esta premisa se realizó una fermentación por duplicado con ambas cepas, con la intención de realizar el cambio de ambiente de la forma más abrupta posible, realizando un corte en la aireación seguido de una entrada de corriente de nitrógeno. La aireación a 10 v/v/h fue interrumpida a las 120 h y 96 h de cultivo para PR117 y PR1018 respectivamente, cuando quedaban alrededor de 80 g/L de azúcares residuales para cada cepa. Tras interrumpir la aireación se pasó inmediatamente a inyectar el mismo caudal de  $N_2$ , de forma que el oxígeno disponible fuera desplazado con la mayor rapidez, mientras que otros parámetros (como evaporación y agitación) no se veían alterados. El resultado (Figura 10) fue idéntico a los ensayos de corte anteriores, con un ligero aumento del consumo de azúcares a continuación del fin de la aerobiosis y un aumento abrupto del rendimiento de ácido acético.

Tras los resultados anteriores se formuló la hipótesis de que, si el aumento en ácido acético era debido al cambio en la disponibilidad de oxígeno, quizá un cambio menos extremo generaría un menor impacto metabólico. Para probar esta nueva estrategia se decidió trabajar tan solo con la cepa PR1018, considerando que sería más fiable que PR117 en una futura aplicación industrial, ya que ésta

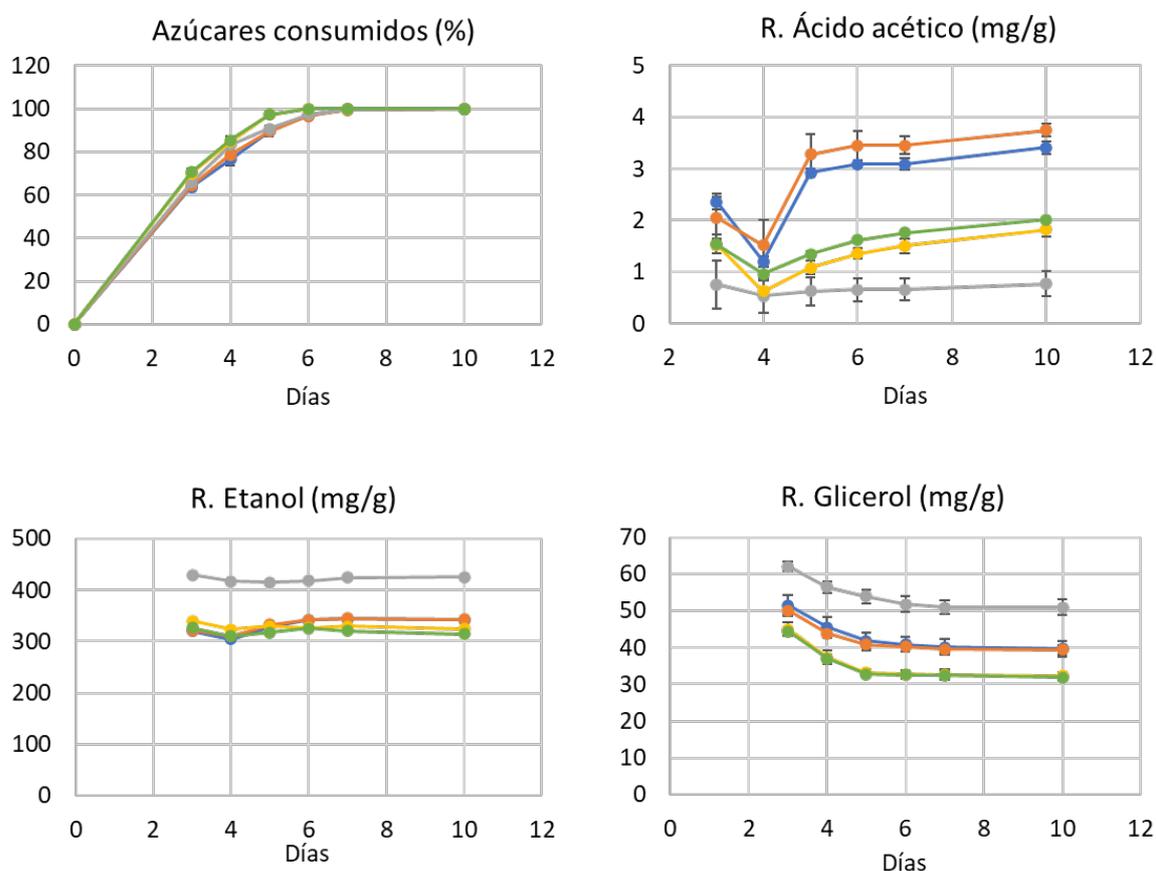


**Figura 10.** Principales parámetros de fermentación tras el corte abrupto de las condiciones de aireación (inyección inmediata de nitrógeno) a las 120h y 96h respectivamente. Las flechas indican el momento del corte.

última había presentado una cinética de fermentación muy lenta en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

En este nuevo experimento, realizado por triplicado, se probó a mantener los biorreactores con un 50% de oxígeno disuelto (DO), de forma que la aireación quedara sujeta a este parámetro, cerrando o abriendo de manera automatizada la entrada de aire (10 v/v/h) en función de ese nivel umbral (Figura 11, naranja). Paralelamente y como control se realizaron por triplicado fermentaciones en aerobiosis (10 v/v/h aire) y anaerobiosis (10 v/v/h N<sub>2</sub>). Tras 4 días de fermentación se cerró la entrada de gases de las tres condiciones y se detuvo la agitación. En las tres condiciones los azúcares fueron consumidos en su totalidad al cabo de 7 días (Figura 11). En lo relativo a la producción de etanol no se observaron diferencias entre ambas condiciones aeróbicas, aunque se obtuvo una diferencia de alrededor de un 2% (v/v), (430-340 mg/g de rendimiento), entre el control anaeróbico y ambas condiciones aeróbicas. En cuanto a la producción de ácido acético, apenas hubo diferencias entre el control aeróbico y la fermentación controlada a un 50% DO, ocurriendo en ambas condiciones un incremento abrupto de la producción de ácido acético tras el corte en la entrada de aire (Figura 11), tal y como ya se había observado en los experimentos anteriores.

Considerando que la explicación a este escaso éxito fuera, quizá, que las condiciones de este ensayo (el mantenimiento de 50% DO) no fueran muy distintas de las condiciones control (10 v/v/h aire), se continuó trabajando con la hipótesis de que un cambio menos abrupto entre aerobiosis y anaerobiosis podría evitar este aumento abrupto de ácido acético. Se probaron, por triplicado, dos nuevas condiciones de aireación para PR1018, el mantenimiento del 50% DO y del 80% DO durante 84 horas (3.5 días tras la inoculación) para, posteriormente, programar la caída progresiva hacia el 0% DO (anaerobiosis) durante las siguientes 24 h, parando también la agitación al cerrar el flujo de aire al alcanzar las 108 h de cultivo (4.5 días) (Figura 11, indicado en amarillo y verde, respectivamente).



**Figura 11.** Principales parámetros de fermentación y perfil de oxígeno disuelto de fermentadores mantenidos a: a 50% DO (naranja); aireación 10 v/v/h (azul), (control aerobio); 10 v/v/h N<sub>2</sub> (gris) (control anaerobio), 50% DO durante 84h (amarillo) y 80% DO durante 84h (verde).

No se observan diferencias en el consumo de azúcares ni en la producción de etanol entre ninguna de las condiciones aeróbicas ensayadas (Figura 11), aunque tanto la producción de glicerol como, especialmente, la producción de ácido acético es considerablemente menor en estas nuevas dos condiciones, con

apenas diferencias entre sí (Figura 11). En cualquier caso, se observa que, en estas nuevas condiciones, donde la caída en la disponibilidad de oxígeno ocurre de manera progresiva, no se produce un incremento repentino en la producción de ácido acético (Figura 11). Si bien es cierto que aumenta conforme el ambiente cambia, este aumento es mucho menos pronunciado y la concentración de ácido acético se mantiene en niveles moderados hasta el final de la fermentación.

### **3.5. Consistencia de los parámetros de fermentación entre sistemas y medios de cultivo**

Los resultados obtenidos durante este trabajo dejan claro cómo cambios en la aireación, ya no solo debidos al régimen de entrada de aire (Figura 11), sino a las formas de cultivo (de matraz a biorreactor, por ejemplo, Figuras 3 y 4) pueden dar lugar a grandes diferencias en la producción de ácido acético. Para tratar de arrojar luz sobre este problema y facilitar los experimentos venideros relacionados con la respiro-fermentación, se realizó una fermentación por triplicado con PR50 y PR1018 bajo condiciones de aerobiosis en los dos sistemas de cultivo utilizados, matraces de 100 mL de volumen nominal y biorreactores (MiniBio, Applikon), manteniendo la aerobiosis por agitación orbital en el caso de matraces y por inyección de aire (10 v/v/h) en los biorreactores. Además, se compararon los medios de cultivo más utilizados por el grupo, mosto natural pasteurizado (en este caso mosto blanco), mosto sintético complejo (MS300) y mosto sintético simplificado (Cenit), (ver materiales y métodos), (Figura 12).

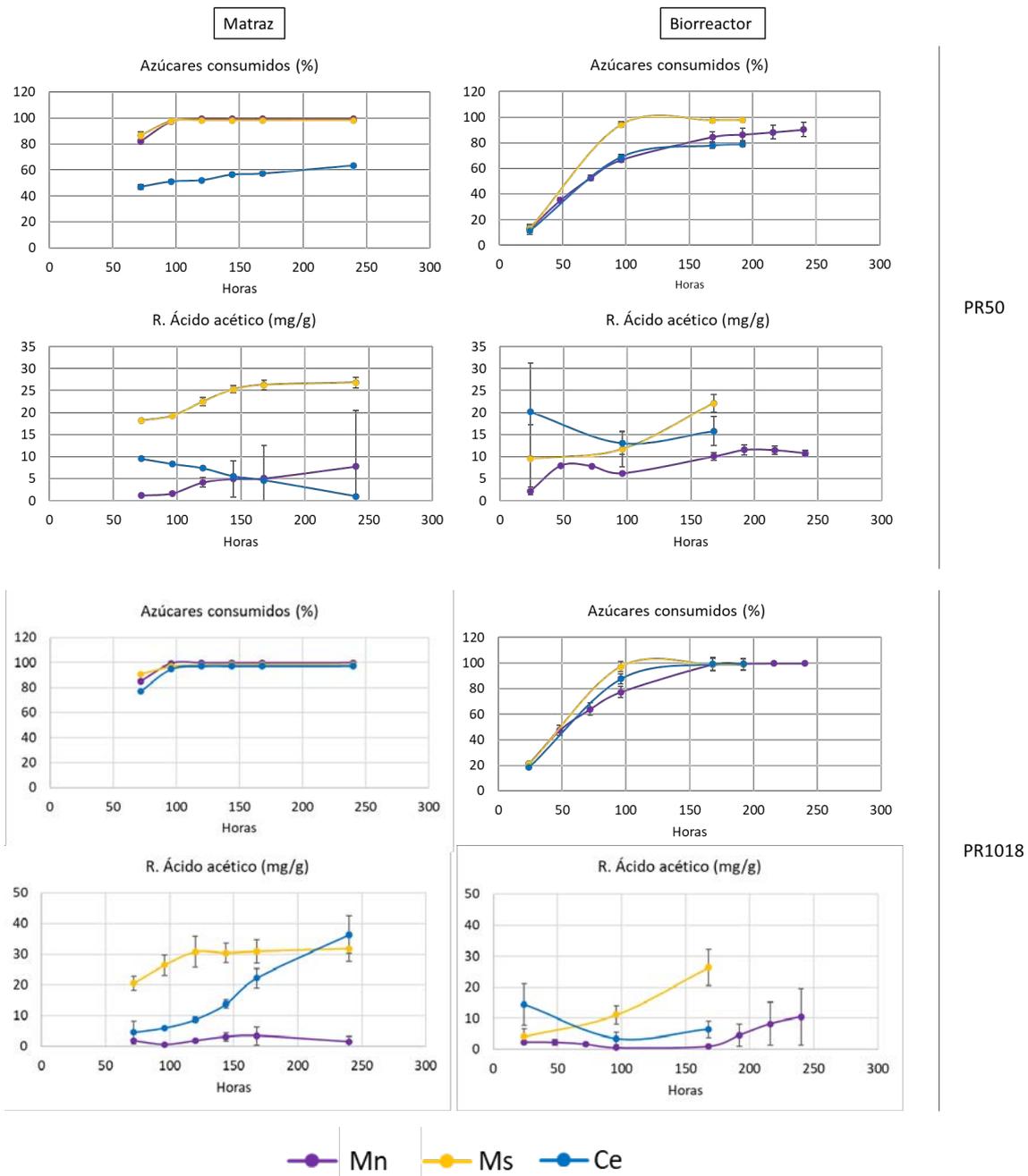
La cepa control PR50 mostró un comportamiento más variable según el sistema de cultivo y medio que la cepa PR1018 (Figura 12). En biorreactor, PR50 presenta un mayor consumo de azúcares en MS300, mientras que en cultivo en matraz el ritmo de consumo de MS300 es idéntico al de mosto natural. Por otro lado, en ninguno de los dos sistemas de cultivo consigue completar la fermentación con mosto Cenit, quedando un 20% y un 40% de azúcares residuales en biorreactor y matraz respectivamente.

En cuanto al rendimiento en etanol no parece existir diferencias entre los medios de cultivo ni sistemas, teniendo una tendencia semejante (en torno a 300 mg/g para 168h) (datos no mostrados) de nuevo reforzando la idea de que la producción de etanol es enormemente homogénea en *S. cerevisiae*.

En el caso de la producción de glicerol, no parece haber diferencias entre sistemas y medios de cultivo a excepción de la cepa PR50 que en matraz presenta un ligero aumento del rendimiento con mosto Cenit (datos no mostrados).

En lo relativo a la producción de ácido acético, PR50 presenta un menor rendimiento general en matraz que en biorreactor. Esta variabilidad de la producción de acidez volátil entre ambos sistemas de cultivo ya se había observado en los experimentos anteriores. El menor rendimiento en ambos sistemas de cultivo se observa en la fermentación de mosto natural, mientras que la producción máxima, 25 mg/g, se observa en medio Cenit fermentado en matraz (Figura 12).

Por su parte, PR1018 muestra menores diferencias entre los distintos sistemas de cultivo y medios de fermentación ensayados (Figura 12), siendo, como ya se había mostrado en experimentos anteriores, una cepa con una cinética de fermentación consistente. PR1018 alcanza el consumo total de azúcares pasadas las 96 h en ambos sistemas de cultivo, no habiendo tampoco diferencias entre medios. El rendimiento en etanol se mantiene en 300 mg/g al cabo de 168 h para ambos sistemas y en todos los medios. En el caso del glicerol parece haber un ligero aumento del rendimiento (apenas 10 mg/g) en biorreactor y mosto natural, con respecto al resto de cultivos (datos no mostrados). Donde se encuentran mayores diferencias es en el rendimiento en ácido acético, habiendo en general una mayor producción en matraz que en biorreactor, encontrando unos rendimientos a las 168 h de 31 mg/g para cenit, 22 mg/g para MS300 y 3.5 mg/g en mosto natural, frente a los 25 mg/g, 7 mg/g y 1 mg/g respectivamente que muestran los biorreactores en 168 h, en cualquier caso el medio con menor rendimiento es mosto natural, siendo el mosto sintético MS300 el que fomenta un mayor rendimiento (Figura 12).



**Figura 12.** Azúcares consumidos y rendimiento en ácido acético de PR50 y PR1018 en biorreactor y matraces bajo mosto natural (Mn), mosto sintético MS300 (MS) y mosto sintético Cenit (Ce).

## 4. DISCUSIÓN

Este trabajo persigue reducir el rendimiento alcohólico durante la fermentación del mosto de uva recurriendo a la respiración de los azúcares por parte de la levadura (Gonzalez et al., 2013). Esta estrategia requiere que las levaduras metabolicen los azúcares en condiciones aeróbicas. En contra de lo que se esperaba, algunos de los experimentos iniciales en esta línea mostraron que el principal inconveniente del uso de *S. cerevisiae* para este propósito no era una baja tasa de respiración debida al efecto Crabtree, sino un exceso en la producción de ácido acético asociado al uso de condiciones aeróbicas (Quirós et al., 2014).

El uso de levaduras genéticamente modificadas podría paliar este problema (Curiel et al., 2016). Sin embargo, esto limitaría su aplicación industrial debido a la legislación vigente en gran cantidad de países y al potencial rechazo por parte de los consumidores. Por otro lado, el uso de levaduras Crabtree negativas, que no pertenezcan al género *Saccharomyces*, requiere la optimización de la producción de cepas específicas para la industria, así como el desarrollo de estrategias específicas de inoculación y de manejo de nutrientes, entre otras adaptaciones para su uso industrial (Morales et al., 2015; Tronchoni et al., 2018). El uso de cepas enológicas de *S. cerevisiae* no recombinantes con una baja producción en ácido acético combinaría las ventajas que ofrecen algunas levaduras no-*Saccharomyces* con el conocimiento industrial ya existente para *S. cerevisiae*, por lo que su aplicación sería más sencilla y fiable (un único paso de inoculación, tolerancia a estrés, compatibilidad entre cepas etc.).

El análisis fenotípico bajo condiciones aeróbicas de 25 cepas de *S. cerevisiae* de distinta procedencia dentro del ambiente enológico (Tabla S1.1) ha mostrado una homogeneidad relativa entre los aislados con respecto al consumo de azúcares y especialmente con respecto al rendimiento en etanol. En este trabajo se puede observar como la producción de etanol es considerablemente estable, no solo entre cepas distintas, sino bajo regímenes de aireación, sistemas de cultivo e incluso medios de cultivo distintos, siendo un rasgo con alta robustez en la especie (Camarasa et al., 2011; Palacios et al., 2007). En cualquier caso, este trabajo muestra claramente como, mediante el uso de la respiración de *S. cerevisiae*, es posible reducir el grado alcohólico del vino entre 2% v/v y 4% v/v. Esto sería suficiente como para amortiguar el efecto negativo que ejerce el cambio climático sobre este parámetro.

Como se ha comentado, la utilización de *S. cerevisiae* en condiciones aeróbicas tiene el grave inconveniente de la sobreproducción de ácido acético. En la caracterización de las 25 cepas presentadas, el rendimiento en ácido acético se reveló como el parámetro con mayor diversidad; y aunque la gran mayoría de cepas presentan una acidez volátil muy superior a la considerada como tolerable, existe una diferencia de casi un orden de magnitud entre los valores más extremos observados. Este amplio rango de producción abre la puerta al uso de aislados naturales de *S. cerevisiae* para la reducción del grado alcohólico en vino.

En la selección de nuevas cepas enológicas de *S. cerevisiae* compatibles con la fermentación aeróbica debe considerarse que distintos regímenes de aireación y sistemas de cultivo pueden dar lugar a diferencias significativas en el resultado de la fermentación. Por ejemplo, la fermentación aerobia en biorreactor de la cepa PR543 fue incompleta, mientras que había mostrado resultados prometedores durante el primer ensayo en matraz. Además, la acidez volátil parece ser el parámetro más dependiente del sistema de cultivo, como puede observarse en los ensayos realizados con distintos mostos y regímenes de aireación (Figura 12). No obstante, algunas cepas, como los aislados naturales PR117 o PR1018, parecen ser más consistentes entre las distintas condiciones, lo que las hace más prometedoras para aplicaciones industriales. Ambas cepas presentan producciones de ácido acético sumamente bajas en condiciones de aireación. Sin embargo, ambas presentan ciertos inconvenientes. En el caso de PR1018 es necesario poner atención en la abrupta subida de la acidez volátil una vez los azúcares se han consumido, probablemente debida a un cambio metabólico hacia el consumo de etanol una vez se han agotado los azúcares disponibles. Por otro lado, PR117 no muestra esta limitación, el rendimiento en ácido acético permanece bajo durante toda la fermentación. Sin embargo, y probablemente como causa de esto, las fermentaciones en las condiciones mostradas son más lentas y los azúcares no llegan a consumirse totalmente.

Idealmente, considerando que estamos trabajando con cepas Crabtree positivas, el tiempo de aireación debería ser tan largo como fuera posible para permitir una reducción aceptable de la graduación alcohólica. Sin embargo, la aireación debería ser interrumpida antes del agotamiento total de los azúcares del mosto para evitar la sobreproducción de ácido acético. Curiosamente no solo es crucial en qué momento se produzca la interrupción de la aireación, (atendiendo a la cantidad de azúcares residuales en el mosto), sino cómo se produzca dicha interrupción.

Este trabajo muestra claramente que un cambio inmediato hacia condiciones anaeróbicas genera un abrupto incremento en la producción de ácido acético. Una probable explicación para este fenómeno es que un cambio repentino en la disponibilidad de oxígeno genera un cambio metabólico también repentino, dando lugar a un cuello de botella en la ruta respiratoria, “abruptamente cerrada”, siendo la producción de ácido acético una forma de gestionar ese exceso de intermediarios metabólicos que no pueden incorporarse a la ruta.

El trabajo realizado con estas cepas muestra el alto impacto que ejerce la disponibilidad de oxígeno sobre el metabolismo de las levaduras, lo que da pie a plantearse el impacto que podría tener la aireación sobre el perfil volátil del vino (Tronchoni et al., 2018). En relación con esto, la cepa PR1018 parece ser prometedora, la concentración de moléculas típicamente relacionadas con el proceso de oxidación es menor en condiciones aeróbicas para PR1018 que para el resto de las cepas, incluyendo moléculas como el acetaldehído, los acetales o moléculas relacionadas con el dioxano. Considerando que el acetaldehído es un precursor de muchos compuestos de este grupo (Figura 7) los bajos niveles de acetaldehído en cultivos aeróbicos de PR1018 podrían ser la causa de la baja presencia general de estos compuestos. Los acetales aumentan durante la maduración biológica de los vinos de Jerez (Morales et al., 2020). Los hidroximetil 2-metil dioxanos/dioxolanos, formados por la condensación del acetaldehído y el glicerol, parecen incrementarse durante la maduración oxidativa en vinos de Oporto (Silva Ferreira et al., 2002). El trimetil dioxolano ha sido detectado como un compuesto odorante importante en vinos oxidados (Escudero et al., 2000). Esto sugiere que, usando esta cepa como cultivo iniciador, el impacto de la aireación en el perfil aromático del vino podría minimizarse.

Hay que considerar que la combinación entre cepa y forma de aireación debe tener influencia sobre distintos compuestos. Aunque en este trabajo se presenta una caracterización de los compuestos volátiles presentes tras 10 días de aireación, los distintos umbrales e interacciones entre los diferentes compuestos hacen muy difícil anticipar su impacto sensorial en el producto final. Se debe prestar atención, además, al impacto del oxígeno sobre otros compuestos sensorialmente activos derivados directamente del mosto de uva.

En términos de color, aunque no se ha detectado ningún impacto negativo en este ni en anteriores estudios entre la existencia o no de aireación durante la fermentación, debería valorarse la estabilidad a largo plazo del vino producido en aerobiosis.

En este trabajo la reducción progresiva de los niveles de oxígeno ha resultado efectiva a la hora de mantener una concentración reducida de ácido acético. Los resultados obtenidos con PR1018 muestran un posible camino para la optimización del proceso con otras cepas. En definitiva, la estrategia desarrollada en este trabajo, que implica la respiración de azúcares por parte de *S. cerevisiae*, constituye una mejora importante sobre la propuesta previa, que implicaba el uso de levaduras no-*Saccharomyces* (Gonzalez et al., 2013).

---

## CAPÍTULO 2

# Evolución dirigida de *S. cerevisiae* para la reducción de la producción de ácido acético en condiciones de aerobiosis

---

Correspondiente parcialmente al artículo publicado por Guindal, A.M., Gonzalez, R., Tronchoni, J., Roodink, J.S., Morales, P. (2023). Directed Evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for low volatile acidity during winemaking under aerobic conditions. *Food Microbiol.* 114:104282.



## 1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha desarrollado en el capítulo anterior (Tronchoni et al., 2022; Capítulo 1), pese al efecto Crabtree, *S. cerevisiae* es capaz de consumir, a través de la respiración, una proporción de azúcares suficiente para reducir el grado alcohólico del vino entre 2% - 4% v/v. Sin embargo, este abordaje presenta el inconveniente de un aumento desproporcionado de la acidez volátil al incrementar la producción de ácido acético bajo condiciones de aireación.

Algunas de las cepas evaluadas en el capítulo anterior mostraron baja producción de ácido acético en aerobiosis. De hecho, una de ellas, PR1018, fue optimizada hasta llevar a cabo una fermentación aerobia que permitió la bajada del grado alcohólico sin sobreproducción de ácido acético a escala laboratorio (150 mL), (Capítulo 1; Tronchoni et al., 2022). Sin embargo, hay que considerar que una estrategia para la reducción del grado alcohólico basada en una única cepa de levadura “universal” es poco probable que genere un impacto real en el sector. La enología actual busca la diferenciación, existiendo un interés cada vez mayor por cepas de levaduras que sean originales y distintivas. La implementación industrial del uso de la respiración de *S. cerevisiae* para la reducción del grado alcohólico requiere una mayor cantidad cepas de levaduras apropiadas para ello, que ofrezcan diversidad a los productores.

Si bien dentro de la diversidad genética natural de la especie hay sin duda cepas con baja producción de acético, los experimentos presentados en el capítulo 1 (Tronchoni et al., 2022) parecen indicar que este rasgo no es muy común y presenta una alta variabilidad dependiendo de las condiciones de cultivo, por lo que requiere un trabajo de cribado y una posterior optimización de las cepas a las condiciones de fermentación industrial.

Una forma más directa de obtener cepas adecuadas para este abordaje sería mediante ingeniería genética. Sin embargo, especialmente en Europa, la utilización de organismos modificados genéticamente dentro de la industria alimentaria está estrictamente regulada e implica procesos largos y costosos con pocas garantías de retorno de la inversión. Nada parece indicar que esto vaya a cambiar en un futuro cercano, y aunque lo hiciera, el uso de transgénicos no deja de ser algo que podría generar controversia entre los consumidores.

A pesar de que es poco probable que lleguen al mercado, estas cepas modificadas genéticamente son una fuente de información valiosa para la

obtención de cepas mejoradas por métodos aceptados (fuera de la consideración de OMG). En el trabajo de Curiel et al., (2016) se generaron una serie de cepas defectivas para genes implicados en la represión de la respiración, con el objetivo de lograr una bajada en la producción de etanol en condiciones de aerobiosis gracias a un aumento de la capacidad respiratoria de estas cepas. Sin embargo, se observó que, aunque estas cepas no aumentaban su respiración como se había predicho, algunas de ellas sí que presentaban una producción de ácido acético mucho menor de la esperada en condiciones de aerobiosis, en concreto en algunos mutantes relacionados con una disminución de la represión por catabolito de carbono (CCR), (Curiel et al., 2016).

Para la selección de mutantes de CCR en *S. cerevisiae* se utiliza comúnmente un análogo de glucosa no catabolizable, la 2-desoxi-D-glucosa (2DG), (Neigeborn y Carlson, 1987), junto con una fuente de carbono alternativa (en este trabajo galactosa). Al actuar la 2DG como represor, pero no como fuente de carbono, permite discriminar aquellos organismos con una CCR menos severa, que tendrán activas otras rutas catabólicas (en este caso la galactólisis o ruta de Leloir), siendo capaces de crecer en el medio de selección.

Además del trabajo de Curiel et al., (2016), existen en la literatura científica otras evidencias de cepas con una menor represión de CCR ligada a una menor producción de ácido acético. Por ejemplo, en Mizuno et al. (2006) se encontró que mutantes espontáneos resistentes a la 2DG producían menores rendimientos de ácido acético que su cepa parental durante la fermentación de cerveza de alta graduación. Estos autores se enfocaban en fermentaciones anaeróbicas con cepas cerveceras y no utilizaban una fuente de carbono específica junto a la 2DG, por lo que sus descubrimientos no pueden ser directamente extrapolables a los expuestos en este trabajo, pero apoyan, junto con el trabajo de Curiel et al. (2016), que existe esta relación.

En este capítulo se explora por un lado la relación entre la CCR y el metabolismo del ácido acético, mediante un análisis transcriptómico de los mutantes  $\Delta\Delta$ Reg1 y  $\Delta\Delta$ Hxk2 desarrollados por Curiel et al. (2016). Por otro lado, se mostrará un trabajo de evolución dirigida en busca de la flexibilización de la CCR, utilizando galactosa como única fuente de carbono en presencia de concentraciones crecientes de 2DG, para lograr obtener cepas con baja producción de acidez volátil en condiciones de aerobiosis. El objetivo final es utilizar estas cepas para la reducción del grado alcohólico mediante respiración.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas

Para el trabajo de evolución se utilizaron tres cepas de levaduras comercializadas como cultivos iniciadores y muy utilizadas en la industria: EC1118 (Lalvin EC1118, Lallemand Inc.), T73 (Lalvin T73, Lallemand Inc.) y FX10 (Zymaflore FX10 Laffort) (perdida al inicio de la evolución). Además, se utilizó un aislado de pie de cuba de fermentación espontánea, IFI473 (CECT 12658).

En el caso del análisis transcriptómico se utilizaron las cepas construidas en el trabajo de Curiel et al., (2016) sobre el parental FX10, ( $\Delta\Delta$ Reg1,  $\Delta$ Reg1,  $\Delta\Delta$ Hxk2,  $\Delta\Delta$ Pdc1 y  $\Delta\Delta$ Pde2) que se encuentran depositadas en la colección del laboratorio criopreservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Mosto natural y mosto sintético

Para los ensayos de caracterización se usaron tanto mosto natural blanco (cosecha de 2019, 220 g/L azúcares, 186 mg/L de nitrógeno asimilable) como mosto natural rosado (cosecha 2015, 200 g/L azúcares, 153 mg/L nitrógeno asimilable), según se indique. Ambos se mantuvieron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Antes de su uso el mosto se pasteurizó en botellas de 1L, calentando en autoclave hasta los  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  y dejando bajar la temperatura dentro del mismo.

El mosto sintético sólido está basado en el medio MS300 (Bely et al., 1990) que contiene por litro: 20 g agar, 100 g glucosa, 100 g fructosa, 5 g ácido DL-málico, 546 mg ácido cítrico monohidratado, 3 g ácido tartárico, 460 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 750 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 500 mg  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 250 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 160 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 200 mg  $\text{NaCl}$ , 4 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg  $\text{KI}$ , 0.4 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1.06 mg  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 15 mg ergosterol, 4.8 mg oleato de sodio, 0.5 mL *Tween* 80, 19.5 mg L-tirosina, 0.6 g L-prolina, 0.5 g L-glutamina, 0.445 g L-arginina, 0.175 g L-triptófano, 145.6 mg L-alanina, 0.12 g ácido L-glutámico, 78 mg L-serina, 75.4 mg L-treonina, 48 mg L-leucina, 44.2 mg ácido L-aspártico, 44.2 mg L-valina, 37.7 mg L-fenilalanina, 32.5 mg L-isoleucina, 45.7 mg L-histidina  $\cdot \text{H}_2\text{O}$  HCl, 31.2 mg L-metionina, 18.2 mg L-glicina, 21.1 mg L-lisina, 27 mg L-cisteína, 20 mg mioinositol, 1.5 mg pantotenato de calcio, 0.25 mg tiamina hidroclicada, 2 mg, ácido nicotínico, 0.25 mg piridoxal 5'fosfato  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.003 mg biotina, pH 3.5.

### 2.3. Análisis transcripcional

Los mutantes  $\Delta\Delta$ Reg1,  $\Delta$  Reg1,  $\Delta\Delta$ Hxk2,  $\Delta\Delta$ Pdc1 y  $\Delta\Delta$ Pde2 realizados sobre un fondo genético FX10 fueron inicialmente cultivados en placas de YPD sólido a 25 °C durante 48 h para realizarse posteriormente inóculos independientes en YPD líquidos cultivados durante 48 h a 25 °C.

Para su caracterización se llevaron a cabo varias fermentaciones, tal y como se detalla en el texto, todas ellas en biorreactores Applikon Minibio, con 150 mL de mosto blanco natural 2019, pasteurizado como se ha detallado con anterioridad.

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante el kit comercial Pure Link RNA mini kit (Invitrogen) seguido del tratamiento con DNase PureLink DNase (Invitrogen), todo ello según las indicaciones del fabricante. Antes de la generación de librerías se realizó un paso previo de filtrado de colas poli-A para la selección de ARNm.

La preparación de las librerías, así como el tratamiento de datos, fueron llevados a cabo por la Plataforma de Genómica y Bioinformática del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR). La secuenciación se realizó en la empresa Health in Code, subcontratada por el CIBIR, utilizando un equipo Illumina HiSeq 1500, realizándose lecturas de 100pb desde ambos extremos (*pair-ends*). Como genoma de referencia para los alineamientos se tomó el genoma de *S. cerevisiae* S288c R64 (acceso GCA\_000146045.2). El alineamiento se realizó mediante HISAT 2.1.0 (Kim et al., 2019). El análisis de calidad de los alineamientos se llevó a cabo con el módulo qualimap rnaseq de Qualimap v2.2.1 (Okonechnikov et al., 2015) y la integración de los resultados se realizó mediante el software MultiQC v1.11 (Ewels et al., 2016). Las diferencias en expresión entre las muestras se obtuvieron mediante EdgeR (Robinson et al., 2010) y el paquete SARTools (Varet et al., 2016).

El enriquecimiento funcional de los genes con expresión diferencial se interpretó mediante dos análisis distintos. Por un lado, se realizó un análisis de sobreexpresión ORA (*Over-representation analysis*), (Huang et al., 2009) que permite valorar si existe sobrerrepresentación estadística ( $FDR \leq 0.05$ ) de alguna función o ruta en el conjunto de genes evaluado. Por otro lado, se realizó un análisis GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) que analiza el conjunto de genes en

función de su jerarquía basada en el valor de  $\log_2$  *Fold Change* (LFC) y el p-valor obtenido mediante EdgeR (Reimand et al., 2019).

Ambos análisis se llevaron a cabo mediante la plataforma online WebGestalt 2019 (Liao et al., 2019). Los recursos de las bases de datos KEGG (Kanehisa, 2000) y SGD (Cherry et al., 2012) se utilizaron para representar los genes analizados sobre las rutas metabólicas de *S. cerevisiae*. Los parámetros usados para el análisis fueron 15 genes como número mínimo de genes por categoría y 200 genes como número máximo, un FDR<0.05 y 1000 permutaciones.

## 2.4. Evolución dirigida

Para iniciar los cultivos de evolución, primero se prepararon por triplicado preinóculos independientes en 20 mL de YPD (peptona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L y glucosa 20 g/L) en tubos Falcon de 50 mL, mantenidos a 25 °C durante 48 h.

La evolución se llevó a cabo por triplicado en matraces de 100 mL de volumen nominal con 20 mL de medio de cultivo. El medio de evolución, YPGal, se basó en la composición del medio YPD sustituyendo la glucosa como fuente de carbono por galactosa, (peptona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L y galactosa 20 g/L). Para mantener la aerobiosis, los matraces fueron cubiertos ligeramente con papel de aluminio. Se incubaron a 25 °C con agitación (180 rpm).

Una vez el cultivo alcanzaba una densidad óptica estable, en torno a las 72 h, un 10% del volumen era transferido para inocular un nuevo cultivo con igual o mayor concentración de 2DG. El primer cultivo fue inoculado a una OD<sub>600</sub> de 0.2 en medio YPGal sin presencia de 2DG, con la primera transferencia (10% del cultivo) se incorporó al medio 50 mg/L de 2DG, alcanzándose 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L con las siguientes transferencias, a medida que el tiempo para que los cultivos alcanzaran la fase estacionaria se fue acortando.

La evolución fue mantenida durante ~150 generaciones (~3 generaciones sin 2DG; ~11 generaciones a 50 mg; ~3 generaciones a 100 mg/L; ~3 generaciones a 150 mg/L; ~130 generaciones a 200 mg/L.) en cada triplicado para cada una de las cepas.

Terminada la evolución, las poblaciones finales fueron utilizadas para el fenotipado en mosto natural (detallado más adelante).

La ausencia de contaminación fue comprobada periódicamente (aproximadamente cada 10 generaciones) mediante PCR de elementos interdelta (Legras y Karst, 2003) de colonias aisladas. La identidad de todos los clones caracterizados en este trabajo también fue confirmada por PCR de elementos interdelta.

## 2.5. Ensayos de respuesta a CCR

Las poblaciones evolucionadas y criopreservadas fueron inoculadas en tubos Falcon de 50 mL con 25 mL de YPD. Tras 48 h a 25 °C se realizaron una batería de diluciones (de  $10^0$  a  $10^{-6}$ ) con cada una de ellas. Se tomaron 1.5  $\mu$ l de cada dilución para inocular placas de medio sólido con distintas fuentes de carbono, siendo la composición de los medios 20 g/L agar, 20 g/L peptona, 20 g/L extracto de levadura y una de las siguientes fuentes de carbono según se indique: 20 g/L glucosa, 20 g/L galactosa, 20 g/L rafinosa, 20 g/L maltosa, 20 g/L glicerol, 20 mL/L etanol, 0.2 mL/L ácido acético; incorporándose cuando así se indique 200 mg/L 2DG o 200 mg/L glucosamina (GA).

## 2.6. Crecimiento en mosto natural

Con cada población evolucionada (Figura S2.2) se llevó a cabo una fermentación por triplicado a 4 días en matraces (100 mL volumen nominal) con 20 mL de mosto natural rosado pasteurizado. Los cultivos se inocularon a una  $OD_{600}$  de 0.2, manteniéndose en agitación, (180 rpm) a 25 °C y ligeramente cubiertos con papel de aluminio. Tras 4 días, los cultivos fueron centrifugados y el sobrenadante se guardó a -20 °C para su análisis mediante HPLC. Los clones aislados a partir del resto celular de esta fermentación (aislados F, ver más abajo) fueron a su vez fenotipados siguiendo este mismo sistema y por triplicado.

En el caso de los clones M, aislados desde el final de evolución (ver más abajo), se cultivaron como ya se ha descrito durante 4 días en aerobiosis. Tras estos 4 días los cultivos se transfirieron a un tubo Falcon estéril de 50 mL cerrado con válvula (Actylab, Logroño, Spain), permitiendo el escape, pero no la entrada de gases, (anaerobiosis) manteniéndose la fermentación otros 7 días a 25 °C sin agitación.

Los clones de EC1118 seleccionados para su caracterización se cultivaron en mosto blanco pasteurizado a 25 °C durante 11 días, manteniéndose en matraces

(100 mL volumen nominal) en agitación (180 rpm) para el cultivo en aerobiosis y en tubos Falcón de 50 mL cerrados con válvula de aire para condiciones de anaerobiosis. Se tomaron muestras a día 4 y 11 de los matraces y a día 11 de los tubos Falcon.

## 2.7. Selección de los clones evolucionados

A partir de las poblaciones evolucionadas se obtuvieron cultivos puros en dos puntos distintos, tanto desde la población final evolucionada (aislados M, Figura S2.2) como a partir de 4 días de fermentación aerobia (aislados F, Figura S2.2). Este último caso implica un paso adicional en la selección, ya que se parte desde la población que ha superado 4 días de fermentación alcohólica (descrito en el epígrafe anterior).

Para los aislados M, las poblaciones evolucionadas (mantenidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se hicieron crecer en dos pases sucesivos de 48 h en YPD líquido a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente inocular desde estos precultivos placas de medio selectivo (YPGal, 20 g/L agar bacteriológico y 200 mg/L 2DG). De cada población se seleccionaron 5 colonias (aislados M) que fueron re-aisladas en placa con medio selectivo.

Para los clones seleccionados en el final de fermentación (aislados F) se recogió la biomasa tras 4 días de fermentación aerobia en mosto natural. Con esta biomasa se realizó una batería de diluciones para plaqueo en YPD sólido (20 g/L agar bacteriológico). Desde medio sólido se seleccionó una colonia por cada réplica de fermentación (3 para cada población).

Para mayor claridad la Figura S2.2 muestra esquemáticamente la genealogía de los clones utilizados a lo largo de este trabajo.

## 2.8. Resistencia a factores de estrés

Los clones F aislados se crecieron en YPD a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h, tras lo cual se utilizaron  $1.5\text{ }\mu\text{l}$  para inocular placas de mosto sintético con diferentes agentes estresantes (10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 6% etanol, 10% etanol, 120 mg/L  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), mantenidas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y dos placas de mosto sintético con temperatura como factor de estrés, ( $12\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Cada clon fue inoculado por triplicado (Figura S2.4).

## 2.9. Fermentaciones aerobias en biorreactor

Para los ensayos en biorreactor se realizó un precultivo de 48 h en YPD a 25 °C tal y como se ha detallado en los otros apartados. Se utilizaron los fermentadores MiniBio de Applikon (250 mL de volumen nominal) con 150 mL de mosto natural blanco pasteurizado y 200 µl de antiespumante (antifoam 204, Sigma-Aldrich, España), inoculándose a una OD<sub>600</sub> de 0.2.

Los experimentos fueron realizados por triplicado. La temperatura se mantuvo a 25 °C y la agitación a 1000 rpm, la aireación se realizó desde el fondo de fermentador mediante un difusor, con un caudal de 25 mL/min (10 v/v/h; volumen de gas/volumen de cultivo/hora). El caudal de gas fue controlado mediante el controlador de flujo másico MFC17 (Aalborg Instruments and Controls Inc., Orangeburg, NY), cuya calibración fue regularmente verificada con un caudalímetro electrónico (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Durante la experimentación se tomaron periódicamente muestras de 1 mL de cultivo para su análisis por HPLC. El oxígeno disuelto fue registrado por sensores polarográficos (Applikon).

### 2.10. Determinación de la concentración de metabolitos

La concentración de glucosa, fructosa, glicerol, ácido acético y etanol de las fermentaciones fue determinada mediante HPLC de manera idéntica a lo descrito en el capítulo 1.

### 2.11. Análisis estadísticos

Todas las fermentaciones llevadas a cabo en este trabajo (ya sea en matraz, tubo Falcon o biorreactor) se realizaron por triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron mediante R studio (versión 4.1.2 (2021-11-01)), (R Core Team, 2021). Los consumos y rendimientos de los metabolitos analizados fueron comparados mediante análisis de un factor de la varianza. La comparación de medias fue llevada a cabo mediante una prueba de Tukey.

### 3. RESULTADOS

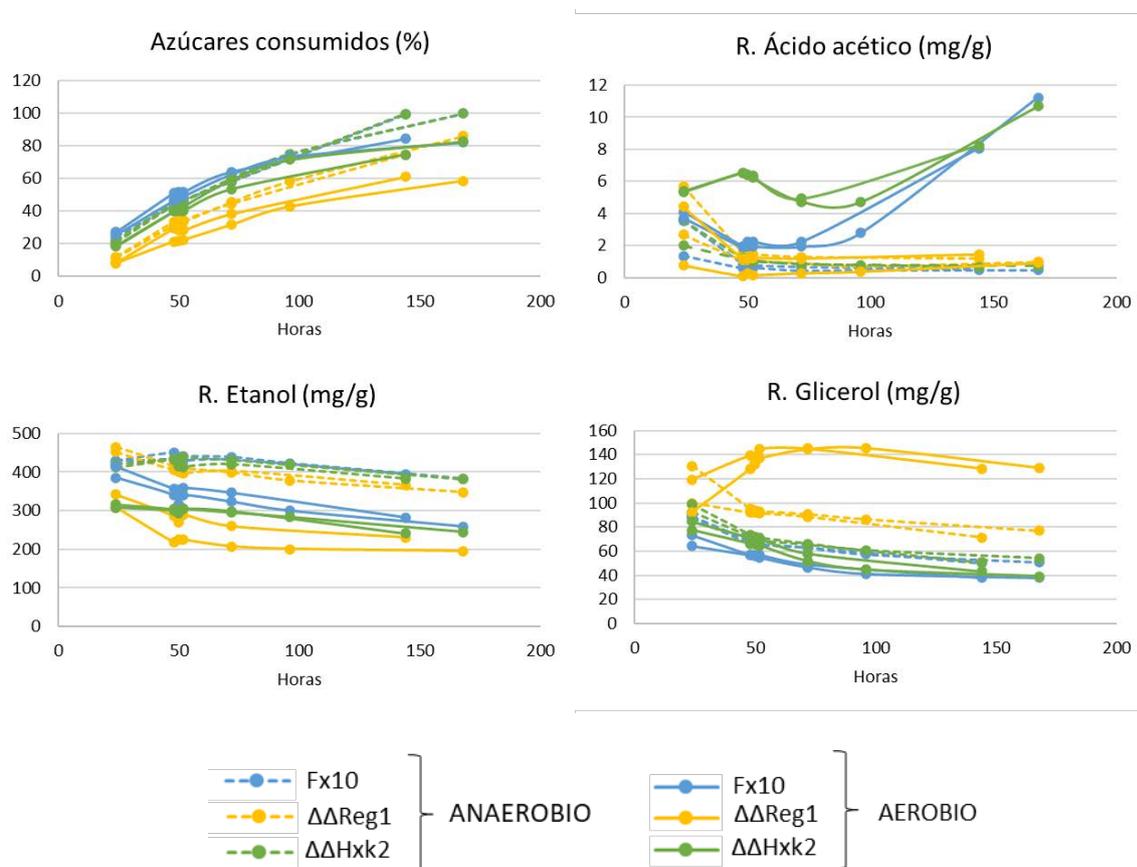
#### 3.1. Caracterización del perfil de fermentación de los mutantes de respiración

Se realizó una primera fermentación aeróbica con los mutantes del trabajo de Curiel et al., (2016) generados sobre el genotipo industrial FX10:  $\Delta\Delta$ Reg1,  $\Delta$ Reg1,  $\Delta\Delta$ Hxk2,  $\Delta\Delta$ Pdc1 y  $\Delta\Delta$ Pde2, con el objetivo de comprobar el comportamiento de cada mutante en un sistema de cultivo distinto al de la publicación original (Applikon miniBio en este caso). El comportamiento observado fue muy similar al publicado en el trabajo original (datos no mostrados). Se decidió centrar el análisis transcriptómico en dos mutantes con una clara flexibilización de la CCR y sin embargo con un comportamiento contrario,  $\Delta\Delta$ Reg1, con nula producción de ácido acético y  $\Delta\Delta$ Hxk2 con producción similar e incluso mayor que el parental FX10.

Ambos mutantes fueron caracterizados por duplicado en condiciones aeróbicas (10 v/v/h) y anaeróbicas (10 v/v/h N<sub>2</sub>) en mosto blanco natural, (Figura 13). Hxk2 presenta un consumo de azúcares muy similar al de FX10 en ambas condiciones, mientras que  $\Delta\Delta$ Reg1 muestra un ritmo de consumo más lento, especialmente en aerobiosis. El rendimiento en etanol es similar entre ambos mutantes y el parental, siendo superior, como cabría esperar, en condiciones de anaerobiosis. En cuanto a la producción de ácido acético, aunque ambos mutantes se comportan igual que el parental en condiciones de anaerobiosis,  $\Delta\Delta$ Reg1 no muestra aumento alguno del rendimiento en condiciones de aerobiosis, mientras que  $\Delta\Delta$ Hxk2 presenta rendimientos mayores a los de FX10 durante las primeras 72 h para quedar en niveles semejantes al parental al término de la fermentación. En cuanto a la producción de glicerol,  $\Delta\Delta$ Reg1 produce un rendimiento mucho mayor que  $\Delta\Delta$ Hxk2 y FX10 (~140 mg/g frente a 50-60 mg/g), probablemente como compensación por la escasa producción de ácido acético.

En función de estos datos se consideró que, debido a la gran diferencia entre ambos mutantes y el parental durante las primeras horas de fermentación, el punto de 50 h era el más adecuado para llevar a cabo el análisis transcriptómico de las cepas. Se realizaron fermentaciones tanto aeróbicas como anaeróbicas en

triplicado para la obtención de las muestras y el seguimiento de metabolitos por HPLC (datos no mostrados).



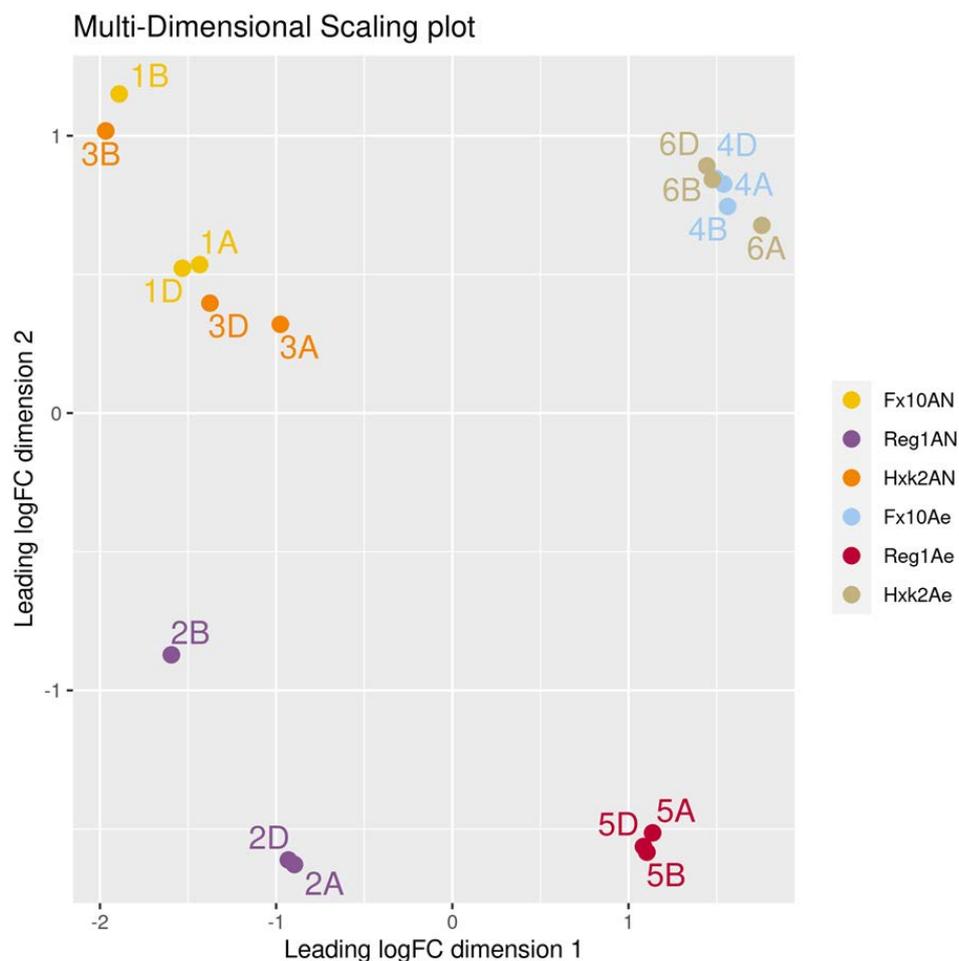
**Figura 13.** Principales parámetros de fermentación en condiciones de aerobiosis (10 v/v/h aire) y anaerobiosis (10 v/v/h N<sub>2</sub>) de los mutantes por deleción  $\Delta\Delta Reg1$  y  $\Delta\Delta Hxk2$  y del parental FX10.

### 3.2. Análisis de distancia global

Tras cuantificar la expresión diferencial mediante EdgeR, se realizó un análisis de distancia global entre las muestras. Como puede apreciarse en la Figura 14 los datos de expresión diferencial separan claramente las muestras aeróbicas de las anaeróbicas (eje 1) y el mutante  $\Delta\Delta Reg1$  de  $\Delta\Delta Hxk2$  y FX10 (eje 2), que correlacionan en ambas condiciones.

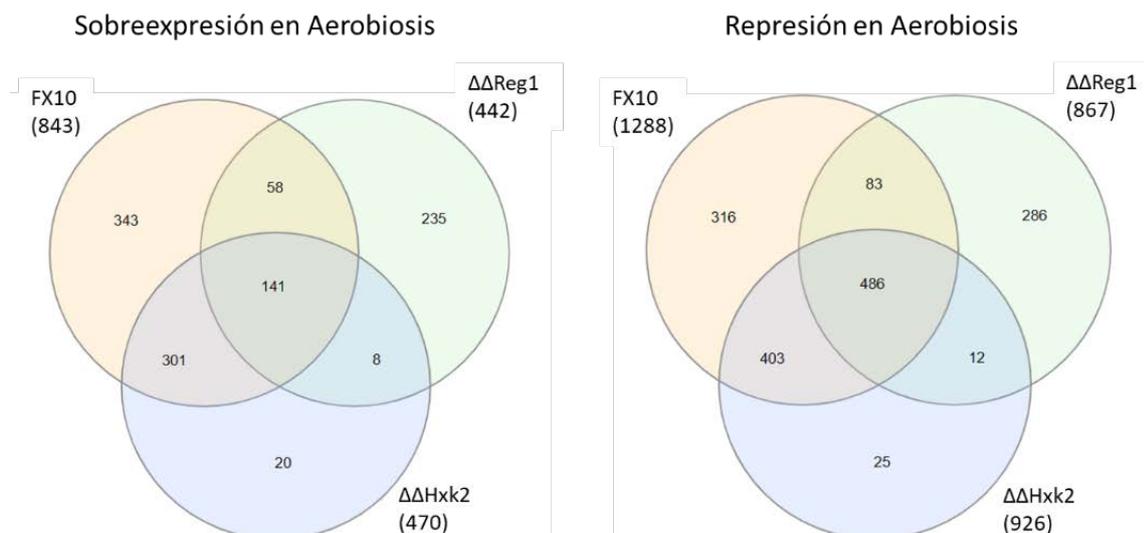
Con los datos de LFC, número de cuentas por millón y el valor FDR obtenido, se obtuvo el número de transcritos con expresión diferencial del total de muestras secuenciadas para cada análisis (Figura S2.3) donde quedó de nuevo patente las escasas diferencias entre FX10 y el mutante  $\Delta\Delta Hxk2$ .

Considerando sólo los genes con una expresión diferencial significativa según el p-valor obtenido mediante EdgeR y en función del LFC, se realizó un análisis de los cambios que presentaba cada mutante en condiciones de aerobiosis frente al estándar de anaerobiosis, considerando los cambios de expresión de FX10 como referencia. Se cuantificó el número de genes sobreexpresados o reprimidos que tenía cada cepa en común con las demás. Si se considera FX10



**Figura 14.** Análisis de distancia global de los mutantes delectivos  $\Delta\Delta$ Reg1y  $\Delta\Delta$ Hxk2 y del parental FX10, en condiciones de aerobiosis (Ae) y anaerobiosis (AN).

como referencia, solo 141 de los 841 genes sobreexpresados en el parental se encuentran así en ambos mutantes, siendo  $\Delta\Delta$ Hxk2 el que mayor número de genes sobreexpresados comparte con el parental. Este resultado está de acuerdo con el del análisis de distancia global (Figura 15). En el caso de los genes reprimidos 486 de los 1288 presentes en el parental son comunes en las tres cepas, de nuevo  $\Delta\Delta$ Hxk2 es el más similar al parental con 403 genes reprimidos en común.



**Figura 15.** Diagrama de Venn del número de transcritos comunes y no comunes entre los tres genotipos caracterizados sobreexpresados y reprimidos en aerobiosis con respecto a anaerobiosis.

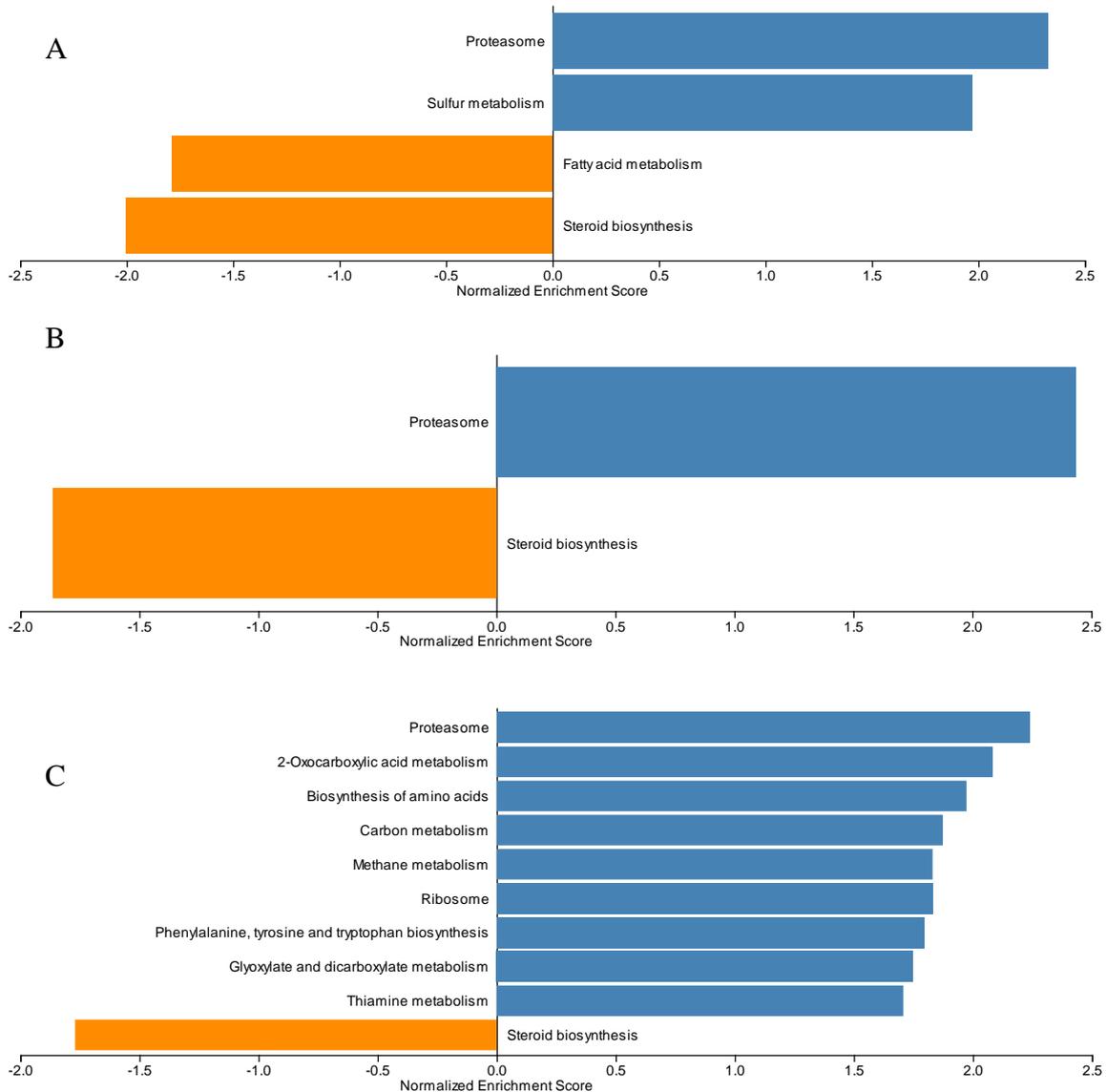
El análisis de la expresión diferencial entre el mismo organismo frente a dos condiciones distintas (aerobiosis de anaerobiosis) permitió obtener información sobre qué cambios transcripcionales ocurren en el genotipo original (FX10) en función de la disponibilidad de oxígeno, para comparar si estos cambios son similares en los mutantes, o hay cambios transcripcionales que puedan explicar su comportamiento con respecto a la producción de ácido acético. Los genes reprimidos o sobreexpresados en FX10 (aeróbico frente anaeróbico) o no son estadísticamente significativos o se encuentran regulados en el mismo sentido en el mutante  $\Delta\Delta$ Hxk2. En el caso de  $\Delta\Delta$ Reg1 sí se encuentran ejemplos de regulación contraria a la regulación “estándar” de FX10. Hay 13 genes sobreexpresados en FX10 que se mantienen reprimidos en  $\Delta\Delta$ Reg1, los genes *FUS1*, *HSP30*, *RAD59*, *SOR2*, *TPO2*, *SOR1*, *SEK1*, *HOF1*, *SRT1* y cuatro ORFs anotadas como genes o proteínas de función desconocida (YHR095W, YJR128W, YGR204C-A, e YKL070W). Otros 10 genes reprimidos en FX10 se encuentran sobreexpresados en el mutante  $\Delta\Delta$ Reg1, los genes *ATO3*, *ALD5*, *LEU1*, *ENO2*, *LYS12*, *GPM1*, *PDR10*, una ORF no codificante (YAL037C-B) y dos codificantes para proteínas desconocidas (YIR018C-A e YLR307C-A). En cualquier caso, ninguno de estos genes, regulados de forma contraria entre  $\Delta\Delta$ Reg1 y el parental, parece tener una especial relevancia en el metabolismo del ácido acético, a excepción de *ALD5*, sobreexpresado en  $\Delta\Delta$ Reg1 y que codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial.

### 3.3. Efecto de la disponibilidad de oxígeno

Se realizó un análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas para cada cepa en aerobiosis frente a anaerobiosis (Figura 16). Lo que se consideraría un estado regulatorio normal (FX10) muestra en aerobiosis una sobreexpresión del proteasoma y del metabolismo del azufre, y una represión del metabolismo de los ácidos grasos y de la biosíntesis de esteroides. En el mutante  $\Delta\Delta Hxk2$  encontramos tanto sobreexpresión del proteasoma como represión de la biosíntesis de esteroides, pero no incremento del metabolismo del azufre ni represión del metabolismo de ácidos grasos en aerobiosis. En cuanto al mutante  $\Delta\Delta Reg1$  encontramos la misma regulación del proteasoma y de los esteroides, pero también una sobreexpresión del metabolismo del carbono (rutas de catabolismo de fuentes de carbono, de los ácidos oxocarboxílicos y del glioxilato) así como de la síntesis de aminoácidos (biosíntesis de aminoácidos y biosíntesis de tiamina, fenilalanina, tirosina y triptófano) y de síntesis proteica (enriquecimiento de ribosomas) (Figura 16), lo que parece ir en línea con lo que indican algunos genes regulados de forma contraria al parental. Esto parece indicar que el mutante  $\Delta\Delta Reg1$  en aerobiosis presenta un metabolismo más activo que en anaerobiosis, situación que no ocurre en FX10 ni en  $\Delta\Delta Hxk2$ . Sin embargo, hay que considerar que  $\Delta\Delta Reg1$  es la cepa que muestra una cinética más lenta de consumo de azúcares en condiciones aeróbicas, y la que más diferencia muestra con las condiciones anaeróbicas. Por lo tanto, se podría también interpretar este resultado como una consecuencia de comparar cultivos en diferentes estados metabólicos. Podría ser que tanto FX10 como  $\Delta\Delta Hxk2$  hubieran superado la fase más activa de crecimiento, mientras que  $\Delta\Delta Reg1$  estuviera todavía en ese punto, o incluso que el consumo más lento de azúcares por parte de  $\Delta\Delta Reg1$  se deba a un mayor rendimiento energético por una mayor tasa de respiración en aerobiosis que Fx10 y  $\Delta\Delta Hxk2$ .

### 3.4. Efecto de la inactivación del gen *HXK2*

Si se comparan los transcritos de  $\Delta\Delta Hxk2$  en aerobiosis con FX10 en aerobiosis solo se encuentra significancia estadística para 3 genes: *ADH7* y *DAK2* (alcohol deshidrogenasa y dihidroxiacetona kinasa) como sobreexpresados en el mutante, y el propio gen *HXK2* como reprimido en el mutante. Con el objetivo de explorar los datos con mayor profundidad se realizó un análisis GSEA que jerarquizara los



**Figura 16.** Enriquecimiento de rutas (análisis GSEA) de cada genotipo en condiciones de aerobiosis frente a anaerobiosis. FX10 (A),  $\Delta\Delta Hxk2$  (B) y  $\Delta\Delta Reg1$  (C)

transcritos, no solo por su significancia estadística, sino también con respecto al LFC mostrado. Sin embargo, el análisis generó categorías con una representación mínima de genes (<4 genes) por lo que los resultados no pudieron considerarse relevantes.

En el caso de  $\Delta\Delta Hxk2$  frente a FX10 en condiciones de anaerobiosis, la expresión diferencial estadísticamente significativa es aún más limitada, encontrándose tan solo la represión del propio gen *HXK2*. Si se realiza de nuevo un análisis GSEA (datos no mostrados) se encuentra una infrarrepresentación en el mutante de genes implicados en el catabolismo del azúcar, aunque de nuevo con un número mínimo de genes en cada categoría. Resulta llamativa, sin embargo, la represión que parece haber de los ribosomas, con 145 genes

reprimidos de los 166 que componen la categoría en la herramienta WebGestalt, que parece indicar que el mutante  $\Delta\Delta Hxk2$  en anaerobiosis tiene una represión mayor de la síntesis de proteínas que el parental FX10.

### 3.5. Efecto de la inactivación del gen *REG1*

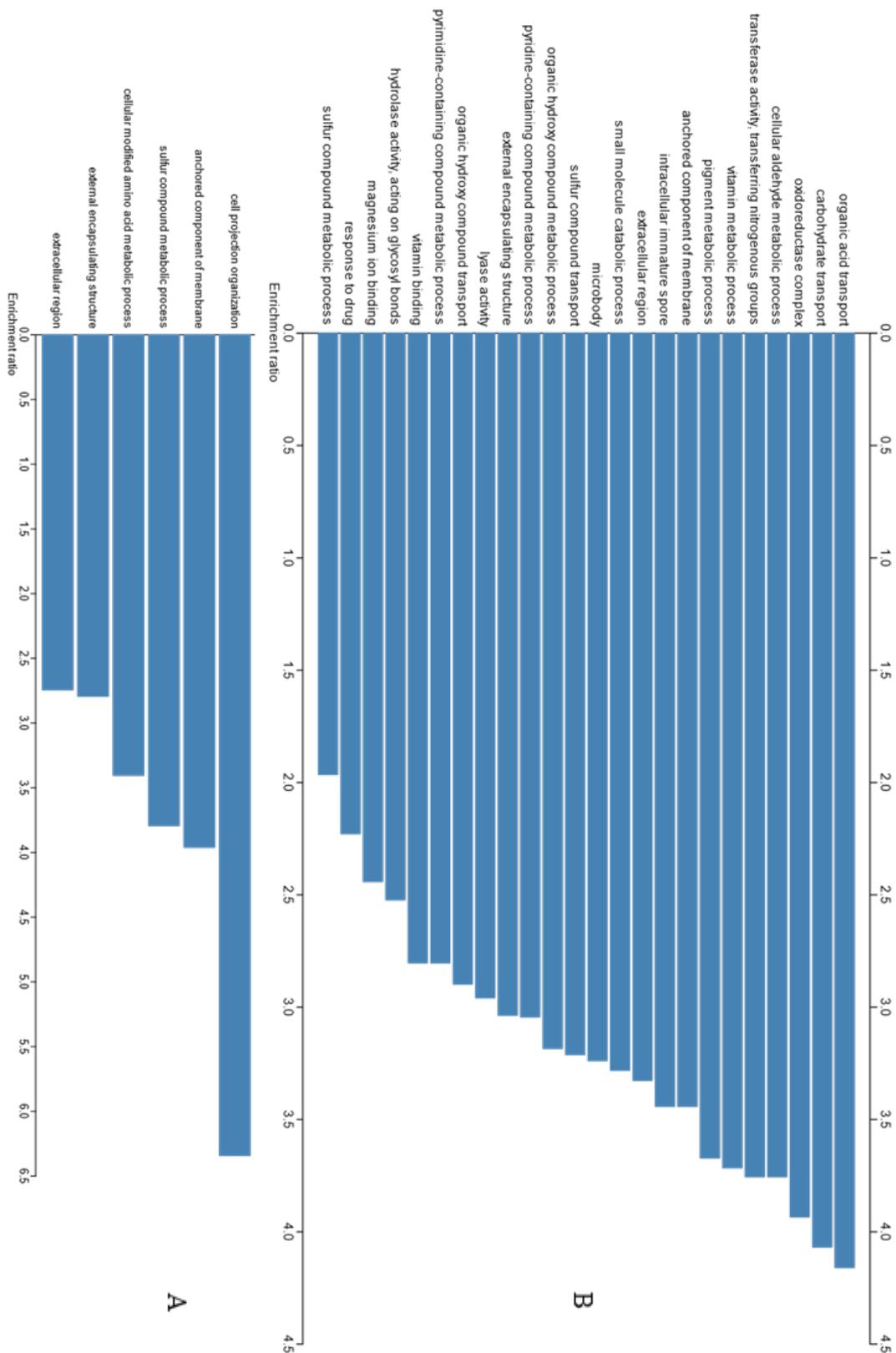
El mutante  $\Delta\Delta Reg1$  parece, según todos los análisis globales, el que presenta una regulación menos similar a la del parental FX10. De los 6017 genes analizados  $\Delta\Delta Reg1$  muestra una expresión estadísticamente significativa en 846 genes frente a FX10 en las mismas condiciones (aerobiosis), de los cuales 296 se encuentran reprimidos y 550 sobreexpresados. Sobre estos 846 genes diferenciales se realizó un análisis tipo ORA para determinar qué categorías funcionales (Figura 17) y rutas (Figura 18) se encuentran sobrerrepresentadas en ambas categorías. Si se atiende a la categoría funcional de los genes sobreexpresados en  $\Delta\Delta Reg1$  (Figura 17), se observa una sobrerrepresentación del transporte de ácidos orgánicos, componentes extracelulares y de encapsulación, metabolismo de vitaminas, metabolismo del aldehído y transporte de carbohidratos entre otras categorías. En cuanto a genes reprimidos encontramos categorías funcionales que en algunos casos solapan con las que encontramos en sobreexpresión, como el metabolismo de compuestos azufrados, o estructuras de encapsulación.

En cuanto al análisis ORA de rutas (Figura 18) encontramos que entre los genes sobreexpresados existe una sobrerrepresentación de gran variedad de rutas metabólicas, tales como el metabolismo del glioxilato y los ácidos 2-oxocarboxílicos, el metabolismo de ácidos grasos, de la glucólisis y el metabolismo del piruvato y del metabolismo de aminoácidos. Cabe destacar que también encontramos sobrerrepresentadas rutas relacionadas con el consumo de fuentes de carbono alternativas, lo cual deja de nuevo patente que, a diferencia de FX10,  $\Delta\Delta Reg1$  no presenta una represión por catabolito de carbono completa. Entre los genes reprimidos en  $\Delta\Delta Reg1$ , el análisis ORA indica una sobrerrepresentación del metabolismo del azufre y de cisteína/ metionina (Figura 18).

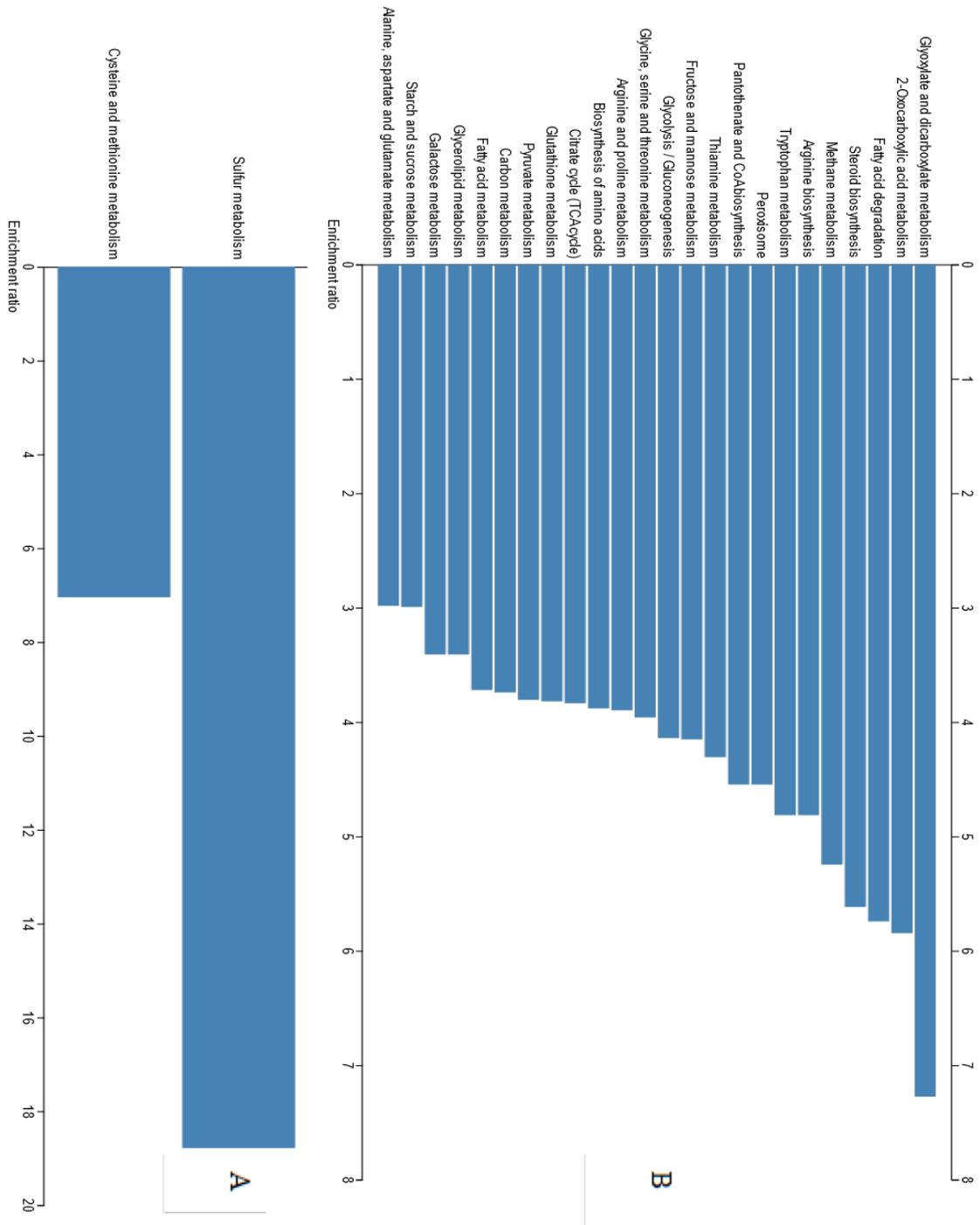
En cuanto al análisis GSEA se observa que  $\Delta\Delta Reg1$  presenta una sobreexpresión general del metabolismo del carbono, de nuevo encontrándose rutas que en el parental han de encontrarse mediadas por CCR. Además, se encuentra sobreexpresión del peroxisoma, de la biosíntesis de aminoácidos y de la meiosis, lo que, de nuevo, podría indicar que ambos cultivos, FX10 y  $\Delta\Delta Reg1$ , se encuentran en fases de crecimiento diferentes.

En el caso de condiciones de anaerobiosis,  $\Delta\Delta$ Reg1 muestra 519 genes diferencialmente expresados con respecto a FX10, 446 sobreexpresados y 113 reprimidos. De nuevo se llevaron a cabo análisis tipo ORA de categoría funcional y enriquecimiento de rutas. Las categorías funcionales y rutas representadas por genes en sobreexpresión no mostraron gran diferencia con respecto a las mostradas en condiciones de aerobiosis. En cuanto a las categorías de los genes reprimidos, aparece el metabolismo de purinas y pirimidinas (datos no mostrados).

En el análisis GSEA en anaerobiosis  $\Delta\Delta$ Reg1 muestra de nuevo una sobreexpresión de la meiosis, así como del metabolismo del carbono, incluyendo de nuevo fuentes de carbono reguladas por CCR. Por otro lado, presenta represión con respecto a FX10 de la biosíntesis de tRNA y ribosomas, así como del metabolismo de fosfolípidos y RNA polimerasa. De nuevo, esto parece indicar que el mutante  $\Delta\Delta$ Reg1 se encuentra en una fase distinta de crecimiento a FX10.



**Figura 17.** Análisis de sobrerrepresentación de categorías funcionales (análisis ORA) de los genes considerados reprimidos (A) y sobreexpresados (B) en  $\Delta\Delta$ Reg1 frente a FX10 en condiciones de aerobiosis.



**Figura 18.** Análisis de sobrerepresentación de rutas (análisis ORA) de los genes considerados reprimidos (A) y sobreexpresados (B) en  $\Delta\Delta$ Reg1 frente a FX10 en condiciones de aerobiosis.

### 3.6. Identificación de genes relevantes para la producción de ácido acético

En los análisis anteriores se observa cómo, mientras que el mutante  $\Delta\Delta\text{Hxk2}$  presenta escasa diferencia con el parental, el mutante  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  muestra una sobreexpresión del catabolismo de azúcares. Estos resultados, sin embargo, no nos permiten identificar con claridad la relación entre la CCR y la producción de ácido acético, ni explicar el distinto comportamiento de estos mutantes.

Con el objetivo de delimitar el análisis, se realizó una búsqueda de todos los genes implicados en rutas que contuvieran ácido acético como metabolito en la herramienta KEGG, obteniéndose una lista de 137 genes para una evaluación más detallada.

Como se ha comentado en la introducción general (Epígrafe 2.1), el proceso de glucólisis genera piruvato, que puede ser catabolizado mediante dos vías (Figura 1). En el metabolismo respiratorio el piruvato generará oxalacetato y acetil Coenzima A que ingresarán en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs para generar energía. En el metabolismo fermentativo el piruvato dará lugar a acetaldehído, y este a su vez etanol, para recuperar el coenzima  $\text{NAD}^+$ . Cuando existe una situación de exceso de glucosa en el medio, la célula se encuentra en una situación de sobreproducción de piruvato, lo que aumenta la formación de acetaldehído mediante el complejo piruvato descarboxilasa (*PDC1*, *PDC2*, *PDC5*, *PDC6*) frente a la formación de acetil-coA por el complejo piruvato deshidrogenasa (*PDA1*, *PDB1*, *LPD1*, *PDX1*, *LAT1*) (Figura 1). Como ya se ha explicado anteriormente, esto genera el llamado efecto Crabtree, por el cual, sin importar la existencia de oxígeno disponible, frente a cierta concentración umbral de azúcares *S. cerevisiae* tiende al metabolismo fermentativo (Epígrafe 3.2.2).

Debido al comportamiento tan opuesto de FX10 y  $\Delta\Delta\text{Hxk2}$  frente a  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  en cuanto a su producción de ácido acético cabría esperar algún cambio sustancial en el nivel de transcripción de los genes codificantes para la enzima piruvato descarboxilasa. Sin embargo, la transcripción de *PDC1* y *PDC2* no muestra significancia estadística para ninguna de las comparaciones realizadas (Figura 19). *PDC5*, en contra de lo que podría esperarse, se encuentra sobreexpresado en condiciones de aerobiosis frente a anaerobiosis para los tres genotipos ensayados. Sin embargo, si se compara su expresión,  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  presenta este gen reprimido con respecto a FX0 en aerobiosis (Figura 19). En el caso de *PDC6* se encuentra

Enzima	Gen	ID	Fx10 Aerobico (Vs AN)	Reg1 Aerobico (Vs AN)	Hxk2 Aerobico (Vs AN)	Hxk2 Aero (Vs Fx10)	Reg1 Aero (Vs Fx10)	Reg1 Aero (Vs Hxk2)	Reg1 AN (Vs fx10)	Hxk2 AN (Vs fx10)
Piruvato Carboxilasa	<i>PYC2</i>	YBR218C								
Piruvato Carboxilasa	<i>PYC1</i>	YGL062W								
Pir. Descarboxilasa	<i>PDC2</i>	YDR081C								
Pir. Descarboxilasa	<i>PDC6</i>	YGR087C								
Pir. Descarboxilasa	<i>PDC1</i>	YLR044C								
Pir. Descarboxilasa	<i>PDC5</i>	YLR134W								
Alcohol deshidrogenasa	<i>BDH2</i>	YAL061W								
Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH5</i>	YBR145W								
Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH7</i>	YCR105W								
Alcohol deshidrogenasa	<i>AAD3</i>	YCR107W								
Alcohol deshidrogenasa	<i>SFA1</i>	YDL168W								
Alcohol deshidrogenasa	<i>AAD4</i>	YDL243C								
Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH4</i>	YGL256W								
Alcohol deshidrogenasa	<i>AAD10</i>	YJR155W								
Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH3</i>	YMR083W								
Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH2</i>	YMR303C								
Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH6</i>	YMR318C								
Alcohol deshidrogenasa	<i>AAD14</i>	YNL331C								
Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH1</i>	YOL086C								
Alcohol deshidrogenasa	<i>AAD15</i>	YOL165C								
Alcohol deshidrogenasa		YPL088W								
Acetaldh. Deshidrogenasa	<i>ALD5</i>	YER073W								
Acetaldh. Deshidrogenasa	<i>ALD3</i>	YMR169C								
Acetaldh. Deshidrogenasa	<i>ALD2</i>	YMR170C								
Acetaldh. Deshidrogenasa	<i>ALD4</i>	YOR374W								
Acetaldh. Deshidrogenasa	<i>ALD6</i>	YPL061W								
Pirv. Deshidrogenasa	<i>PDB1</i>	YBR221C								
Pirv. Deshidrogenasa	<i>PDA1</i>	YER178W								
Pirv. Deshidrogenasa	<i>LPD1</i>	YFL018C								
Pirv. Deshidrogenasa	<i>PDX1</i>	YGR193C								
Pirv. Deshidrogenasa	<i>LAT1</i>	YNL071W								
AcetilCoA Sintetasa	<i>ACS1</i>	YAL054C								
AcetilCoA Sintetasa	<i>ACS2</i>	YLR153C								

**Figura 19.** Esquema representativo del estado de los genes codificantes para las principales enzimas implicadas en la fermentación en aerobiosis (Aero.) y anaerobiosis (AN). En blanco aquellos genes sin significancia estadística (FDR<0.05), en amarillo genes reprimidos (LFC<1), en azul genes sobreexpresados (LFC>1).

sobreexpresado en  $\Delta\Delta$ Reg1 en todos los casos.

Por su parte, en el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa solo la expresión del gen *LPD1* es significativa y tan solo en el caso de  $\Delta\Delta$ Reg1 frente a FX10 en condiciones de anaerobiosis, donde se encuentra sobreexpresado.

Si se observa el nivel de transcripción de otros genes principales para el metabolismo del ácido acético y la fermentación (Figura 19) se aprecian algunos fenómenos de interés: el gen *PYC1* (piruvato carboxilasa) parece encontrarse, reprimido en todos los genotipos en condiciones de aerobiosis frente anaerobiosis, pero, si se compara  $\Delta\Delta$ Reg1 con FX10 o  $\Delta\Delta$ Hxk2 en aerobiosis se encuentra sobreexpresado. *PDC6* (piruvato descarboxilasa) también se encuentra sobreexpresado en el mutante  $\Delta\Delta$ Reg1, así como todos los genes codificantes para la acetaldehído deshidrogenasa (a excepción de *ALD3*). En el caso de los genes codificantes para la alcohol deshidrogenasa el estado de  $\Delta\Delta$ Reg1 frente a los otros fenotipos no está claro (Figura 19). Por otro lado, se observa una sobreexpresión clara de los genes codificantes para la acetil-CoA sintetasa (*ACS1* y *ACS2*) en el mutante  $\Delta\Delta$ Reg1 con respecto a los otros dos genotipos.

Si se observan los datos en su conjunto, estos parecen sugerir que la menor producción de ácido acético en  $\Delta\Delta$ Reg1 podría deberse a una sobreexpresión de la acetil-CoA sintetasa, aliviando la producción de ácido acético

### **3.7. Evolución dirigida y comportamiento de las poblaciones evolucionadas**

Paralelamente al trabajo de transcriptómica se llevó a cabo un experimento con el objetivo de evaluar si la flexibilización de la CCR permite una bajada en la producción de ácido acético que, independientemente del parental de partida, pueda utilizarse como herramienta de mejora de forma general.

Se seleccionaron cuatro cepas enológicas, tres de ellas comercializadas como cultivos iniciadores (EC1118, T73 y FX10), y una obtenida en un pie de cuba espontáneo (IFI473). Por cada uno de los parentales se llevaron a cabo 3 evoluciones en paralelo (Figura S2.2).

Para llevar a cabo la evolución se utilizó un medio sencillo, basado en YPD, con galactosa (2% p/v) (YPGal) como única fuente de carbono, al que se le fue incorporando 2-desoxi-D-glucosa (2DG), un análogo no metabolizable de la glucosa, en concentraciones crecientes, conforme los cultivos se iban adaptando

a la presión de selección. Cada 72 h (aprox. 3 generaciones) se creaba un cuello de botella genético mediante la transferencia de un 10% del cultivo a medio fresco, generando así una selección artificial del genotipo más abundante en la población.

El objetivo por tanto era seleccionar aquellos organismos con mejor crecimiento, presumiblemente gracias a un mayor aprovechamiento de la fuente de carbono (galactosa), por presentar una CCR (desencadenada por la presencia del análogo de glucosa) menos rígida.

A medida que las poblaciones alcanzaban la fase estacionaria con mayor rapidez, por su adaptación a la presión de selección, se fue utilizando una mayor concentración de 2DG, desde una primera fase sin 2DG hasta alcanzar los 200 mg/L en los últimos subcultivos, incrementándose en intervalos de 50 mg/L.

Durante los primeros subcultivos de la evolución, FX10 resultó incapaz de superar la concentración mínima de 2DG (50 mg/L). Pese a que la evolución de este genotipo se intentó varias veces, finalmente esta cepa fue descartada. Por otro lado, una réplica de evolución de IFI473 se perdió al cabo de 4 subcultivos, por lo que la réplica Ev.1 fue dividida para dar lugar a una nueva Ev.2. Ambas poblaciones comparten tan solo las 7 primeras generaciones (de un total de ~150 de evolución) por lo que son tratadas como independientes.

Tras 150 generaciones la evolución se dio por concluida y se pasó a comprobar si se había conseguido el cambio fenotípico previsto y las poblaciones evolucionadas presentaban una flexibilización de la CCR. Para ello, se realizó un ensayo de crecimiento sobre distintas fuentes de carbono, en presencia tanto de 2DG como de otro análogo no metabolizable de la glucosa, la glucosamina (GA) (Figura 20). La GA ha sido utilizada en otros trabajos para la caracterización de la flexibilización de la CCR en cultivos de levadura y para la caracterización del elemento *prion-like* [GAR<sup>+</sup>] (Brown y Lindquist, 2009), que altera la CCR.

Como se esperaba ninguno de los análogos afectó al crecimiento sobre glucosa ni de parentales ni de poblaciones evolucionadas, mientras que el crecimiento en galactosa con presencia de 2DG (control de la evolución) fue claramente superior en las poblaciones evolucionadas, con un crecimiento similar al del medio control y ausencia total de crecimiento en los parentales (Figura 20). En presencia de GA se ve el mismo efecto, aunque en este caso los parentales son capaces de crecer algo más (Figura 20).

T73				IFI473				EC1118					
TC3	TC2	TC1	Wt	IC3	IC2	IC1	Wt	EC3	EC2	EC1	Wt		
6	4	4	5	5	6	5	6	5	5	5	5	Ctr	Glucosa
6	4	4	4	4	6	6	5	5	5	4	3	2DG	
5	4	4	3	4	5	4	5	4	4	5	4	GA	
6	5	5	5	6	6	6	6	3	6	5	5	Ctr	Galactosa
6	5	4	0	5	6	4	0	4	5	3	0	2DG	
5	5	5	2	5	6	6	2	5	5	5	2	GA	
5	4	5	4	5	6	6	6	5	5	4	5	Ctr	Maltosa
5	5	5	0	5	5	5	3	5	5	4	2	2DG	
5	4	5	3	5	5	6	5	4	5	4	4	GA	
6	4	5	5	6	6	6	6	5	4	5	6	Ctr	Rafinosa
6	4	5	0	3	4	4	0	4	5	1	0	2DG	
6	3	4	3	4	4	5	0	4	6	4	1	GA	
6	5	3	3	5	5	6	4	3	5	4	5	Ctr	Glicerol
4	3	3	0	0	0	0	0	4	3	0	0	2DG	
3	3	2	2	2	2	2	0	5	6	3	0	GA	
6	5	5	5	5	5	6	5	4	5	4	6	Ctr	Etanol
4	3	3	0	2	2	0	0	3	3	1	0	2DG	
2	2	2	2	4	4	0	0	5	6	3	0	GA	
4	3	5	4	6	4	5	5	5	4	5	5	Ctr	Ácido acético
3	3	4	2	2	2	2	3	4	3	3	2	2DG	
3	3	4	4	6	6	6	6	5	4	4	5	GA	

**Figura 20.** Ensayo de crecimiento por goteo sobre distintas fuentes de carbono. En las casillas se muestra la dilución máxima de cultivo a la cual se continuó observando crecimiento, desde la dilución máxima  $10^{-6}$  (en rojo oscuro) hasta la ausencia de crecimiento, 0 (en blanco). Los crecimientos fueron evaluados para cada una de las poblaciones por triplicado, tanto en el medio sin análogos (Ctrl) como bajo la presencia de 200 mg/L de 2-desoxi-D-glucosa (2DG) o de 200 mg/L de glucosamina (GA).

La similitud de los resultados obtenidos para el crecimiento de las poblaciones evolucionadas en presencia 2DG y GA es un claro indicio de que la evolución ha actuado sobre la regulación de la CCR, y no sobre la tolerancia a 2DG mediante algún mecanismo alternativo (Schmidt y O'Donnell, 2021), ya que ambos análogos bloquean la glicólisis por causas distintas y en reacciones diferentes.

En cuanto a otras fuentes de carbono, el crecimiento en rafinosa mostró un comportamiento semejante al presentado en galactosa, con un nulo crecimiento de los parentales y un crecimiento semejante al control para las poblaciones evolucionadas. El mismo efecto se observó para el crecimiento en maltosa, aunque en este caso los parentales, a excepción de T73, mostraron algo de crecimiento, aun así, claramente superado por las poblaciones evolucionadas (Figura 20).

También se probaron fuentes de carbono no fermentables, donde se obtuvieron resultados menos homogéneos: en el crecimiento en glicerol se vio de nuevo una mejora de las poblaciones evolucionadas en presencia de 2DG, pero no de forma tan clara como en los casos anteriores (Figura 20). En glicerol, IFI473 no es capaz de crecer en presencia de 2DG, ni el parental ni sus poblaciones derivadas, aunque estas sí son capaces de crecer en presencia de GA. Lo mismo ocurre con la población EC1 derivada de EC1118. En el caso del etanol, la presencia de 2DG parece afectar más severamente que en otras fuentes de carbono, aunque de nuevo las poblaciones evolucionadas consiguen un mejor crecimiento que el parental (Figura 20). En cuanto al crecimiento sobre ácido acético no parece haber diferencias claras entre los parentales y sus poblaciones derivadas en presencia de ninguno de los dos análogos.

Cabe destacar que el efecto de la 2DG es por lo general más severo que el de la GA. Además, si se observan los crecimientos en general de cepas y poblaciones, se pueden intuir ciertas diferencias, no solo entre los tres fondos genéticos, sino entre las poblaciones evolucionadas desde un mismo parental. Esto sugiere que, si bien la evolución ha afectado claramente a la CCR en todos los casos, ha podido hacerlo a través de mecanismos distintos para cada una de las réplicas de evolución.

Puesto que el objetivo final de la evolución era obtener cepas con un menor rendimiento en ácido acético bajo condiciones aeróbicas, las poblaciones evolucionadas fueron evaluadas por triplicado en mosto natural rosado bajo condiciones de aireación, tal y como se detalla en materiales y métodos.

Para evitar tanto el consumo de etanol, como el abrupto incremento de la producción de ácido acético, (comentado en el capítulo 1), ambos fenómenos que ocurren bajo aerobiosis y en ausencia de azúcares, las fermentaciones se mantuvieron durante tan solo 4 días (Figura 21 A, Tabla 3), quedando un 2% de azúcares residuales.

En estas fermentaciones todas las poblaciones evolucionadas presentaron un consumo de azúcares más lento que su parental, siendo las poblaciones derivadas de T73 las de menor diferencia (~95% de consumo frente al 98% del parental), mientras que la población 2 derivada de EC1118 (EC2) apenas llegó a consumir un 27% de azúcares tras 4 días de fermentación (Tabla 3, Figura 21). En cualquier caso, a excepción de EC2, la ligera reducción en consumo de las poblaciones evolucionadas no resulta preocupante.

**Tabla 3.** Principales parámetros de fermentación tras 4 días en mosto natural rosado de las poblaciones evolucionadas con respecto a los parámetros del parental (WT). Se muestra la media aritmética de los triplicados (promedio) y su desviación típica (ds), las letras indican la pertenencia a grupos estadísticamente distintos (p-valor <0.05).

	Azúcares consumidos (%)			R. Etanol (mg/g)			R. glicerol (mg/g)			R. Ácido acético (mg/g)		
	Promedio	±	Ds	Promedio	±	Ds	Promedio	±	Ds	Promedio	±	Ds
EC1118 WT	98.30	±	0.03 D	355	±	7	27.67	±	0.90	7.01	±	0.52 C
EC1	85.17	±	1.03 C	377	±	16	28.72	±	0.63	2.35	±	0.45 B
EC2	26.90	±	1.57 A	346	±	57	45.40	±	15.63	1.46	±	0.09 AB
EC3	75.74	±	1.16 B	362	±	34	41.51	±	1.99	1.25	±	0.08 A
IFI473 WT	98.54	±	0.14 D	325	±	2	31.65	±	0.73 A	2.19	±	0.17 C
IC1	89.91	±	1.55 C	381	±	46	43.94	±	3.43 B	0.93	±	0.14 A
IC2	82.99	±	0.65 B	365	±	51	47.07	±	3.03 B	1.26	±	0.04 AB
IC3	75.65	±	1.50 A	382	±	9	54.16	±	2.70 C	1.38	±	0.13 B
T73 WT	98.42	±	0.02 C	353	±	24	33.60	±	0.39 A	5.48	±	0.58 B
TC1	95.74	±	2.05 BC	382	±	45	37.98	±	0.70 B	2.68	±	0.39 A
TC2	95.31	±	1.12 B	395	±	25	37.97	±	0.32 B	2.53	±	0.30 A
TC3	92.17	±	0.04 A	412	±	2	39.26	±	0.28 C	2.07	±	0.01 A

En cuanto a la producción de ácido acético, todas las poblaciones evolucionadas muestran una considerable reducción del rendimiento, del 82% para las poblaciones derivadas de EC1118 (67% para EC1), del 55% para las derivadas de T73 y del 35% para las evolucionadas de IFI473 (55% para IC1) (Tabla 3). Cabe destacar que IFI473 presenta una producción de ácido acético muy baja de partida (2 mg/g).

Si atendemos a la producción de etanol, esta es muy similar tanto entre las poblaciones evolucionadas y sus parentales como entre los mismos parentales (Tabla 3). De nuevo apoyando la idea, ya comentada en el capítulo 1, de que la capacidad de producción de etanol presenta escasa variabilidad dentro de *S. cerevisiae*.

A diferencia de la producción de etanol, la producción de glicerol sí parece variar dependiendo de la cepa. En el caso de las poblaciones derivadas de EC1118 no hay diferencias significativas con respecto al parental, mientras que en las evolucionadas de T73 parece haber un ligero pero significativo aumento en la producción, y en el caso de las poblaciones derivadas de IFI473 se ve un claro aumento del rendimiento.

### 3.8. Tolerancia a estrés industrial de los clones evolucionados

Los resultados obtenidos con la fermentación de las poblaciones evolucionadas son prometedores y parecen indicar que efectivamente, puede lograrse una menor producción de ácido acético seleccionando organismos con una menor respuesta de represión por catabolito de carbono (CCR). Sin embargo, hay que tener en cuenta que una población es una mezcla de organismos con características distintas compitiendo entre sí, siendo potencialmente inestable y por tanto no garantizando la reproducibilidad que requieren los procesos industriales. Además, las evoluciones experimentales, como la presentada en este trabajo, suelen tener la desventaja de realizarse en condiciones de laboratorio estables y que, como en este caso, tienen poco que ver con el ambiente real del proceso donde se quiere emplear el organismo adaptado, pudiendo presentar “rasgos compensatorios” de la evolución (*trade-offs*), (Elena et al., 2003), que los hacen inadecuados para el proceso industrial para el cual fueron desarrollados, pese a su alta tasa de crecimiento en el ambiente de selección.

Las poblaciones obtenidas en este trabajo se mostraron capaces de llevar a cabo una fermentación en mosto natural y condiciones aeróbicas al menos durante 4 días. Con el objetivo de poder trabajar con clones genéticamente estables, en lugar de poblaciones heterogéneas, se aisló un clon por cada triplicado de fermentación (tres por cada población evolucionada) (aislados F, Figura S2.2) para su evaluación por triplicado frente a los principales factores de estrés en fermentaciones industriales, ya que la tolerancia a estos es clave a la hora de seleccionar cepas enológicas. Mediante un ensayo de crecimiento en medio sólido se evaluó su tolerancia a etanol (6% y 10% v/v), alta y baja temperatura (12 °C y 37 °C), estrés oxidativo (10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y sulfitado (120 mg/L de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), (Figura S2.4). En estos ensayos la mayoría de los aislados presentaron una alta tolerancia, siendo indistinguibles de su parental, con dos excepciones: un aislado de la población EC3 que mostró escaso crecimiento a 37 °C y los tres clones aislados de la población EC2.

A la vista de estos resultados se escogió un clon por cada población evolucionada para trabajar en un fenotipado más profundo. En el caso de la población EC2, debido a su escaso consumo de azúcares (Tabla 3, Figura 21) y la baja tolerancia a estrés de sus aislados (Figura S2.4) fue descartada, tomándose en su lugar dos clones de la población EC1 (EC1A y EC1C).

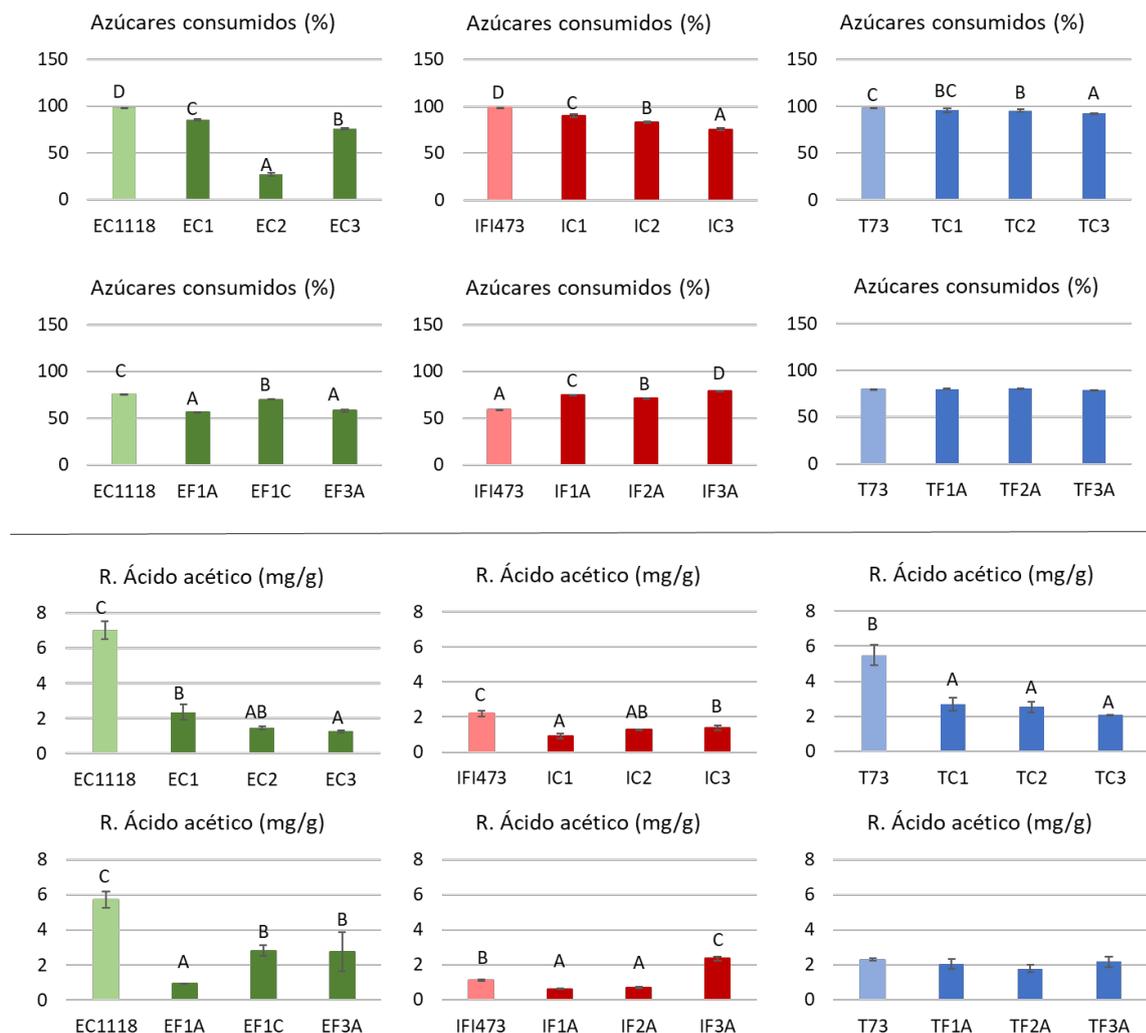
### 3.9. Fermentación en mosto natural de los clones seleccionados

Tras el aislamiento de clones procedentes del final de la fermentación se llevó a cabo una fermentación aerobia en mosto natural durante 4 días. Los resultados obtenidos con los clones difirieron de los obtenidos con la población global (Figura 21), especialmente en lo que respecta a la producción de ácido acético. En el caso de T73 ninguno de los tres clones seleccionados mostró diferencia estadística con respecto a su parental para ninguno de los parámetros analizados. En el caso de IFI743 si bien dos de los clones redujeron el rendimiento en ácido acético, el clon IF3A resultó ser superproductor. Por otro lado, los clones parecen consumir azúcares de forma más rápida que el parental, algo que no ocurría en las fermentaciones con las poblaciones evolucionadas. Los clones derivados de EC1118 se mostraron más prometedores, con una reducción clara del rendimiento en ácido acético en los tres aislados y en este caso, de nuevo, un consumo de azúcares algo más lento que el parental (Figura 21).

Estos clones fueron aislados a partir de la fermentación aerobia de la población evolucionada con el fin de que la fermentación actuara como una etapa adicional de selección para obtener aislados con una buena cinética de fermentación. Sin embargo, los resultados no fueron tan prometedores como cabría esperar (Figura 21), por lo que se realizó un segundo aislamiento, esta vez a partir de las últimas poblaciones obtenidas por evolución y conservadas criopreservadas, seleccionando además un mayor número de clones (5 por cada población evolucionada), (clones M, Figura S2.2), con la intención de abarcar una fracción mayor del paisaje evolutivo que rindiera una mejor cinética de fermentación de acuerdo con el objetivo de bajada del rendimiento de ácido acético. Este nuevo aislamiento se realizó tras dos subcultivos de las poblaciones evolucionadas en medio no selectivo (YPD) seguido de dos subcultivos bajo presión de selección (condiciones de evolución, YPGal +200 mg/L 2DG).

Estos nuevos aislados (clones M, Figura S2.2) fueron inoculados sobre mosto natural pasteurizado para realizar una nueva fermentación aerobia durante 4 días (Figura 22).

De los clones obtenidos del parental T73 solo uno, TM12 mostró una bajada significativa de la producción de ácido acético (Figura 22 C). Sin embargo, pese a la reducción del rendimiento con respecto al parental, este clon sigue produciendo una cantidad de acético excesiva para su aplicación en bodega.

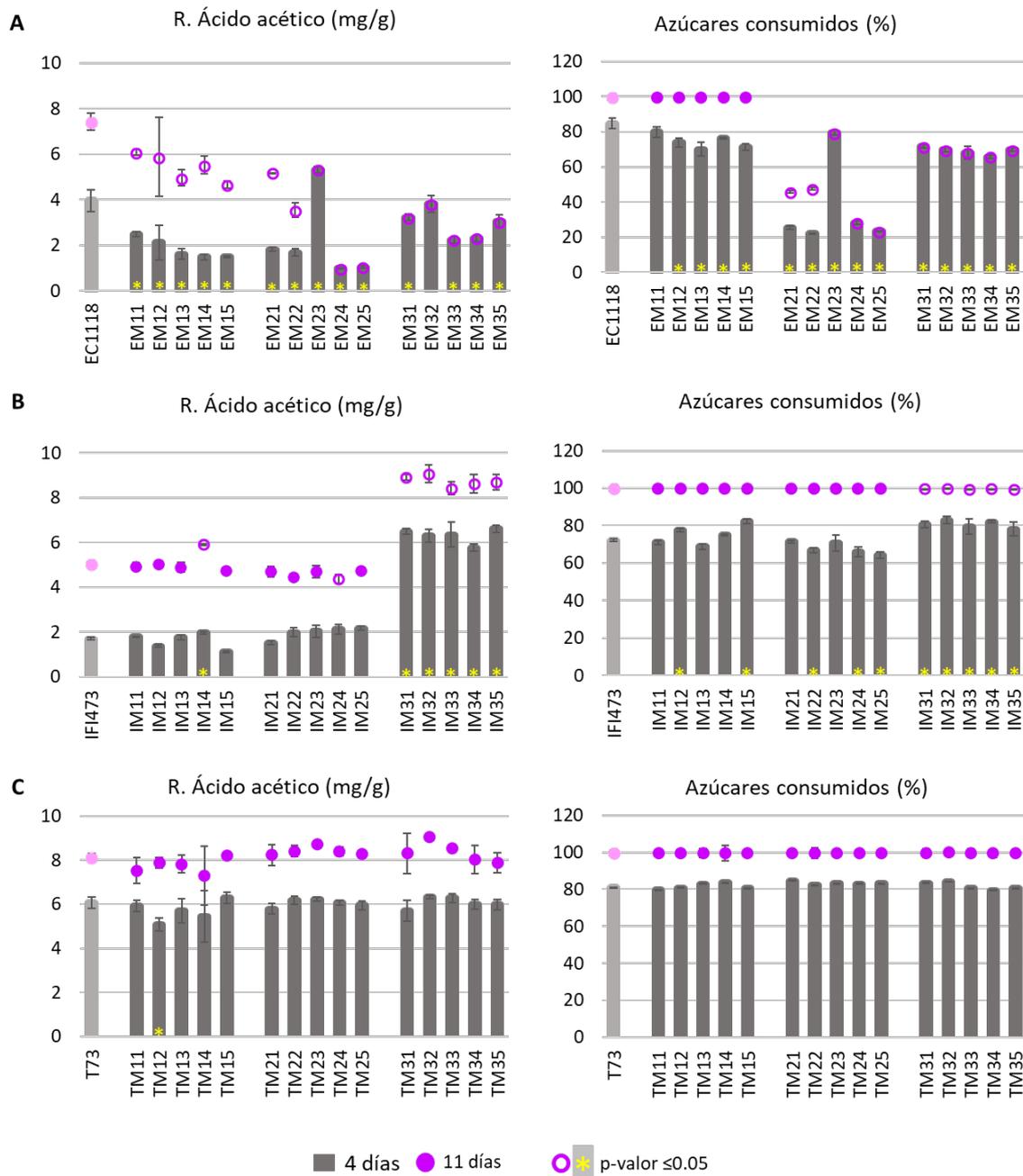


**Figura 21.** Consumo de azúcares y rendimiento en ácido acético tras 4 días de fermentación aerobia en mosto natural rosado de los aislados procedentes de cada población evolucionada (EC, IC, TC) y clones aislados tras la fermentación (EF, IF, TF). Las letras indican pertenencia al mismo grupo estadístico ( $p$ -valor  $< 0.05$ ).

Entre los derivados de IFI473 ninguno mostró una reducción de la producción de ácido acético, de hecho, todos los clones procedentes de la población IC3 prácticamente cuatuplican la producción del parental. Es de nuevo el genotipo EC1118 el más prometedor. Todos los aislados, excepto EM23 y EM32, muestran una considerable reducción del ácido acético. La mayoría produce menos de la mitad de la producción parental, (Figura 22).

El consumo de azúcares (Figura 22) es ligera, aunque significativamente menor en todos los clones, en especial para los aislados de EC2, que salvo EM23, apenas han consumido un 20% de los azúcares del mosto, estando la fermentación prácticamente parada. Esta grave disminución del consumo de azúcares no se

observa en los aislados de los otros dos genotipos. En los clones de IFI473 no parece existir una diferencia clara de consumos entre aislados y el parental, y en el caso de los clones de T73 no hay diferencia estadística en cuanto al consumo de azúcares para ninguno de los aislados.



**Figura 22.** Rendimiento en ácido acético y consumo de azúcares de los clones seleccionados desde cada población evolucionada de cada genotipo (paneles A, B y C), (clones M, Figura S2.2). Las barras indican el valor tras 4 días de fermentación, mientras que los círculos muestran el rendimiento tras 11 días. Los asteriscos y círculos sin relleno indican significancia estadística (p-valor  $< 0.05$ ).

Como se ha descrito en el capítulo 1, algunas cepas presentan un aumento brusco de la producción de ácido acético cuando existe un cambio de ambiente de condiciones aeróbicas a anaeróbicas (Tronchoni et al., 2022). Para dilucidar si los clones evolucionados presentaban este cambio metabólico en igual medida que sus parentales se decidió llevar a cabo un ensayo donde, tras 4 días de fermentación aeróbica, los cultivos se pasaban a un entorno anaeróbico durante otros 7 días, en un total de 11 días de fermentación (Figura 22).

Tras 7 días en anaerobiosis todos los parentales y la mayoría de aislados han consumido casi la totalidad de azúcares del mosto. Sin embargo, en EC1118 solo los aislados de la población EC1 consiguieron completar la fermentación. El resto parecen detener su consumo de azúcares tras el cambio a condiciones anaeróbicas. Los clones EM21 y EM22, aunque han consumido más azúcares a día 11 de lo que habían consumido a día 4, están muy lejos de una cinética aceptable, quedando aún la mitad de los azúcares del mosto sin consumir (Figura 22).

Tal y como se había visto anteriormente, al ocurrir un cambio en la disponibilidad de oxígeno, todos los parentales aumentan su producción de ácido acético (Figura 22). Este efecto se ve en todos los aislados evolucionados (salvo aquellos que presentan parada fermentativa). Sin embargo, los aislados de EC1118 pese al incremento causado por el cambio ambiental, presentan un rendimiento en ácido acético muy inferior al del parental (Figura 22).

### **3.10. Caracterización de los clones seleccionados de EC1118**

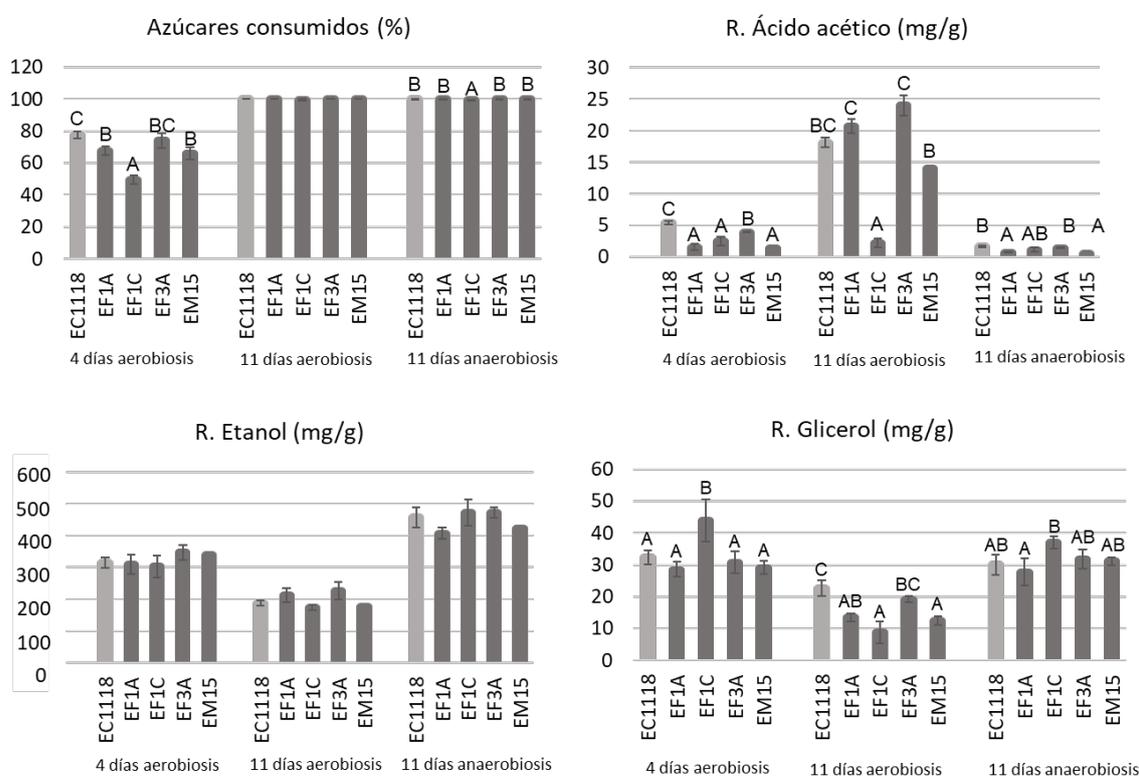
En función de estos resultados se seleccionaron 4 aislados de EC1118 para su caracterización más profunda, tres de ellos procedentes del cribado desde fermentación (EF1A, EF1B y EF3A) y uno seleccionado en este nuevo aislamiento, EM15 (Figura S2.2).

Hasta este momento los clones habían sido caracterizados durante una fermentación aerobia de 4 días, y en el caso del clon EM15 otros 7 días en anaerobiosis. Para caracterizar por completo el comportamiento de estos clones se llevó a cabo una fermentación completa (hasta el consumo total de azúcares) en condiciones tanto de aerobiosis continua como de anaerobiosis.

Los resultados tras 4 días de fermentación aerobia fueron consistentes con los obtenidos en las fermentaciones previas, mostrando un pequeño retraso en el

consumo de azúcares de los clones seleccionados con respecto al parental (Figura 23). Pese a ello, para el día 11 todos los clones habían terminado la fermentación.

Tal y como se esperaba, la producción de etanol es homogénea entre las cepas ensayadas y considerablemente menor bajo condiciones aerobias que en anaerobiosis (Quirós et al., 2014; Tronchoni et al., 2022). Lo que de nuevo confirma la capacidad de reducir el rendimiento en etanol a través de la respiración en fermentaciones sometidas a aireación. Cabe destacar que, puesto que las levaduras son capaces de utilizar el etanol como fuente de carbono en esas condiciones (Hagman et al., 2013), los datos de rendimiento de etanol a los 11 días de aerobiosis deberían considerarse como posiblemente subestimados.



**Figura 23.** Consumo de azúcares y rendimiento en ácido acético, etanol y glicerol tras 4 y 11 días de fermentación aerobia y anaerobia. Las letras indican pertenencia al mismo grupo estadístico ( $p$ -valor  $<0.05$ ).

En lo que respecta a la producción de ácido acético, tal y como se esperaba, ésta es menor en condiciones de anaerobiosis. En aerobiosis, y como se había visto hasta el momento, tras 4 días de fermentación el rendimiento en ácido acético es considerablemente menor en los aislados evolucionados que en el parental (Figura 23). Sin embargo, tras 11 días en aerobiosis el rendimiento en ácido acético

aumenta considerablemente. Como ya se ha discutido en el capítulo 1 esta subida ocurre cuando se ha agotado el azúcar del medio.

Se observa que este aumento en los clones EF1A y EF3A supera incluso al del parental, por lo que, pese a ser prometedores inicialmente, no podrían mantener una fermentación aerobia durante tiempos largos. Sorprendentemente, el aislado desde fermentación EF1C mantiene prácticamente el mismo rendimiento durante toda la fermentación aun cuando se han consumido los azúcares del mosto. Este clon muestra además el rendimiento en glicerol más alto tras 4 días de fermentación, para pasar a ser el de producción más baja a los 11 días (Figura 23).

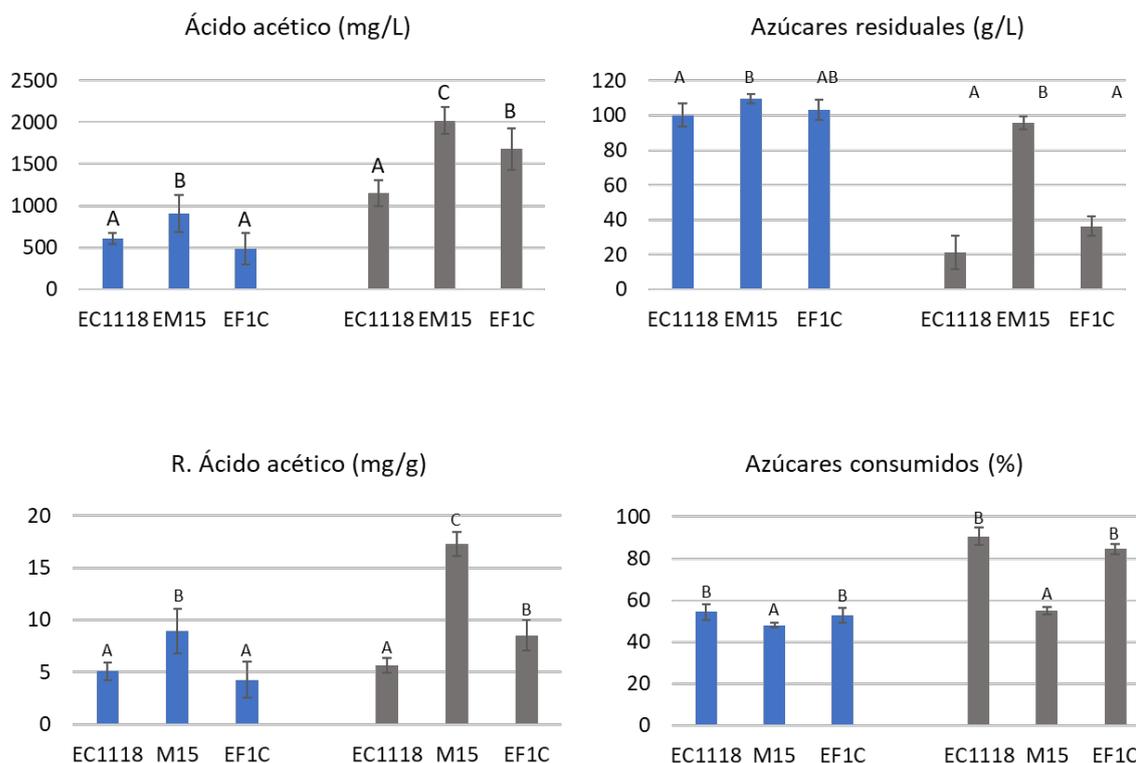
### **3.11. Crecimiento en biorreactor bajo condiciones aeróbicas**

En función de los resultados anteriores se seleccionaron dos aislados, procedentes de la misma población, pero seleccionados con diferentes criterios (con y sin proceso de fermentación, Figura S2.2), los clones EF1C y EM15, para ser caracterizados por triplicado en biorreactor bajo condiciones aerobias en mosto blanco natural.

El clon EM15 presentó una producción de ácido acético excesivamente alta desde el día 3, además de parada fermentativa, habiendo consumido tan solo el 40% de azúcares en día 6 (Figura 24). Ambos son obstáculos graves para su escalado industrial, por lo que este clon se descartó para cualquier optimización de condiciones.

El comportamiento de la cepa EF1C en biorreactor fue también inconsistente con lo visto anteriormente en matraz. Tras 3 días de fermentación la producción de ácido acético se situó en torno a 500 mg/L (Figura 24), llegando a más de 1.5 g/L el día 6. Como ya se comentó en el capítulo 1, el cambio entre sistemas de cultivo a menudo da lugar a cambios drásticos en la producción de ácido acético, debidos, muy probablemente, a la diferente disponibilidad de oxígeno en cada sistema de cultivo (matraz en agitación o biorreactor con inyección de aire). En el capítulo anterior se trabajó con diferentes regímenes de aireación que consiguieron una aceptable producción de ácido acético para la cepa ensayada. Sin embargo, en este caso la producción de ácido acético del clon EF1C es excesivamente alta ya desde el día 3, y aunque el experimento se repitió con el sistema de rampa de oxígeno disuelto mostrado en el capítulo anterior

(Tronchoni et al., 2022), no se consiguió reducir el rendimiento en ácido acético de este clon en biorreactor (datos no mostrados).



**Figura 24.** Consumo de azúcares y producción de ácido acético de los aislados F y M (Figura S2.2) de EC1118 tras 3 (azul) y 6 días (gris) de fermentación en aerobiosis

## 4. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo es doble, por un lado, determinar la causa de la relación entre una flexibilización del efecto CCR y una menor producción de ácido acético en condiciones de aerobiosis. Por otro, el desarrollo de una estrategia que permita, mediante evolución dirigida, obtener cepas no recombinantes que puedan ser utilizadas para la respiro-fermentación del mosto sin producir un exceso de acidez volátil.

Para el primer objetivo se realizó un análisis transcriptómico de dos mutantes por delección,  $\Delta\Delta$ Reg1 y  $\Delta\Delta$ Hxk2, obtenidos sobre un mismo fondo genético, FX10. Ambos mutantes presentan un comportamiento claramente diferenciado en cuanto a la producción de ácido acético en condiciones de aerobiosis, prácticamente nula en el caso de  $\Delta\Delta$ Reg1 (producción idéntica a la de anaerobiosis), y semejante o incluso mayor a la del parental en el caso de  $\Delta\Delta$ Hxk2.

El análisis transcriptómico muestra claramente una regulación diferente entre condiciones de aerobiosis y anaerobiosis para los tres genotipos (Figura 7), así como entre el mutante  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  y los otros dos genotipos.  $\Delta\Delta\text{Hxk2}$  parece presentar una regulación transcripcional muy semejante a la del parental según muestran los análisis, aunque presenta una curiosa represión de la biosíntesis de ribosomas en condiciones de anaerobiosis con respecto a FX10.

Si se comparan los transcriptomas en ambas condiciones, se observa que existe una represión de la síntesis de esteroides y una sobreexpresión del proteasoma en aerobiosis en todos los genotipos. En el caso del mutante  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  se aprecia una sobreexpresión general del catabolismo de azúcares y de la síntesis de proteínas. Esta activación general del metabolismo energético se mantiene cuando se compara el mutante  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  con el parental FX10 e incluso con  $\Delta\Delta\text{Hxk2}$ , mostrando que, tal y como se esperaba, este mutante presenta una mayor flexibilización de la CCR, algo que no parece mostrar el análisis del mutante  $\Delta\Delta\text{Hxk2}$ .

Pese a esta sobreexpresión generalizada del metabolismo,  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  presenta una cinética de fermentación más lenta que  $\Delta\Delta\text{Hxk2}$  y FX10, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Figura 13). Junto a la sobreexpresión de meiosis que muestra  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  con respecto al parental, esto podría indicar que los cultivos se encuentran en fases de crecimiento diferentes.

Como se ha comentado, la sobreproducción de ácido acético en condiciones de aerobiosis se puede deber al desequilibrio entre la formación de acetaldehído y de acetil-CoA por un exceso de piruvato dentro de la célula. El mutante  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  presenta sobreexpresión de *PDC6* (piruvato descarboxilasa) y ningún cambio de expresión en los genes codificantes para la piruvato deshidrogenasa. Esto último podría deberse a que la expresión del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, especialmente de *PDA1*, es constitutiva, y aunque la subunidad E3 (*LPD1*) parece estar sujeta a represión por CCR, sigue habiendo transcripción significativa en presencia de glucosa (Roy y Dawes, 1987) (Figura 19). Este mutante sí que presenta, sin embargo, sobreexpresión en *PYC1* (piruvato carboxilasa), *ACS1* y *ACS2* (acetil-CoA sintetasa) y los genes codificantes para la acetaldehído deshidrogenasa. Esta última enzima es la que cataliza la transformación de acetaldehído hacia ácido acético, por lo que su sobreexpresión en un genotipo de nula producción de ácido acético es sorprendente. Sin embargo, esto podría tener dos explicaciones. Por un lado, el número de transcritos de mRNA que presenta un gen, si bien está en relación no

significa, necesariamente, que exista una mayor biosíntesis de la proteína correspondiente. Existen distintos mecanismos de regulación postranscripcional que podrían justificar que una sobreexpresión de estos genes no implique una mayor actividad de la acetaldéido deshidrogenasa, siendo ésta una de las mayores limitaciones de este estudio. Otra explicación, no excluyente, sería que una mayor actividad piruvato carboxilasa y piruvato deshidrogenasa, podrían fomentar la transformación de piruvato a oxalacetato y acetil-CoA, reduciendo el desbordamiento de piruvato que da lugar a un aumento del ácido acético, que, por otro lado, y gracias a la sobreexpresión de acetil-CoA sintetasa, estaría siendo rápidamente convertido a acetil-CoA.

Si esta hipótesis resultara cierta, la reducción en la producción de ácido acético no se debería a un mantenimiento del equilibrio entre la piruvato descarboxilasa y la piruvato deshidrogenasa, sino a la sobreexpresión de las enzimas que permiten el *bypass* alternativo entre piruvato y Acetil-CoA (Pronk et al., 1996). Sin embargo, si bien es cierto que la expresión de *ACS1* está sujeta a CCR (van den Berg et al., 1996; Jong-Gubbels et al., 1997), otros trabajos indican que la sobreexpresión de *ACS1* y *ACS2* no producen, por sí solas, una reducción de la formación de ácido acético (Jong-Gubbels et al., 1998). Por tanto, la posible relación entre una menor represión por CCR y una menor producción de ácido acético sería la sobreexpresión del conjunto de enzimas que forman este *bypass*, y no tan solo de la actividad acetil-CoA sintetasa. Sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo no permiten asegurar la validez de esta hipótesis.

En cuanto al trabajo de evolución, los fenotipados presentados en este trabajo (Figura 20) muestran claramente una flexibilización de la CCR para todas las poblaciones, demostrando la efectividad de la evolución. La fermentación con las poblaciones evolucionadas (Tabla 3, Figura 21) muestra una producción de ácido acético mucho menor que la del parental en todos los casos, lo que, junto al comportamiento de algunos clones de EC1118, parece apoyar esta idea de que es posible utilizar la evolución dirigida como herramienta de selección para una menor producción de acidez volátil.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que este trabajo también señala las limitaciones de esta estrategia. Parece claro que existe una gran dependencia del fondo genético. Durante la evolución, la cepa FX10 no logró superar la presión de selección, quizá por una CCR más severa de partida. Mientras que solo uno de los 3 genotipos evolucionados muestra una mejora consistente, EC1118. En el caso de T73 parece que cualquier mejora obtenida, que puede apreciarse en la

fermentación de las poblaciones, se pierde rápidamente. Mientras que los clones de IFI473 muestran un aumento en la producción de ácido acético con respecto a un parental con una producción muy baja de partida, ofreciendo quizá una ventana de mejora muy reducida.

Cabe también destacar la diferencia de comportamiento encontrada entre las poblaciones evolucionadas y los clones aislados a partir de ellas. Tal y como se ha comentado, en un primer momento se consideró que el filtro que supone la fermentación podía haber generado una selección contraria al rasgo de interés (clones F, Figura S2.2). Sin embargo, cuando se obtuvieron clones a partir del final de evolución (clones M, Figura S2.2) los resultados obtenidos no fueron muy diferentes. Esto podría deberse, entre otras razones, a que el comportamiento mostrado por las poblaciones no se debe a un fenotipo mayoritario, sino que es una sinergia del comportamiento de distintos organismos y/o que el fenotipo de interés es inestable o fácilmente reemplazable, algo que quizá pudiera solventarse aumentando el tiempo de evolución.

Por otro lado, hay que considerar la importancia del número de réplicas del experimento de evolución y la relevancia de explorar la máxima fracción posible del paisaje evolutivo. Como puede apreciarse en el ensayo frente a fuentes de carbono (Figura 20) cada evolución muestra un comportamiento sensiblemente distinto al de otras poblaciones hermanas procedentes del mismo parental. Algo que queda subrayado en las fermentaciones de los clones M de EC1118 (Figura 22) donde los aislados de cada población muestran un comportamiento muy diferente entre sí. De nuevo, quizá, un mayor número de réplicas evolutivas hubiera aumentado las probabilidades de obtener clones válidos, especialmente desde los parentales T73 e IFI473.

Igualmente, parece claro que la evolución lleva obligatoriamente aparejada una adaptación al medio de evolución más allá de la búsqueda inicialmente. Por ejemplo, la mayoría de los clones M de EC1118 no son capaces de finalizar la fermentación en el experimento en condiciones mixtas (Figura 22), quizá porque no pueden crecer en anaerobiosis o porque no pueden superar la fase estacionaria (ya que las poblaciones se han mantenido durante la evolución prácticamente en fase exponencial).

En cualquier caso, el comportamiento de los aislados de EC1118, especialmente el de EF1C demuestra que la hipótesis es válida. Aunque la estrategia de evolución debe ser mejorada, así como la reproducibilidad de las

condiciones de aireación entre sistemas de cultivo, podemos concluir que es posible la obtención de cepas con una menor producción de ácido acético mediante la flexibilización de la CCR.

---

---

## CAPÍTULO 3

# Aplicación de cultivos mixtos para la reducción del grado alcohólico en condiciones simplificadas de aerobiosis

---

Correspondiente parcialmente al artículo publicado por Guindal, A.M., Morales, P., Tronchoni, J., Gonzalez, R., (2023). Reduction of ethanol content in wine with an improved combination of yeast strains and process conditions. Food Microbiol. 115:104344.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La reducción de la producción de etanol a través del metabolismo respiratorio de las levaduras puede abordarse desde al menos dos enfoques distintos: la aplicación de *S. cerevisiae* en fermentaciones aeróbicas, o el uso de otras especies de levaduras como cultivos iniciadores, explorando su capacidad respiratoria. Ambos enfoques tienen sus ventajas e inconvenientes.

Como ya se ha expuesto, el uso de *S. cerevisiae* conlleva un aumento en la producción de ácido acético que requiere de la selección de cepas muy específicas y condiciones de aireación controlables de forma automatizada. Por otro lado, el uso de especies fuera del género *Saccharomyces* presenta la dificultad de que estas especies son, por lo general, mucho menos competitivas en un ambiente industrial, lo que implica en muchos casos que no puedan completar totalmente el proceso de fermentación. Para evitar paradas de fermentación se ha propuesto el uso de co-cultivos, secuenciales o simultáneos, entre *S. cerevisiae* y cepas no-*Saccharomyces*.

La utilización de estos cultivos mixtos tiene su propia complejidad. *S. cerevisiae* tiene un elevado ritmo de consumo de azúcares y una gran tolerancia al etanol, que produce en altas concentraciones, lo que tiende a desplazar a la otra cepa de levadura, especialmente en condiciones de inoculación simultánea (Albergaria et al., 2010; Taillandier et al., 2014; Wang et al., 2015, 2016). Además, existe una competición por otros recursos como vitaminas y elementos traza (Taillandier et al., 2014; Maturano et al., 2015; Renault et al., 2015, 2016). El desarrollo de una estrategia de co-cultivo requiere de un trabajo exhaustivo de selección de cepas y optimización de proporciones de inoculación de forma que se obtenga una buena reducción del grado alcohólico y una fermentación completa.

Esta estrategia de co-cultivos ha sido explorada por varios autores con distintas especies de levaduras no-*Saccharomyces* (Gonzalez et al., 2013; Contreras et al., 2015; Rocker et al., 2016; Alonso-del-Real et al., 2017; Canonico et al., 2019). El éxito en el uso de estas especies para la reducción del rendimiento alcohólico depende, en gran medida, de unas condiciones de oxigenación finamente controladas, lo cual resulta muy difícil a nivel industrial.

En el caso de *S. cerevisiae* y como se ha descrito en capítulos anteriores, el principal inconveniente para su utilización en fermentaciones aeróbicas no es su

capacidad respiratoria, sino el exceso en la producción de ácido acético en presencia de oxígeno (Quirós et al., 2014; Curiel 2016). En el capítulo 1 se describe la identificación y caracterización de una cepa de *S. cerevisiae*, PR1018, que no presenta esta superproducción (Tronchoni et al., 2022), teniendo un gran potencial como cultivo iniciador. Sin embargo, su uso requiere igualmente de una fina regulación de la disponibilidad de oxígeno, ya que una vez interrumpida la aireación la cepa PR1018 produce un dramático aumento de la acidez volátil. Si, como se detalla en el capítulo 1, se lleva a cabo una reducción progresiva del oxígeno disuelto, este repunte de la producción de ácido acético no se produce. Sin embargo, el nivel de control sobre el flujo de aire que requiere esta aproximación supone un reto para el escalado industrial del proceso.

Por otro lado, la especie de levadura enológica *Metschnikowia pulcherrima* se ha seleccionado en otros trabajos para desarrollar una estrategia basada en su capacidad respiratoria bajo condiciones controladas de aireación (Morales et al., 2015; Tronchoni et al., 2018), ya que por lo general presenta rendimientos de etanol muy bajos en esas condiciones (Contreras et al., 2015; Barbosa et al., 2018). Algunas cepas de *M. pulcherrima* poseen la capacidad de respirar la totalidad de oxígeno suplementado, manteniendo los valores de oxígeno disuelto cerca del 0% desde el inicio de la fermentación (Quirós et al., 2014), lo que supone un entorno anaeróbico *de facto* para la inoculación de *S. cerevisiae*.

En este trabajo se presenta una estrategia que combina las ventajas de ambas aproximaciones. Se utiliza como iniciador la cepa de *S. cerevisiae* PR1018 (Tronchoni et al., 2022, Capítulo 1), que permite una fermentación aeróbica sin incremento en el ácido acético, junto a una cepa seleccionada de *M. pulcherrima*, que permite una gran reducción del rendimiento en etanol, al tener mayor capacidad respiratoria que *S. cerevisiae*. Además, el alto consumo de oxígeno por parte de *M. pulcherrima* facilita la transición desde un ambiente aerobio hacia una fermentación anaeróbica, de forma que PR1018 puede completar la fermentación sin un incremento repentino en la acidez volátil. Esto supone una mejora con respecto al trabajo anterior de Tronchoni et al., 2022 (Capítulo 1) al permitir realizar el proceso de fermentación aeróbica en un solo paso y sin necesidad de sofisticados sistemas de control de la aireación.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas y medios

En este trabajo se realizó un cribado de 15 cepas de *M. pulcherrima*, aislados naturales de La Rioja (España) pertenecientes a la colección del grupo de investigación. Además, se usaron dos cepas de *S. cerevisiae*, PR1018, cuya caracterización se ha mostrado en el capítulo 1 y en la publicación de Tronchoni et al., (2022) y la cepa enológica EC1118 (Lallemand Inc., Montreal, Canadá).

Las levaduras se sacaron de la colección, conservadas a -80 °C (20% glicerol) y se guardaron a 4 °C en placas de YPD sólido (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% agar). Se realizaron siempre precultivos durante 48 h a 25 °C en YPD líquido, tras lo cual el preinóculo era centrifugado, lavado y resuspendido en agua.

Para las fermentaciones se utilizó mosto natural blanco de la cosecha de 2019 (220 g/L azúcares, 186 mg/L nitrógeno asimilable, pH 3.45). El mosto se mantuvo congelado. Para cada experimento se descongeló el volumen necesario y se pasteurizó calentando en autoclave hasta los 105 °C, manteniendo esta temperatura menos de un minuto y dejando bajar la temperatura dentro del autoclave cerrado. En los casos indicados el medio se suplementó con 0.3 g/L de un producto comercial fuente de nitrógeno (Helper 100% Origin, Oenofrance, France) esterilizado por filtración (0.22 µm).

### 2.2. Experimentos de fermentación

Para la primera selección de cepas de *M. pulcherrima* se llevaron a cabo fermentaciones en matraz (100 mL volumen nominal) con 20 mL de mosto de uva reconstituido desde un concentrado comercial (manteniendo 200 g/L de azúcares). Los matraces se inocularon a una OD<sub>600</sub> de 0.2. Para permitir el intercambio de gases se utilizaron tapones GL25 ajustados parcialmente. Los cultivos se realizaron a 25 °C con agitación (180 rpm). Tras 4 días de fermentación se extrajeron muestras de 1 mL para su análisis por HPLC.

Para las fermentaciones en biorreactor se utilizaron los sistemas de Applikon MiniBio (250 mL volumen nominal) o DASGIP (400 mL volumen nominal) según se indique.

Los Applikon MiniBio se llenaron con 150 mL de mosto natural blanco pasteurizado y 200  $\mu$ L de antiespumante (Antifoam 204, Sigma-Aldrich, España). Los cultivos se realizaron a 25 °C y agitación de 1000 rpm. Se utilizaron entradas de aire comprimido a 10, 5 o 2.5 v/v/h (volumen gas/volumen cultivo/ hora) según se indique, a través de un difusor sumergido. Para los controles en condiciones anaeróbicas se inyectaron 10 v/v/h de nitrógeno durante el mismo periodo de aireación ensayada, para minimizar el impacto de la evaporación sobre las posibles diferencias en concentración de etanol.

Los biorreactores DASGIP se llenaron con 200 mL de mosto reconstituido y 200  $\mu$ L de antiespumante (Antifoam 204, Sigma-Aldrich, España), incubándose a 25 °C y 250 rpm.

En ambos sistemas de reactores el flujo de aire fue controlado mediante un controlador de flujo másico MFC17 (Aalborg Instruments and Controls, Inc., Orangeburg, NY, EEUU), cuya calibración es ajustada periódicamente con un flujímetro electrónico (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca, EEUU), mientras que el oxígeno disuelto fue monitorizado mediante los sensores Lumisens (Applikon). Cada biorreactor fue inoculado a una OD<sub>600</sub> final de 0.2 a partir de inóculos independientes. Durante el experimento se extrajo 1 mL de muestra, a los tiempos que se indican, para su análisis mediante HPLC, además de 10 mL para el análisis de compuestos volátiles al final de la incubación.

### **2.3.Determinación de la concentración de metabolitos**

Las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol, etanol y ácido acético se determinaron mediante HPLC de forma idéntica a lo descrito en el capítulo 1.

### **2.4.Seguimiento de la dinámica de la población**

Se realizó un recuento celular diario de los distintos ensayos con el objetivo de monitorizar la imposición de *S. cerevisiae*, de forma idéntica a la mostrada en la Figura S3.6. Para ello se realizaron diluciones desde una muestra de cultivo para su siembra en YPD sólido. Las placas se incubaron a 25 °C durante 48-72 h. La identificación de las cepas viables se determinó por diferencia de color entre *S. cerevisiae* (blanco) y *M. pulcherrima* (rosa) gracias a la secreción de pulcherrimina por parte de la segunda.

## 2.5. Análisis de compuestos volátiles

La composición volátil fue estudiada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), de forma idéntica al protocolo descrito en el capítulo 1.

## 2.6. Análisis de color

El análisis de color de los vinos producidos en este trabajo fue llevado a cabo mediante la determinación de los parámetros de color L\*, a\* y b\* de CIELab, de acuerdo con la OIV (Compendium of International methods of wine and must analysis, 2021). Para la determinación se utilizó un espectrofotómetro Agilent Cary60 UV-Vis conectado a un ordenador con el programa CaryWinUV versión 5.0.0.999.

## 2.7. Análisis estadístico

Tanto las concentraciones de metabolitos como los rendimientos obtenidos para cada uno de ellos, así como el análisis colorimétrico y la composición volátil, fueron comparadas mediante análisis de varianza de un factor. Además, se llevó a cabo una comparación de medias mediante test de Tukey. Todos los análisis estadísticos, incluyendo el análisis de componentes principales (PCA) se llevaron a cabo mediante el programa SPSS Statistics v.25 (IBM, Armonk, NY, EEUU).

# 3. RESULTADOS

## 3.1. Selección de cepas de *M. pulcherrima*

El primer paso para desarrollar una estrategia de fermentación aeróbica combinando *S. cerevisiae* y *M. pulcherrima*, fue la selección de una cepa de *M. pulcherrima* que mostrara una baja producción de ácido acético y un consumo de azúcar adecuado en condiciones de aerobiosis. Para ello se realizó un cribado de 15 aislados naturales de *M. pulcherrima* pertenecientes a la colección del grupo de investigación. Se realizó una fermentación aerobia en matraz durante 4 días, tras los cuales se valoraron los rendimientos de los principales metabolitos de interés (Tabla 4).

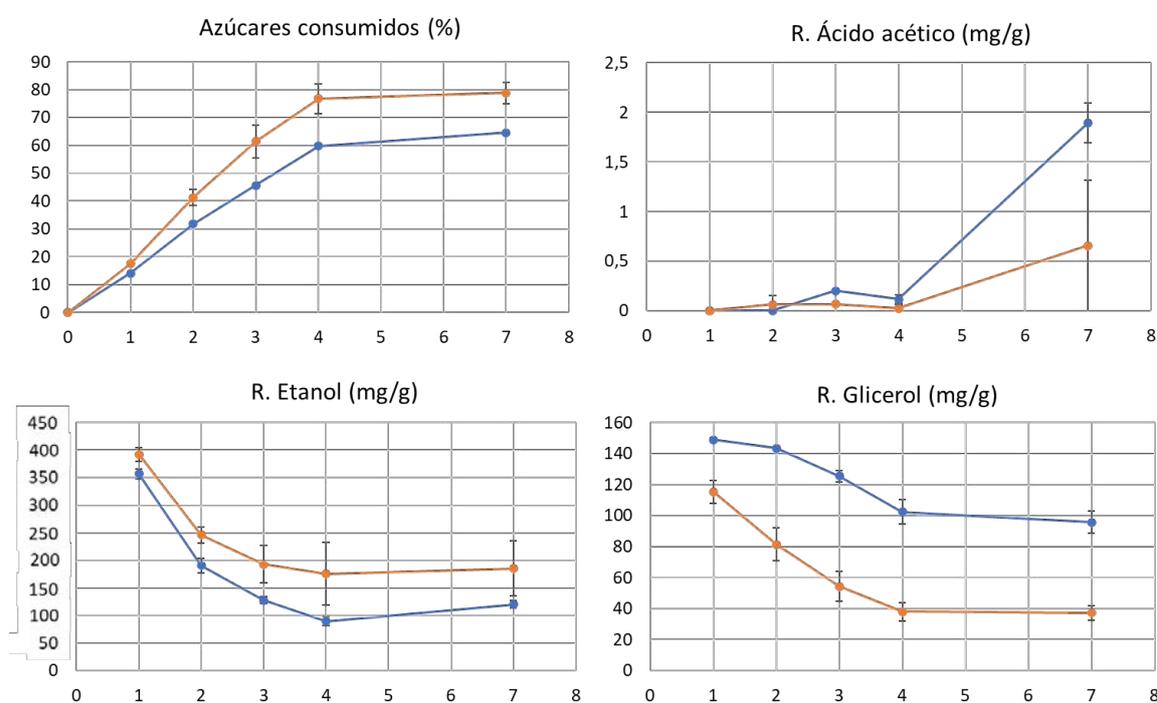
**Tabla 4.** Rendimiento (R) de los principales parámetros de fermentación tras 4 días de crecimiento aeróbico en mosto natural de las cepas de *Metschnikowia pulcherrima* evaluadas en este trabajo.

Cepa	R. Glicerol (mg/g)	R. Ácido acético (mg/g)	R. Etanol (mg/g)	Azúcares consumidos (g/L)
<b>Mp312</b>	23	2.30	342	209
<b>Mp395</b>	22	2.14	328	216
<b>Mp402</b>	38	0.79	262	166
<b>Mp411</b>	14	1.54	350	209
<b>Mp443</b>	21	2.06	335	219
<b>Mp704</b>	19	1.48	306	212
<b>Mp710</b>	19	2.95	349	201
<b>Mp734</b>	15	1.37	357	208
<b>Mp816</b>	20	2.54	351	210
<b>Mp969</b>	22	2.60	339	193
<b>Mp1050</b>	22	2.78	324	206
<b>Mp1104</b>	19	1.41	337	205
<b>Mp1297</b>	19	2.03	321	197
<b>Mp1305</b>	18	2.22	324	212
<b>Mp1333</b>	22	2.87	308	195

La mayoría de las cepas mostraron un consumo superior a los 200 g/L de azúcares durante esos 4 días, rindiendo menos de 360 mg/g de etanol, algo esperable y que corrobora lo observado en otros trabajos con *M. pulcherrima* en condiciones de aerobiosis (Morales et al., 2015). En cuanto a otros metabolitos de interés, los rendimientos de ácido acético se situaron entre los 0.8 mg/g y los 2.9 mg/g, estando la mayoría de cepas por encima de 1.4 mg/g. La producción de glicerol se situó entre los 14 mg/g y los 38 mg/g.

Se seleccionaron dos de las 15 cepas ensayadas para una caracterización más profunda en biorreactor, las cepas Mp704 y Mp734. Mp704 fue seleccionada por presentar el rendimiento en etanol más bajo (306 mg/g) y un buen ritmo de consumo de azúcares (212 g/L), mientras que Mp734, presentó los rendimientos en ácido acético más bajos del ensayo (1.37 mg/g) y de nuevo un buen consumo de azúcares (208 g/L). Otra cepa ensayada, Mp402 también presentó un excelente rendimiento en etanol (262 mg/g) y ácido acético (0.79 mg/g). Sin embargo, tuvo que ser descartada por su bajo consumo de azúcares (166 g/L en las condiciones del ensayo) más lento que las dos cepas finalmente seleccionadas.

Con las cepas seleccionadas, Mp704 y Mp734, se realizó una fermentación aeróbica durante 7 días en los biorreactores DASGIP (Figura 25). En estas condiciones ambas cepas detuvieron su consumo de azúcares tras el día 4, dejando respectivamente 60 g/L y 80 g/L de azúcares residuales. El rendimiento en etanol fue muy bajo en ambos casos, con 120 mg/g para Mp704 y 190 mg/g para Mp734. Con respecto a la producción de ácido acético, el rendimiento fue menor para Mp734 (0.65 mg/g) que para Mp704 (1.89 mg/g). Considerando su menor producción de ácido acético y su mayor consumo de azúcares, la cepa finalmente seleccionada para poner a punto el co-cultivo con *S. cerevisiae* fue la cepa Mp734.

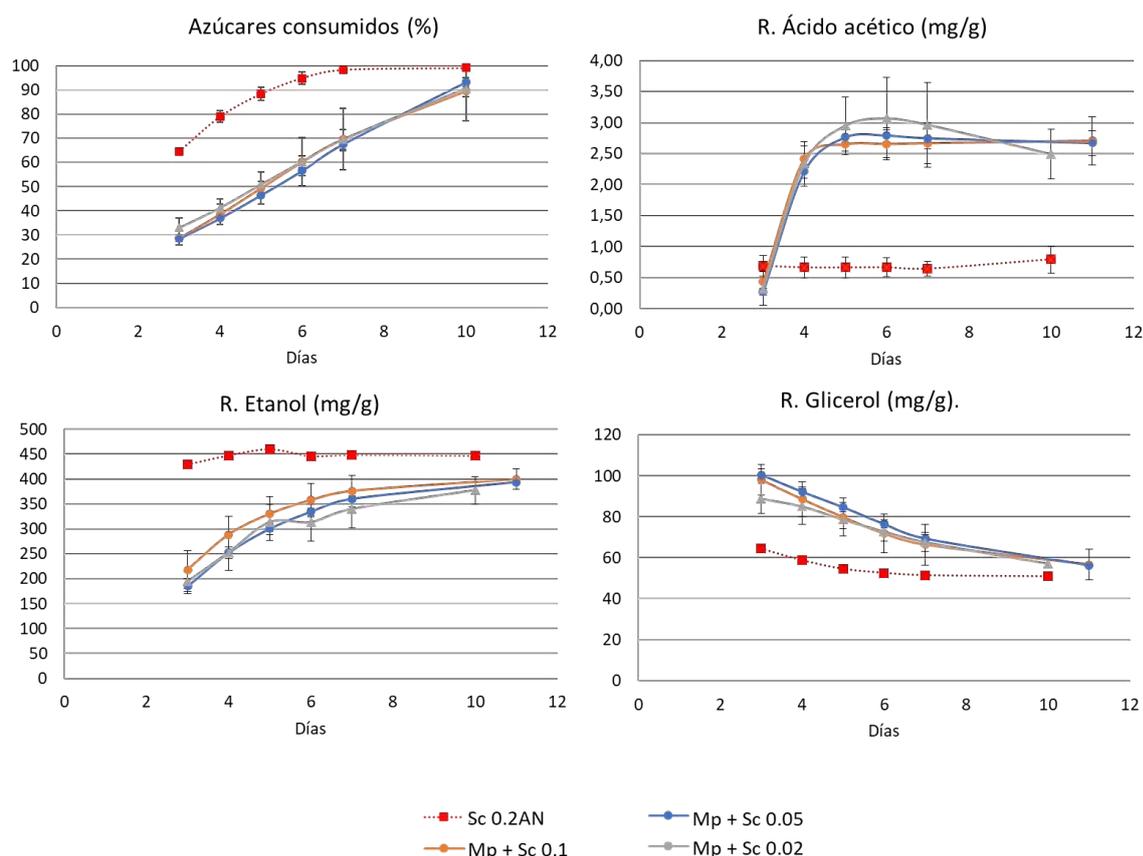


**Figura 25.** Evolución de los principales parámetros de fermentación de las dos cepas de *M. pulcherrima* seleccionadas, Mp704 (azul) y Mp734 (naranja). La fermentación se realizó por triplicado en aerobiosis durante 7 días.

### 3.2. Ajuste de las proporciones de cepas para co-inoculación

En este trabajo se prefirió trabajar con la co-inoculación en vez de con inoculaciones secuenciales, con el objetivo de simplificar el procedimiento en un futuro escalado industrial. Por ello, se evaluaron diferentes concentraciones de *S. cerevisiae* (0.02, 0.05, 0.1 OD<sub>600</sub>) junto a una concentración fija de *M. pulcherrima* (0.2 OD<sub>600</sub>). Cada combinación se ensayó por triplicado en biorreactores Applikon, en condiciones aeróbicas (inyección de 10 v/v/h de aire comprimido) durante 72

h, tras las cuales aireación y agitación fueron interrumpidas. Como ya se ha comentado anteriormente, el objetivo del cese de la aireación era conseguir la suficiente reducción de grado alcohólico mientras se evita un exceso de ácido acético. Los resultados de la fermentación se muestran en la Figura 26, junto con un control anaeróbico (*S. cerevisiae* 0.2 OD<sub>600</sub> con inyección de 10 v/v/h de nitrógeno durante 72 h).



**Figura 26.** Principales parámetros de fermentación de los co-cultivos evaluados, una concentración estable de *M. pulcherrima*, (0.2 OD<sub>600</sub>) junto a *S. cerevisiae* 0.1 OD<sub>600</sub> (naranja), 0.05 OD<sub>600</sub> (azul), 0.02 OD<sub>600</sub> (gris) en condiciones de aerobiosis 10 v/v/h. El control se efectuó con una concentración estándar de *S. cerevisiae* 0.2 OD<sub>600</sub> en condiciones de anaerobiosis (N<sub>2</sub> 10 v/v/h) (rojo). Los datos se corresponden al promedio de los triplicados y su desviación estándar.

En comparación con el control, todos los co-cultivos muestran una cinética de consumo de azúcar considerablemente más lenta y una mayor producción de ácido acético. La producción de glicerol es mayor en los co-cultivos aeróbicos durante la mayor parte de la fermentación, convergiendo con los niveles del control anaeróbico hacia el final del proceso.

Tras 10 días de fermentación, el azúcar residual se mantuvo relativamente alto en los co-cultivos (16-24 g/L) a diferencia del control (2 g/L), (Tabla 5). En

cualquier caso, no parecen existir grandes diferencias en ninguno de los parámetros observados entre las distintas proporciones de co-inoculación, por lo que se mantuvo la mayor concentración de *S. cerevisiae* (0.1 OD<sub>600</sub>) para el resto de los ensayos.

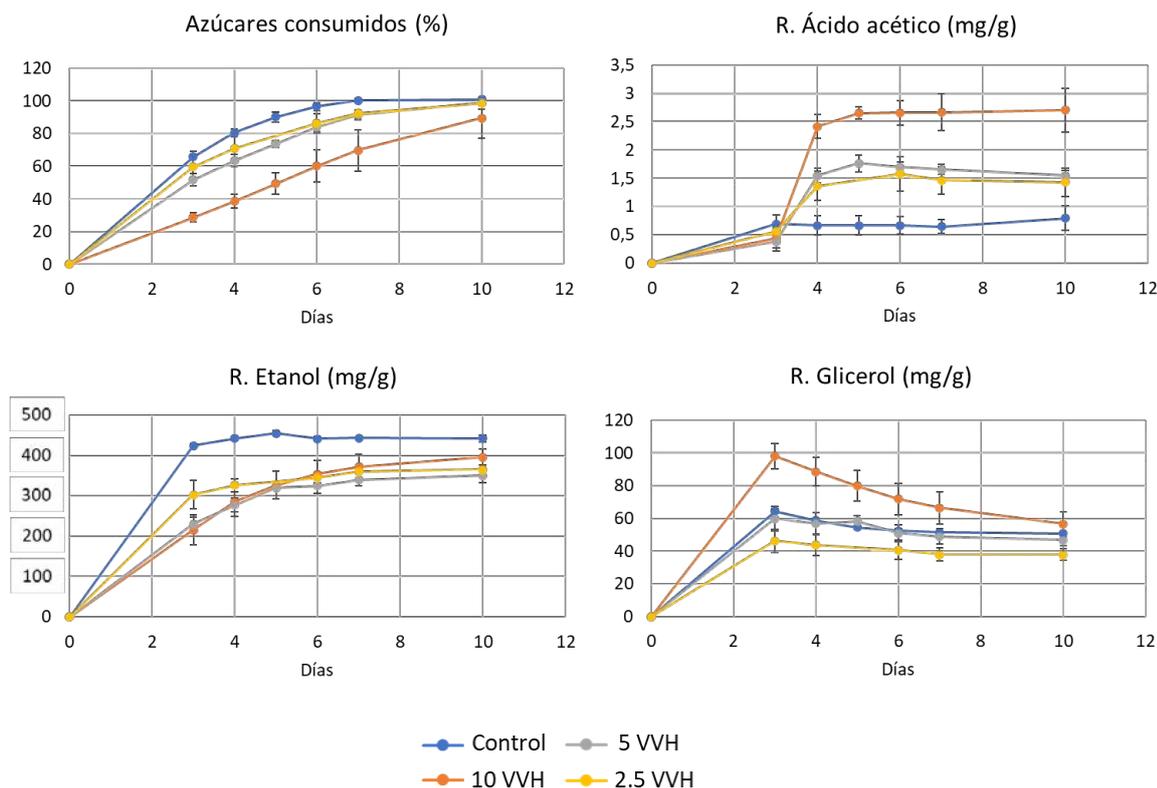
### 3.3. Optimización del régimen de aireación

Puesto que la aireación siempre conlleva un riesgo de oxidación de los componentes del mosto, en este trabajo se intentó reducir al máximo la entrada de aire, permitiendo, aun así la reducción deseada del grado alcohólico. Estas nuevas fermentaciones se llevaron a cabo con la proporción más alta de *S. cerevisiae* (0.1 OD<sub>600</sub>) y se evaluaron dos nuevos flujos de entrada de aire, 2.5 v/v/h y 5 v/v/h, en las mismas condiciones que en el ensayo anterior a 10 v/v/h.

En este nuevo experimento algunos aspectos del proceso mejoraron con la reducción del flujo de aire, presentando una cinética de fermentación más rápida, una menor producción de ácido acético y menor cantidad de azúcares residuales (Figura 27, Tabla 5). Además, la producción de etanol a 2.5 v/v/h y 5 v/v/h fue similar a la observada a 10 v/v/h.

### 3.4. Suplementación con fuentes de nitrógeno

Debido al crecimiento en aerobiosis y consiguiente generación de biomasa, es de esperar que ambas cepas consuman la totalidad de nitrógeno biodisponible en el mosto. Esto conduce a una cinética de fermentación más lenta en las fases finales de los co-cultivos aeróbicos descritos anteriormente. Para garantizar una población metabólicamente activa de *S. cerevisiae*, suficiente como para terminar con éxito la fermentación en las fases finales, se evaluó el efecto de la suplementación con fuentes de nitrógeno. Para esto se utilizó un suplemento enológico comercializado con este fin (ver materiales y métodos). Puesto que el objetivo es facilitar el crecimiento de *S. cerevisiae* hacia el final de fermentación, la suplementación se realizó una vez interrumpida la aireación, para evitar, en lo posible, su consumo por parte de *M. pulcherrima*.



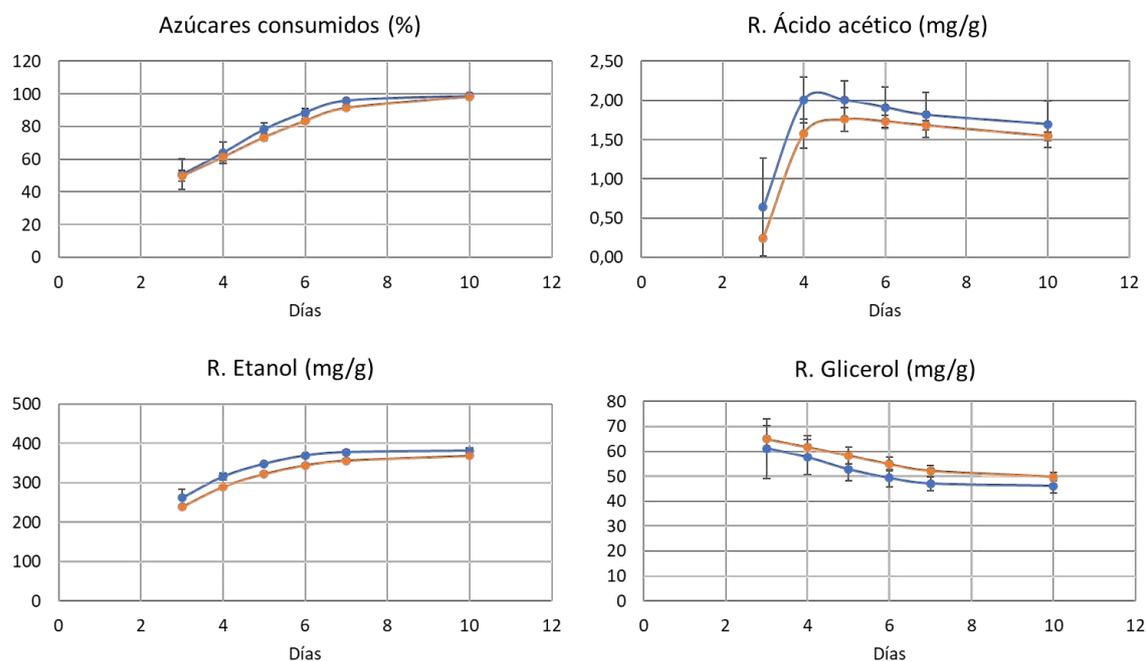
**Figura 27.** Evolución de los principales parámetros de fermentación en los regímenes de aireación evaluados, 10 v/v/h (naranja), 5v/v/h (gris), 2.5 v/v/h (amarillo) y condición control (Sc 0.2 OD<sub>600</sub> en anaerobiosis) (azul). La aireación y la agitación se interrumpieron a día 3. Los datos se corresponden al promedio de los triplicados y su desviación estándar.

**Tabla 5.** Principales parámetros al final de la fermentación en mosto natural en las distintas condiciones ensayadas de régimen de aireación, inóculo de *S. cerevisiae* y suplementación con nitrógeno (YAN) Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de las fermentaciones por triplicado.

<i>S. cerevisiae</i> (OD <sub>600</sub> )	v/v/h	YAN	Ácido acético (mg/L)	Etanol (% v/v)	Glicerol (g/L)	R. Etanol (mg/g)	R. Ácido acético (mg/g)	Azúcares residuales (g/L)
0.20	10 (N <sub>2</sub> )	-	185 ±51 A	13.0 ±0.3 B	11.80 ±0.1 B	440 ±10 C	0.80 ±0.22 A	2.10 ±0.20 A
0.02	10	-	529 ±81 C	10.10 ±1.1 A	12.20 ±0.6 B	370 ±30 AB	2.49 ±0.40 C	22 ±7.90
0.05	10	-	574 ±40 C	10.60 ±0.2 A	12.10 ±0.2 B	390 ±10 B	2.67 ±0.20 C	15.70 ±4.20
0.10	10	-	551 ±30 C	10.40 ±1.8 A	11.50 ±0.4 B	400 ±20 B	2.71 ±0.39 C	24.20 ±28.60
0.10	5	+	388 ±68 B	10.90 ±0.2 AB	10.50 ±0.6 B	380 ±10 AB	1.70 ±0.30 B	2.30 ±0.30
0.10	5	-	346 ±19 B	9.90 ±0.6 A	10.50 ±0.9 B	350 ±20 A	1.54 ±0.09 B	3.0 ±1.30
0.10	2.5	-	315 ±52 B	10.20 ±0.0 A	8.40 ±0.7 A	370 ±0 AB	1.43 ±0.25 AB	3.20 ±1.9

Como se muestra en la Figura 28, aunque el impacto de la suplementación es pequeño, se puede apreciar una mejora sutil en la cinética de fermentación y consumo de azúcares en los co-cultivos suplementados con respecto a los no suplementados. Sin embargo, esta mejora no es estadísticamente significativa (Tabla 5). Por otro lado, existe un claro impacto de la suplementación en la

composición volátil y en la cinética de la población, teniendo lugar una imposición más rápida de *S. cerevisiae* sobre *M. pulcherrima* en los cultivos suplementados (Figura S3.6).



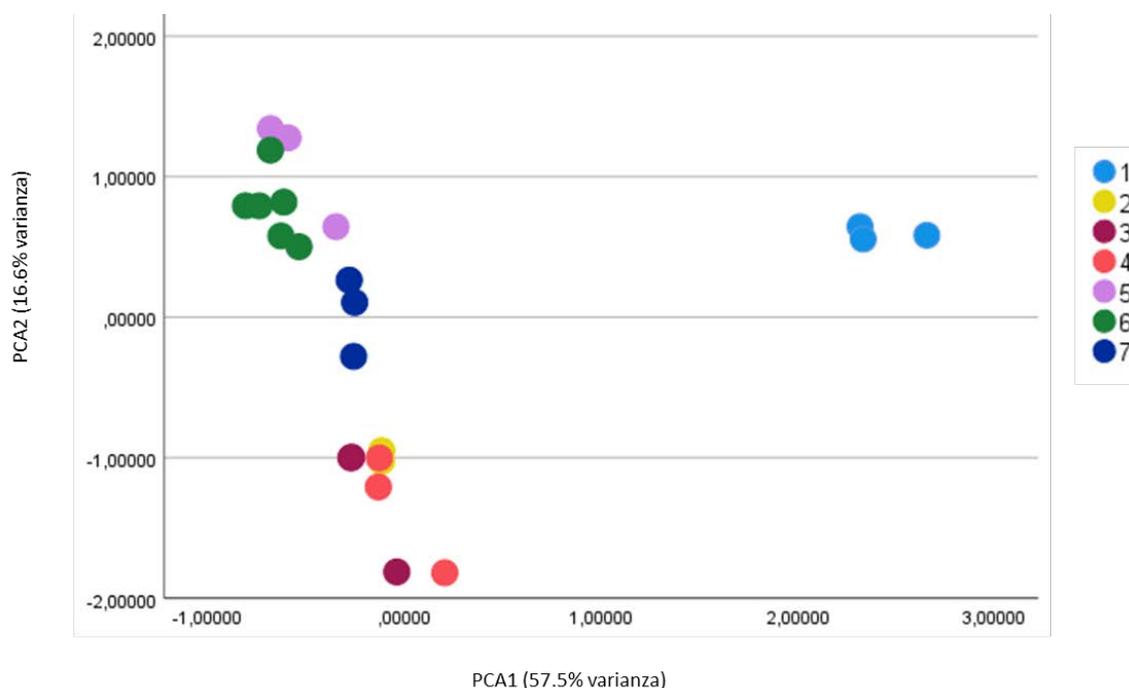
**Figura 28.** Evolución de los principales parámetros de fermentación con suplementación de fuentes de nitrógeno (azul) o sin suplementación (naranja). Los datos se corresponden al promedio de los triplicados y su desviación estándar.

### 3.5. Perfil de compuestos volátiles de los distintos ensayos de fermentación

Con el objetivo de evaluar el impacto de las diferentes estrategias ensayadas en este trabajo, se realizó un análisis del perfil de compuestos volátiles al final de la fermentación. Mediante análisis de cromatografía de gases-masas (GC-MS) se obtuvieron datos de concentración relativa de 54 compuestos volátiles.

Realizando un análisis de componentes principales (PCA), se aprecia claramente como los datos obtenidos de la fermentación control (cultivo puro de *S. cerevisiae* en condiciones anaeróbicas) se agrupan de manera separada al resto de co-cultivos aeróbicos en el eje PCA1 (Figura 29). Los principales responsables de esta diferenciación fueron los distintos contenidos en ésteres de etilo, isoamilo y otros ésteres, así como algunos ácidos grasos, terpenos (HO-trienol,  $\alpha$ -terpineol,

$\beta$ -citronelol) y ésteres de bajo peso molecular, como el acetato de etilo y el acetato de isoamilo (Figura 29, Figura S3.5). Las fermentaciones control mostraron los valores más altos de ésteres y los más bajos en terpenos.

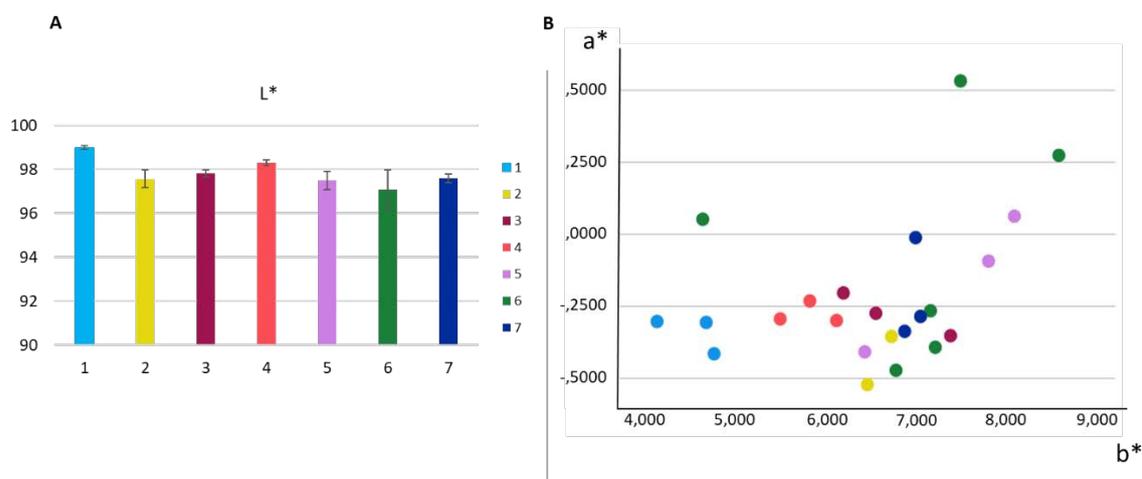


**Figura 29.** Análisis PCA de 54 compuestos volátiles identificados tras la fermentación. *M. pulcherrima* fue inoculada a una  $OD_{600}$  de 0.2 en todas las condiciones de aireación: **1)** fermentación control (*S. cerevisiae* 0.20  $OD_{600}$ , anaeróbico). **2)** *S. cerevisiae* 0.02  $OD_{600}$ , 10 v/v/h aire. **3)** *S. cerevisiae* 0.05  $OD_{600}$ , 10 v/v/h aire. **4)** *S. cerevisiae* 0.10  $OD_{600}$ , 10 v/v/h aire. **5)** *S. cerevisiae* 0.10  $OD_{600}$ , 5 v/v/h aire (suplementación con nitrógeno como se describe en el texto). **6)** *S. cerevisiae* 0.10  $OD_{600}$ , 5 v/v/h aire (sin suplementación). **7)** *S. cerevisiae* 0.10  $OD_{600}$ ; 2.5 v/v/h aire.

El resto de los co-cultivos aeróbicos ensayados quedan distribuidos a lo largo del eje PCA2, agrupándose según las condiciones de cultivo. Los compuestos volátiles de los cultivos aireados a 10 v/v/h forman un único grupo, independientemente de la proporción de inoculación de *S. cerevisiae*. Por otro lado, los experimentos aireados a 2.5 v/v/h y 5 v/v/h se sitúan ligeramente separados de los experimentos a 10 v/v/h (Figura 29), siendo una de las principales causas de esta diferenciación un mayor contenido en acetaldehídos y otros derivados (Figura S3.5). En cuanto a la suplementación con nutrientes nitrogenados, el análisis no muestra grandes diferencias entre los cultivos de la misma condición (5 v/v/h) (Figura 29). Sin embargo, algunos compuestos volátiles, como el acetaldehído y otras moléculas metabólicamente relacionadas, parecen estar enriquecidas en los co-cultivos suplementados con nitrógeno (Figura S3.5).

### 3.6. Impacto de las condiciones de fermentación sobre los parámetros de color

Para valorar el impacto sobre el color de las distintas condiciones ensayadas se realizó un análisis de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  del espacio de color CIELab (Figura 30). Los valores  $L^*$ , referidos a luminosidad, variaron entre el 97 y el 99, y tan solo uno de los vinos aireados mostró en este parámetro una diferencia significativa con respecto al vino fermentado en condiciones estándar (condición 6, *S. cerevisiae* 0.10 OD<sub>600</sub>, 5 v/v/h aire (sin suplementación), Figura 30). No se obtuvieron diferencias relevantes entre los ensayos para el parámetro  $a^*$  (eje verde-rojo), presentando valores entre -0.44 y -0.05. Por otro lado, en el parámetro  $b^*$  (eje azul-amarillo) se observó una ligera tendencia positiva (amarillo) en los ensayos aireados frente al control (Figura 30). El vino control mostró un valor de 4.62, mientras que los cultivos aireados fluctuaron entre 5.90 y 7.52, sin diferencias estadísticas entre sí.



**Figura 30.** Parámetros CIELab analizados al final de cada fermentación. *M. pulcherrima* fue inoculada a una OD<sub>600</sub> de 0.2 en todas las condiciones de aireación: **1)** control (*S. cerevisiae* 0.20 OD<sub>600</sub>, anaeróbico). **2)** *S. cerevisiae* 0.02 OD<sub>600</sub>; 10 v/v/h aire. **3)** *S. cerevisiae* 0.05 OD<sub>600</sub>; 10 v/v/h aire. **4)** *S. cerevisiae* 0.10 OD<sub>600</sub>; 10 v/v/h aire. **5)** *S. cerevisiae* 0.10 OD<sub>600</sub>; 5 v/v/h aire (suplementación con nitrógeno). **6)** *S. cerevisiae* 0.10 OD<sub>600</sub>; 5 v/v/h aire (sin suplementación). **7)** *S. cerevisiae* 0.10 OD<sub>600</sub>; 2.5 v/v/h aire. **A:** Valores  $L^*$  (luminosidad) mostrados como el promedio de los triplicados  $\pm$  su desviación estándar. **B:** Muestras en función de los planos definidos por los valores  $a^*$  (eje verde-rojo) y  $b^*$  (eje azul-amarillo) siguiendo la leyenda de color del panel A.

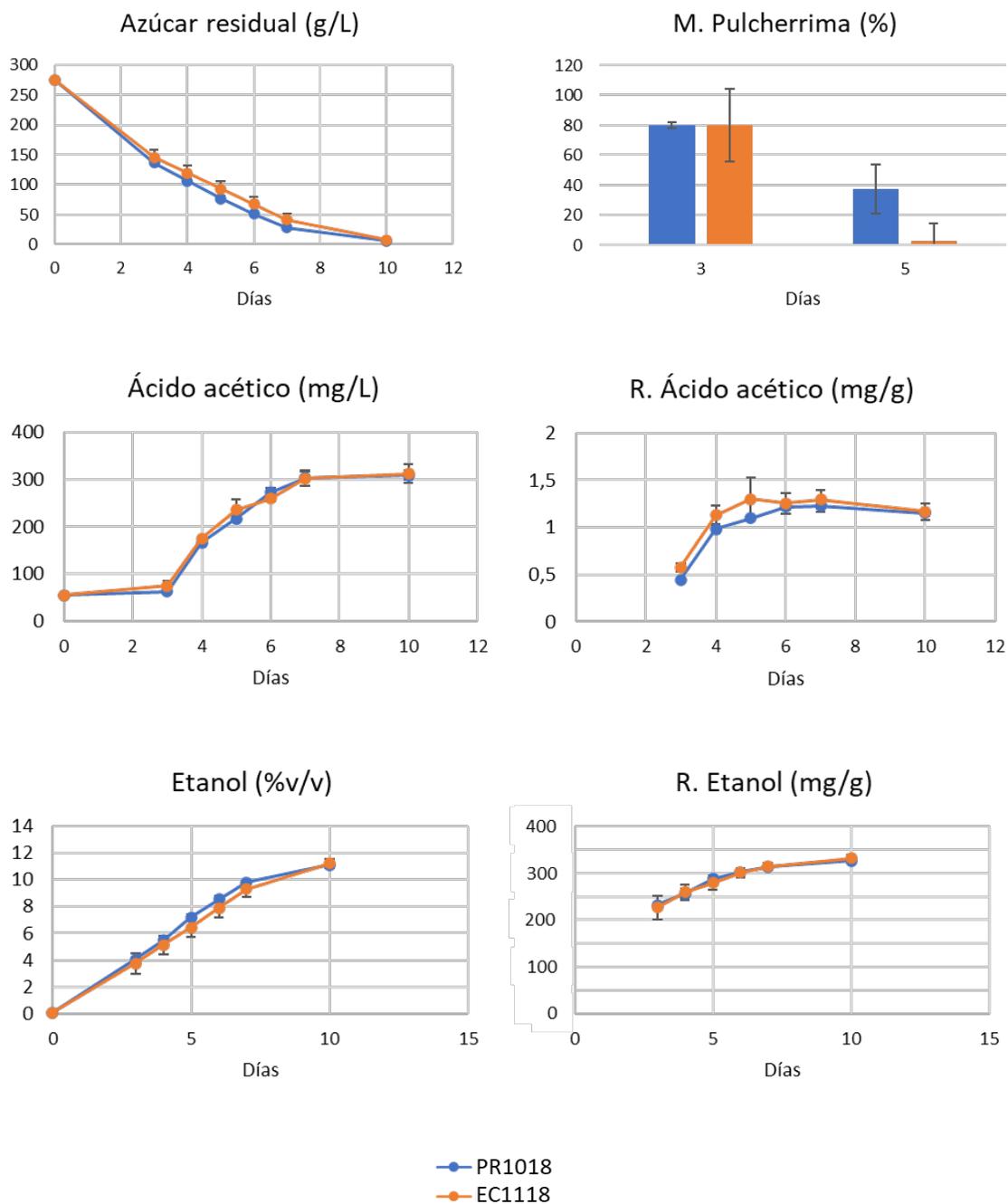
### 3.7. Validez de la estrategia de co-cultivo con cepas estándar de *S.*

#### *cerevisiae*

Los resultados mostrados en este capítulo sugieren que el consumo de oxígeno por parte de *M. pulcherrima* es el aspecto clave que logra reducir la producción de ácido acético previamente identificada en *S. cerevisiae* cuando esta sufre un cambio de condiciones aeróbicas a anaeróbicas. Sin embargo, en este trabajo se muestran fermentaciones con una cepa muy concreta de *S. cerevisiae*, PR1018, (capítulo 1). Para probar si el consumo de oxígeno de *M. pulcherrima* permite “amortiguar” de manera general las condiciones de aerobiosis, y por tanto, lograr una menor producción de ácido acético por parte de cualquier cepa de *S. cerevisiae*, se llevaron a cabo fermentaciones en paralelo de *M. pulcherrima* en co-inoculación tanto con PR1018 como con la cepa enológica estándar EC1118, (Figura 31).

En ambos co-cultivos la proporción de *M. pulcherrima* se situó cerca del 80% de células viables en el momento de cambio hacia condiciones de anaerobiosis (Figura 31). La cinética de consumo de azúcares, rendimiento en etanol y rendimiento en ácido acético fue prácticamente idéntica para ambas cepas de *S. cerevisiae* (Figura 31).

Estos resultados parecen confirmar que las condiciones optimizadas en este trabajo son también aplicables a otras cepas de *S. cerevisiae* para la reducción de la producción de alcohol bajo condiciones aeróbicas.



**Figura 31.** Principales parámetros de fermentación y porcentaje de células viables de *M. pulcherrima* ( $0.2 OD_{600}$ ) tras 10 días de fermentación en co-inoculación con PR1018 (azul) y EC1118 (naranja) a una  $0.1 OD_{600}$ .

## 4. DISCUSIÓN

Como se ha ido desarrollando en los anteriores capítulos, este trabajo explora la idea de reducir el rendimiento alcohólico mediante el consumo de azúcares por respiración, a través de un proceso en dos fases, un paso inicial de aireación para la reducción del rendimiento alcohólico y una segunda fase anaeróbica que garantice el consumo total de los azúcares.

En otros trabajos del grupo se ha explorado la viabilidad de esta estrategia usando tanto cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* con menor producción de ácido acético en condiciones aeróbicas (en esta misma tesis, Capítulos 1 y 2), como mediante cultivos iniciadores de especies no-*Saccharomyces* (Quirós et al., 2014; Morales et al., 2015). En ambas estrategias se hace necesaria una regulación precisa de la aireación para evitar un exceso de acidez volátil.

Como se ha mostrado en el capítulo 1 (Tronchoni et al., 2022) la cepa PR1018 de *S. cerevisiae* tiene un bajísimo rendimiento en ácido acético. Sin embargo, frente a un cambio abrupto en el régimen de aireación (necesario para una segunda fase anaeróbica de la fermentación) genera un aumento exacerbado de ácido acético. Para solventar este aumento se ha desarrollado una estrategia de aireación automatizada y programable en función de la disponibilidad de oxígeno disuelto en el mosto, tal y como se detalla en el capítulo 1. Sin embargo, el control continuo del oxígeno disuelto de los tanques de fermentación supone un problema a la hora de implementar esta estrategia en la industria.

En este capítulo se ha combinado la gran capacidad respiratoria de *M. pulcherrima* con la cepa de *S. cerevisiae* PR1018, permitiendo soslayar la necesidad de un control exhaustivo de la disponibilidad de oxígeno durante la fermentación, al minimizar el impacto de una interrupción abrupta de la aireación. Este bajo impacto del cambio ambiental se debe probablemente a dos factores: la baja proporción de *S. cerevisiae* en el momento del corte de la aireación y la gran capacidad respiratoria de *M. pulcherrima*, que tamponaría el efecto del oxígeno sobre el metabolismo de *S. cerevisiae*.

Los ensayos de optimización en este trabajo muestran que el sistema de co-cultivo es muy robusto. Se ve poco afectado por las concentraciones de partida de *S. cerevisiae* e incluso por la cepa seleccionada. Tampoco muestra cambios frente a los distintos caudales de aire ensayados, e incluso frente a suplementación con nitrógeno asimilable.

En cuanto al análisis de compuestos volátiles, el final de las fermentaciones muestra una composición similar entre los distintos procedimientos ensayados y diferente de una fermentación en condiciones estándar. El uso de la aireación y la combinación con *M. pulcherrima* da lugar a una reducción en la producción de varios ésteres de etilo y ésteres de acetato, así como un aumento en algunos compuestos terpénicos. El aumento de estos compuestos en las fermentaciones inoculadas con *M. pulcherrima* está de acuerdo con lo descrito por otros autores (Tufariello et al., 2021) en relación con la aportación de esta especie a la composición aromática del vino. La reducción general del contenido en ésteres de las muestras producidas en aerobiosis puede estar relacionada con los cambios metabólicos que sufre *S. cerevisiae* en esta condición. La pérdida por evaporación no parece explicar este resultado, ya que las muestras anaeróbicas se obtuvieron bajo un caudal de nitrógeno idéntico al máximo ensayado con aire (10 v/v/h), lo que igualaría las eventuales pérdidas. Sin embargo, estos cambios en el perfil de compuestos volátiles (ganancia en compuestos terpénicos y pérdida de algunos ésteres) solo se encuentran en los vinos producidos bajo condiciones aeróbicas. En cuanto a la suplementación con nitrógeno ensayada, parece producir un impacto global y moderado sobre la composición volátil, en especial sobre el acetaldehído y sus derivados metabólicos.

En lo referido a los parámetros de color, se observa una tendencia sutil en los vinos aireados (co-inoculados con *M. pulcherrima*) hacia colores más oscuros y amarillos, en comparación con el vino control (anaeróbico y sin *M. pulcherrima*). En cualquier caso, los parámetros de color obtenidos en todos los experimentos entran dentro de la coloración normal de los vinos blancos comerciales, siendo por tanto aceptables (Pérez-Gil, et al., 2022; Gómez-Mínguez, et al., 2007).

Durante el proceso de optimización de esta estrategia, se ha buscado la obtención de una población final de *S. cerevisiae* suficiente para el consumo total de azúcares durante la fase anaeróbica del ensayo. Para ello, se ensayó tanto un incremento en la proporción inicial de inoculación de PR1018 como la suplementación del mosto con nutrientes nitrogenados tras la interrupción de la aireación. Sin embargo, el impacto sobre la cinética de poblaciones de ambas estrategias fue muy reducido. De los tres ensayos de optimización el que parece mejorar el proceso es la disminución del caudal de entrada de aire, desde los 10 v/v/h a 5 v/v/h o incluso 2.5 v/v/h, reduciendo la cantidad de azúcares residuales al final de la fermentación. La utilización del caudal más bajo constituiría también una ventaja para el escalado posterior.

En conclusión, este trabajo propone un nuevo enfoque para la reducción del rendimiento alcohólico durante la fermentación de vino. Gracias a la combinación de estas dos levaduras y a la subsiguiente estrategia de optimización no se requiere de ningún sistema específico de control de la aireación, lo que facilita en gran medida su escalado industrial. Además, los resultados obtenidos parecen muy reproducibles, no mostrando riesgo de producción de ácido acético en condiciones no automatizadas, algo fundamental para la aplicabilidad de esta estrategia en la industria. A tenor de los resultados, no hay indicios de que existan problemas de oxidación durante la primera fase de fermentación, aunque se requerirán nuevos ensayos, a escala industrial, para poder someter los vinos a análisis sensoriales y de color y estudiar su evolución durante el envejecimiento. Esto permitirá determinar si esta estrategia conlleva algún impacto a largo plazo sobre la calidad de los vinos producidos.

---

## **DISCUSIÓN GENERAL**

---



---

El aumento de la concentración alcohólica del vino, debido al cambio climático y a las tendencias de mercado, supone un problema grave para la industria enológica en múltiples aspectos, desde el rechazo de los consumidores y la reducción de las exportaciones hasta la elaboración del propio producto debido a paradas fermentativas.

A lo largo de toda esta tesis doctoral se ha explorado la idea del uso de la respiración de *Saccharomyces cerevisiae* como sumidero de carbono, desviando el consumo de azúcares desde la producción de etanol hacia la producción de CO<sub>2</sub> y biomasa. Este abordaje tiene como principal ventaja el uso de la especie de levadura enológica por excelencia, *S. cerevisiae*, que presenta, como se detalla en la introducción, un nivel de adaptación a la fermentación industrial difícil de alcanzar para otras especies fuera del género *Saccharomyces*. Sin embargo, el uso de la fermentación aerobia para la reducción del grado alcohólico presenta también numerosos inconvenientes a los que se ha tratado de dar respuesta en esta tesis doctoral.

Como se muestra en el capítulo 1, la caracterización del perfil fermentativo de 25 cepas enológicas de *S. cerevisiae* muestra claramente que existe una alta homogeneidad dentro de *S. cerevisiae* en relación con su capacidad de producir etanol, presentando una baja variabilidad intraespecífica en cualquier sistema de cultivo o régimen de aireación, lo que se encuentra en concordancia con lo publicado por Camarasa et al. (2011) y Palacios et al. (2007). Sin embargo, pese a la robustez de este rasgo y a la tendencia a la fermentación que presenta *S. cerevisiae* a altas concentraciones de glucosa (efecto Crabtree), el consumo de azúcares que se produce mediante respiración en condiciones de aerobiosis es suficiente para paliar la subida del grado alcohólico provocada por el cambio climático (3% v/v aprox.). Sin embargo, bajo las condiciones de aerobiosis necesarias para mantener la respiración, *S. cerevisiae* presenta una sobreproducción de ácido acético que imposibilita su utilización para la elaboración de vino (Quirós et al., 2014). De hecho, este fue el parámetro de mayor variabilidad entre las 25 cepas ensayadas, existiendo una diferencia de casi un orden de magnitud, mostrando ser una característica bastante dependiente del medio y sistema de cultivo.

Pese a que la gran mayoría de cepas mostraron un nivel de acidez volátil incompatible con la elaboración de vinos, el hecho de que la especie muestre esta amplia variabilidad permite pensar que existe la posibilidad de hallar aislados naturales aptos para su utilización en fermentaciones aeróbicas. En este trabajo se

---

han identificado varias cepas con una baja producción de ácido acético, aun cuando esta baja producción fuese variable en función del sistema de cultivo.

Las cepas naturales PR117 y PR1018 mostraron una baja producción de ácido acético en condiciones de aerobiosis de manera consistente. Sin embargo, PR117 muestra un perfil de fermentación más lento que el resto de cepas enológicas, lo que impide incluso el consumo total de los azúcares. Por otro lado, PR1018 es capaz de completar la fermentación en condiciones de aerobiosis hasta el consumo total de los azúcares, tras lo cual, genera una abrupta subida de la acidez volátil.

Considerando que este rápido aumento de la producción de ácido acético pudiera deberse a un cambio metabólico hacia el consumo de etanol en condiciones de ayuno de glucosa y aerobiosis, se ensayaron distintos cambios en el régimen de aireación que impidieran esta brusca subida de la acidez volátil. Estos ensayos muestran claramente como un cambio brusco hacia condiciones de anaerobiosis produce también un aumento excesivo en la producción de ácido acético, probablemente debido al desbordamiento de la ruta respiratoria, que se gestiona derivando el exceso de intermediarios metabólicos hacia ácido acético, entre otros posibles metabolitos.

Cuando el cambio hacia condiciones de anaerobiosis se realiza de manera progresiva, el cuello de botella generado sobre la ruta respiratoria debe ser mucho menor, evitando la sobreproducción de ácido acético. Esta idea de reducir paulatinamente la disponibilidad de oxígeno para evitar un pico de producción de ácido acético podría ser una estrategia para la optimización del uso de *S. cerevisiae* en condiciones aeróbicas, y tal y como se explora en el capítulo 3, podría lograrse no solo mediante un control exhaustivo de la disponibilidad de oxígeno de los tanques, sino mediante el consumo de oxígeno por parte de otros microorganismos con más afinidad por el mismo, que pudieran además presentar beneficios secundarios para la vinificación.

Es importante destacar que en este trabajo no se encontraron efectos negativos sobre el perfil aromático o la coloración de mostos fermentados en aerobiosis., aunque es cierto que no se ha estudiado el impacto que esto puede ejercer sobre la estabilidad de los vinos a largo plazo. Cabe destacar que, en el caso de los mostos fermentados por la cepa PR1018, moléculas tales como acetales o derivados del dioxano, compuestos asociados al proceso de oxidación, se encontraron en proporciones menores que en mostos fermentados por otras cepas,

---

por lo que PR1018 podría ser prometedora a la hora de ser utilizada como cultivo iniciador en fermentaciones aeróbicas.

Pese al amplio abanico en los niveles de producción de ácido acético encontrado en el capítulo 1, y al potencial de la cepa PR1018, parece lógico pensar que los aislados naturales que puedan encontrarse con una producción de ácido acético apta para su aplicación en fermentaciones aeróbicas no podrán paliar la demanda de cultivos iniciadores que presenta el sector. Existe una necesidad de diferenciación cada vez mayor en el mundo enológico, en parte debido a la homogeneidad de las cepas comercializadas como cultivos iniciadores, por lo que, si se pretende reducir el grado alcohólico mediante respiración, se debe disponer de gran número de cepas, suficientemente diferentes, que puedan ser aplicadas. En el capítulo 2 se trata de explorar la relación entre la producción de ácido acético y la flexibilización de la represión por catabolito de carbono (CCR), con la idea de generar un método de mejora aplicable a la mayoría de las cepas enológicas.

Como se explica en profundidad en el capítulo 2, existen en la literatura ejemplos de cepas que, con una menor eficiencia de la CCR, muestran también un menor rendimiento de ácido acético en condiciones de aerobiosis (Curiel et al., 2016; Mizuno et al., 2006). Para identificar las posibles causas de esta relación, se llevó a cabo un análisis transcriptómico con dos mutantes por delección,  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  y  $\Delta\Delta\text{Hxk2}$ , construidos en el trabajo de Curiel et al. (2016) sobre el genotipo FX10.

Los datos obtenidos de  $\Delta\Delta\text{Hxk2}$  parecen indicar que no existen mayores diferencias con respecto al parental FX10. Sin embargo, en el caso de  $\Delta\Delta\text{Reg1}$  se observó una sobreexpresión sistemática de genes implicados en el metabolismo del carbono y en la síntesis de proteínas. Aunque esto podría indicar un metabolismo más activo en condiciones de aerobiosis por parte de  $\Delta\Delta\text{Reg1}$ , esta cepa presenta una cinética de fermentación más lenta que  $\Delta\Delta\text{Hxk2}$  y FX10, por lo que esta sobreexpresión podría explicarse no solo por una menor represión por catabolito de carbono, sino por encontrarse en una fase de crecimiento más activa que los otros dos genotipos en el momento de la toma de muestra.

Por otro lado, el mutante  $\Delta\Delta\text{Reg1}$ , de nula producción de ácido acético en condiciones de aerobiosis, parece presentar sobreexpresión en genes tan fundamentales para la síntesis de este metabolito como *PDC6* (piruvato descarboxilasa), *PYC1* (piruvato carboxilasa), *ACS1*, *ACS2* (acetil-CoA sintetasa) y genes codificantes para la acetaldehído deshidrogenasa, mientras que no presenta ningún cambio de expresión para el complejo piruvato deshidrogenasa.

---

Esto parece indicar que la nula producción de ácido acético del mutante podría deberse a una mayor actividad de las enzimas que permiten la generación de acetil-CoA mediante un *bypass* alternativo desde el piruvato (Pronk et al., 1996). La bibliografía indica que una mayor expresión de la actividad acetil-CoA sintetasa no logra la reducción de la producción de ácido acético (Jong-Gubbels et al., 1998), pero quizá sí pueda hacerlo la sobreexpresión de la ruta *bypass* completa, incluyendo piruvato carboxilasa, piruvato descarboxilasa y acetaldehído deshidrogenasa. Si bien es cierto que en este estudio no se ha comprobado que exista una mayor actividad de estas enzimas, sino un mayor número de transcritos de estos genes, por lo que se estaría ignorando cualquier efecto de regulación post-transcripcional. En todo caso, demostrar que la sobreexpresión de las enzimas que forman el *bypass* piruvato-acetil-CoA reduce la generación de ácido acético requerirá de experimentos específicos.

Independientemente de que esta sobreexpresión enzimática sea el nexo entre la flexibilización de la CCR y una menor producción de ácido acético, es indudable que esta relación existe, tal y como demuestra la evolución dirigida que se lleva a cabo en el capítulo 2.

La 2DG es una molécula de uso común para discriminar aquellos mutantes con una menor represión por catabolito de carbono, ya que son capaces de consumir otras fuentes de carbono presentes en el medio, pese a la activación de la CCR que ejerce la 2DG. Siguiendo este principio en el capítulo 2 se llevó a cabo una evolución de 3 genotipos comerciales, por triplicado, en presencia de galactosa y concentraciones crecientes de 2DG, favoreciendo la evolución de las poblaciones mediante la generación de sucesivos cuellos de botella.

Los análisis fenotípicos muestran claramente como, tras la evolución, todas las poblaciones presentan una flexibilización de la CCR y, en todos los casos, una producción de ácido acético menor a la del parental, demostrando la validez de la evolución como herramienta de mejora para la obtención de cepas aptas para la fermentación aeróbica. Sin embargo, este trabajo no está exento de limitaciones. Solo uno de los tres fenotipos evolucionados mostró una mejora consistente, EC1118, mientras los otros dos genotipos parecen o bien perder rápidamente el fenotipo mejorado (es el caso de T73), o bien presentar una estrecha ventana de mejora, con una producción de ácido acético muy baja de partida (el caso de IFI473). Además, se encuentra una clara diferencia entre el comportamiento de las poblaciones evolucionadas y los clones obtenidos a partir de ellas, tanto los aislados desde final de fermentación (clones F, Figura S2.2)

---

como desde el último punto de evolución (clones M, Figura S2.2). Todo parece indicar que existe una alta variabilidad de fenotipos en cada una de las poblaciones evolucionadas, aun cuando procedan del mismo genotipo parental, por lo que un mayor número de réplicas biológicas y una selección de clones más amplia podría favorecer la obtención de aislados con mayor potencial. En cualquier caso, pese a que el diseño de evolución pueda ser mejorado, la obtención de cepas con una baja producción de ácido acético puede lograrse claramente mediante la flexibilización de la CCR y esto puede conseguirse de forma relativamente sencilla mediante evolución dirigida.

Otra estrategia explorada en esta tesis doctoral para la reducción del grado alcohólico es la del uso de cepas no-*Saccharomyces*, de mayor capacidad respiratoria, en combinación con la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae*. Como se detalla en el capítulo 1, para el aprovechamiento de la capacidad respiratoria de cepas con baja producción de ácido acético en aerobiosis, (como es el caso de PR1018), es necesaria una fina regulación de las condiciones de aireación, que evite una subida abrupta del ácido acético una vez se ha consumido la totalidad de los azúcares. Si bien esta regulación es posible a escala laboratorio, tal y como se muestra en el capítulo 1, supone un desafío a la hora de escalar este proceso a nivel industrial. En el capítulo 3 esta fina regulación de la disponibilidad de oxígeno es sustituida por el uso de *M. pulcherrima* en cultivo simultáneo con *S. cerevisiae*, ya que, por su alta capacidad respiratoria, consume la totalidad del oxígeno disponible, creando un ambiente anaeróbico *de facto* para *S. cerevisiae*, que dispone además de una menor cantidad de azúcares para su transformación en etanol. Esto da lugar a vinos de menor graduación alcohólica sin un exceso de ácido acético.

Las cepas ensayadas en el capítulo 3, fueron seleccionadas por su baja producción de ácido acético y la consistencia de su comportamiento en los distintos sistemas de ensayo. El sistema de co-cultivo de estas dos cepas se ve poco afectado por la concentración inicial de *S. cerevisiae*, así como por las condiciones de aireación o incluso la suplementación con fuentes de nitrógeno. La similitud entre el co-cultivo con PR1018 y con la cepa enológica EC1118 apoya la idea de que el sistema de co-cultivo ensayado es muy robusto, pudiendo aplicarse con éxito independientemente de la cepa de *S. cerevisiae* aplicada.

En cuanto al perfil de compuestos volátiles, la combinación con *M. pulcherrima* muestra una reducción en la concentración de ésteres y compuestos terpénicos, algo ya descrito en la literatura (Tufariello et al., 2021). En este caso la

---

suplementación con fuentes de nitrógeno sí parece influir, en especial sobre el acetaldehído y sus derivados. Por otro lado, los vinos resultantes del co-cultivo presentan cierta tendencia hacia colores más oscuros y amarillentos. En todo caso, tanto la composición volátil como la coloración de los vinos producidos mediante co-cultivo quedan dentro de los parámetros normales que se esperaría en vinos blancos comerciales.

En términos generales este trabajo pretende mostrar como el abordaje microbiológico es un enfoque prometedor para solventar la problemática del aumento del grado alcohólico. Esta tesis demuestra que el uso de la respiración del mosto de uva por parte de *S. cerevisiae* es una estrategia válida para la reducción de la graduación alcohólica del vino. Los abordajes mostrados en este trabajo son potencialmente escalables a nivel industrial y podrían permitir al sector continuar trabajando con *S. cerevisiae*, tanto con nuevas cepas seleccionadas, como con los aislados con los que ya se elaboran vinos, mediante una regulación fina de las condiciones de aerobiosis o mediante la combinación con distintas cepas fuera del género *Saccharomyces*.

---

## **CONCLUSIONES**

---

---

- 
1. *S. cerevisiae* presenta una alta variabilidad en cuanto a la producción de ácido acético en condiciones de aerobiosis, lo que permitiría la selección de cepas naturales aptas para su aplicación en fermentaciones aeróbicas.
  2. En este trabajo se identifica una cepa de *S. cerevisiae* con un alto potencial para su aplicación en fermentaciones aeróbicas, la cepa PR1018.
  3. La interrupción abrupta de la aireación desencadena la sobreproducción de ácido acético por parte de *S. cerevisiae*, mientras que un cambio gradual y sostenido hacia condiciones de anaerobiosis parece evitar esta sobreproducción.
  4. El comportamiento de las poblaciones evolucionadas con una menor represión por catabolito de carbono (CCR), confirma la relación entre dicho fenotipo y una menor producción de ácido acético.
  5. Los resultados presentados son compatibles con una posible relación entre una CCR menos severa y la sobreexpresión del *bypass* piruvato-acetilCoA. No obstante, la compleja regulación de la CCR requerirá más experimentación para confirmar esta relación de causalidad.
  6. La alta demanda de oxígeno por parte de la cepa Mp734 de *M. pulcherrima* permite resolver muchos de los problemas asociados al uso de *S. cerevisiae* en condiciones aeróbicas favoreciendo el uso de esta estrategia para la reducción del rendimiento alcohólico.

---

---

## CONCLUSIONS

---



- 
1. *S. cerevisiae* presents a high variability in terms of acetic acid production under aerobic conditions, which would allow the selection of natural strains suitable for their application in aerobic fermentation.
  2. This work identifies a strain of *S. cerevisiae* with a high potential for its application in aerobic fermentations, the strain PR1018.
  3. Abrupt interruption of aeration triggers overproduction of acetic acid by *S. cerevisiae*, whereas a gradual and sustained shift to anaerobic conditions seems to avoid this overproduction.
  4. The behavior of evolved populations with lower carbon catabolite repression (CCR) confirms the relationship between that phenotype and lower acetic acid production.
  5. The results presented are compatible with a relationship between a less severe CCR and an overexpression of the pyruvate-acetylCoA bypass. However, the complex regulation of CCR will require further experimentation to confirm this relationship.
  6. The high oxygen demand of *M. pulcherrima* strain Mp734, solves many of the problems associated with the use of *S. cerevisiae* under aerobic conditions, favoring the use of this strategy for alcohol yield reduction.



---

## **MATERIAL SUPLEMENTARIO**

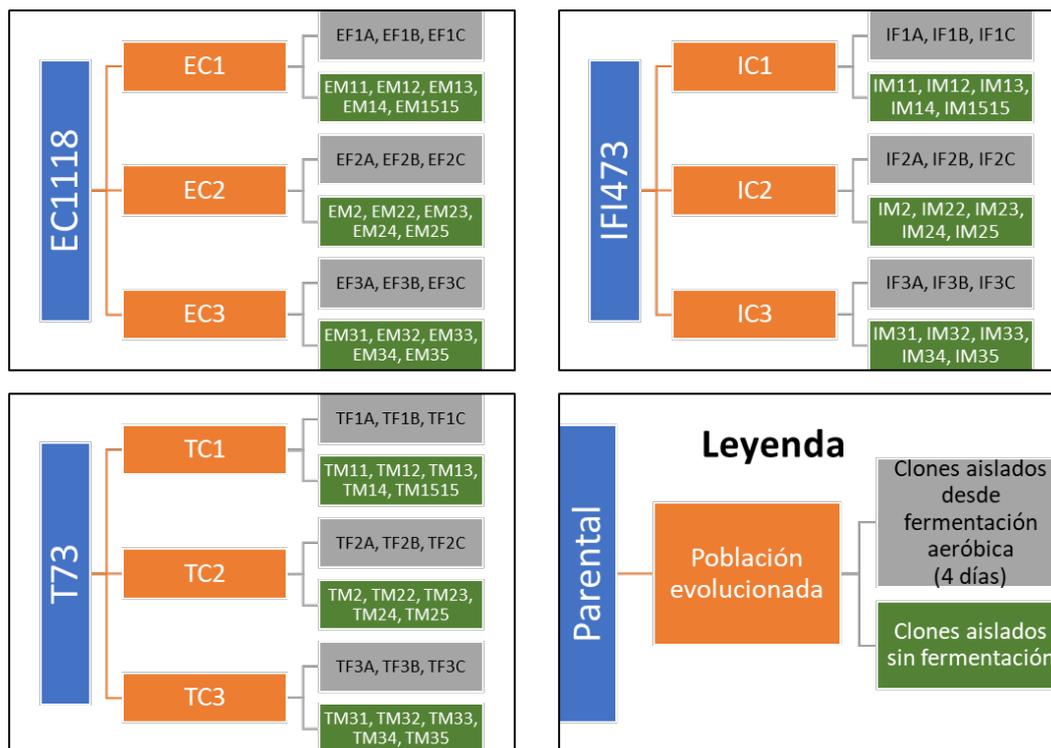
---

---

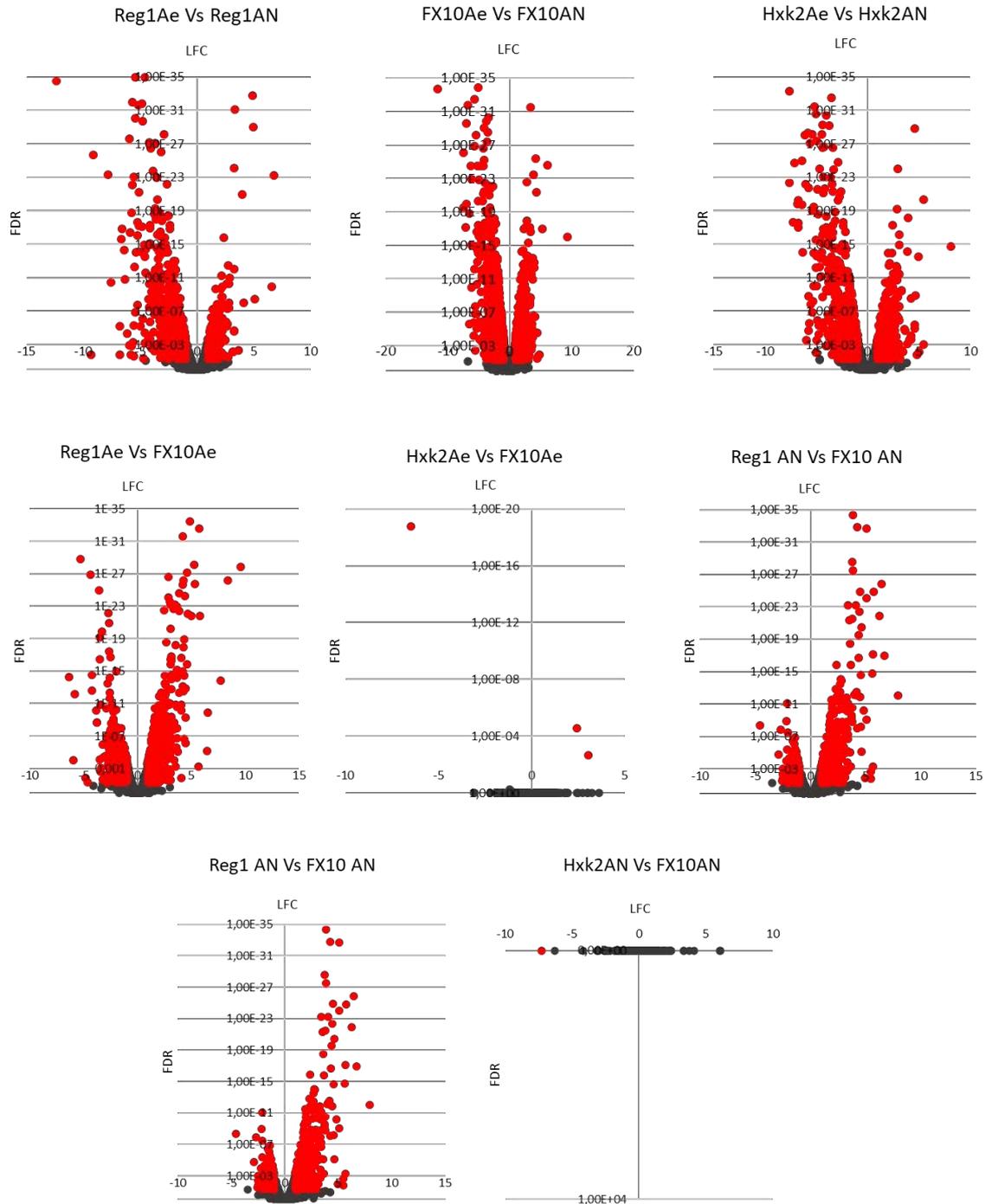
---

**Tabla S1.1.** Orígenes de las cepas de *S. cerevisiae* ensayadas en el capítulo 1.

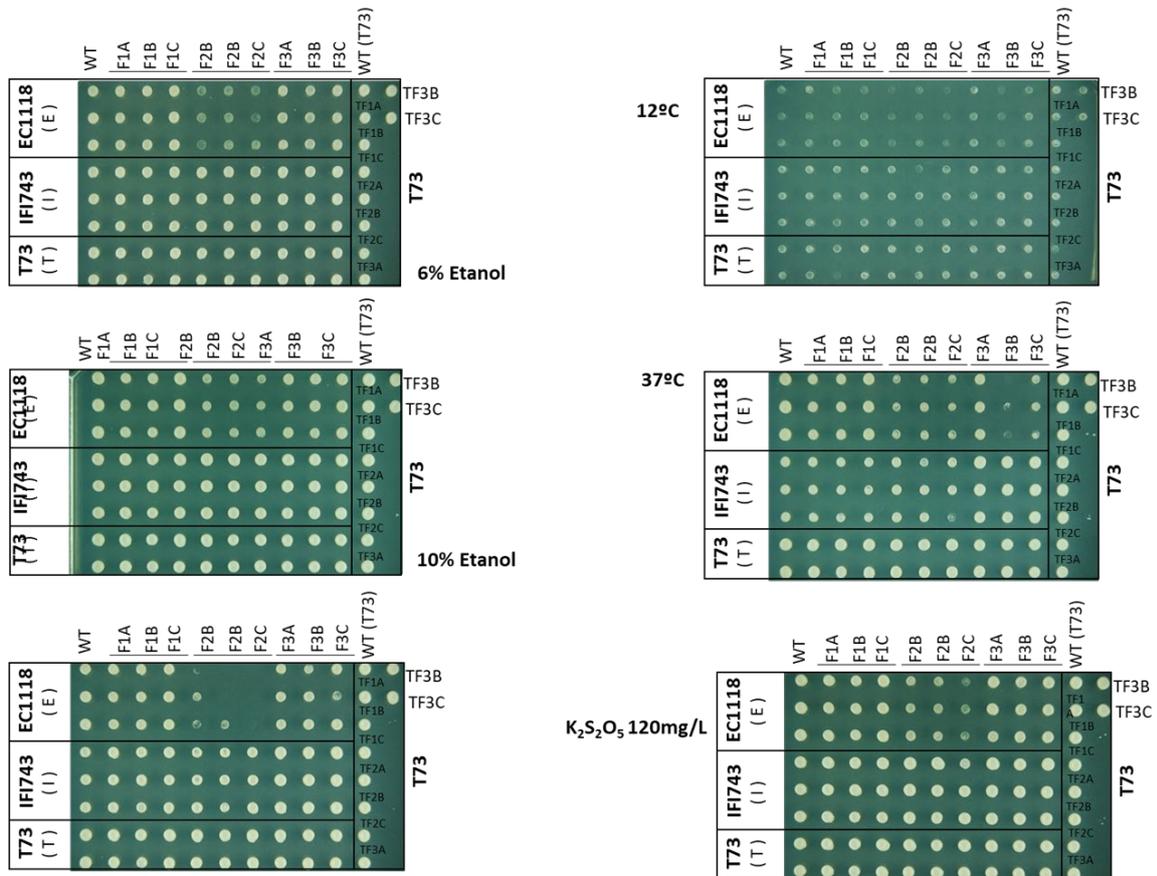
<b>Código</b>	<b>Aisladas de:</b>
PR49	Uva Pedro Ximenes
PR50	Iniciador enológico comercializado
PR55	Iniciador enológico comercializado
PR112	Iniciador enológico comercializado
PR117	Pie de cuba espontáneo
PR221	Mosto de uva concentrado
PR543	Iniciador enológico comercializado
PR699	Mosto de uva Tempranillo
PR807	Mosto de uva blanco
PR902	Mosto de uva tinto
PR913	Mosto de uva tinto
PR988	Mosto de uva Tempranillo
PR996	Mosto de uva Cabernet Sauvignon
PR1002	Mosto de uva Cabernet Sauvignon
PR1006	Mosto de uva Tempranillo
PR1018	Mosto de uva Cabernet Sauvignon
PR1021	Mosto de uva Tempranillo
PR1040	Mosto de uva Tempranillo
PR1156	Desconocido
PR1269	Iniciador enológico comercializado
PR1270	Iniciador enológico comercializado
PR1271	Iniciador enológico comercializado
PR1272	Iniciador enológico comercializado
PR1273	Iniciador enológico comercializado



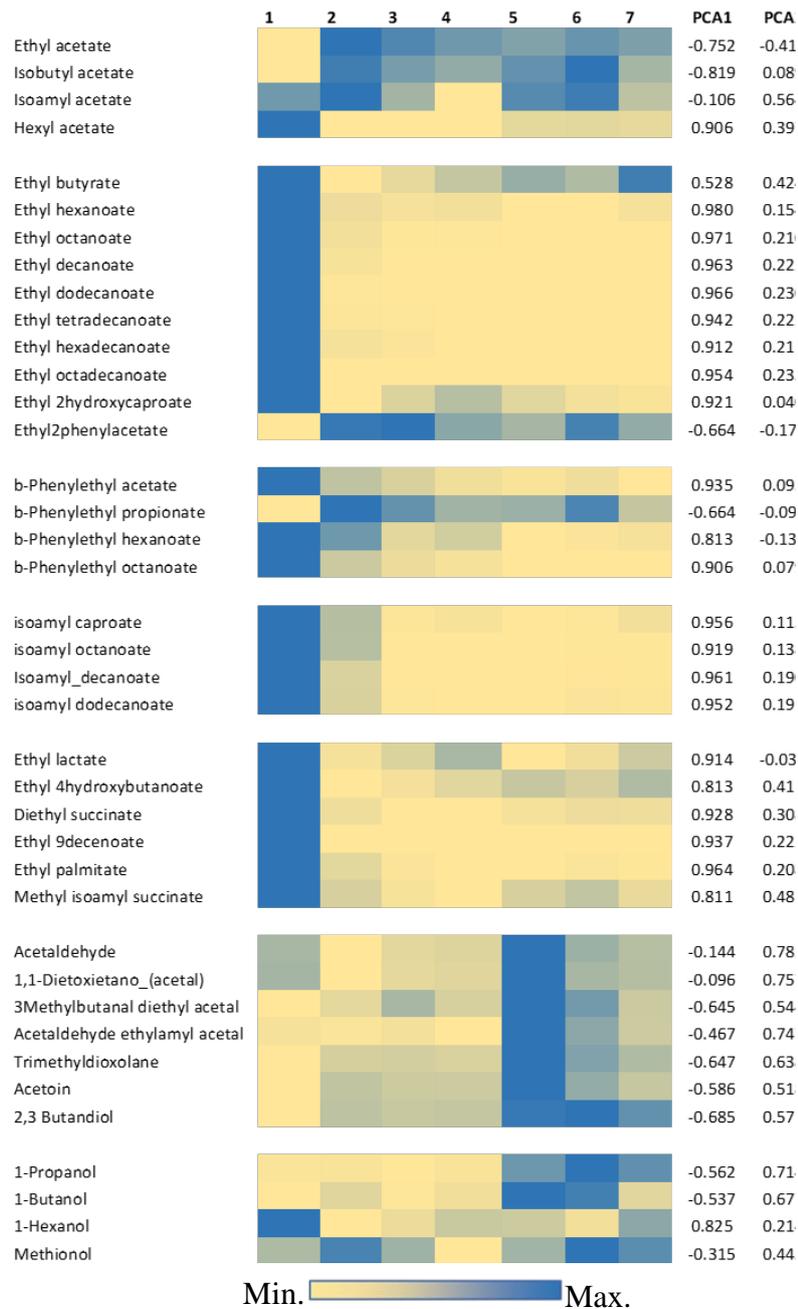
**Figura S2.2.** Esquema de las poblaciones evolucionadas y los aislados procedentes de las poblaciones sin fermentación (clones M) o tras 4 días de fermentación con las poblaciones (clones F).



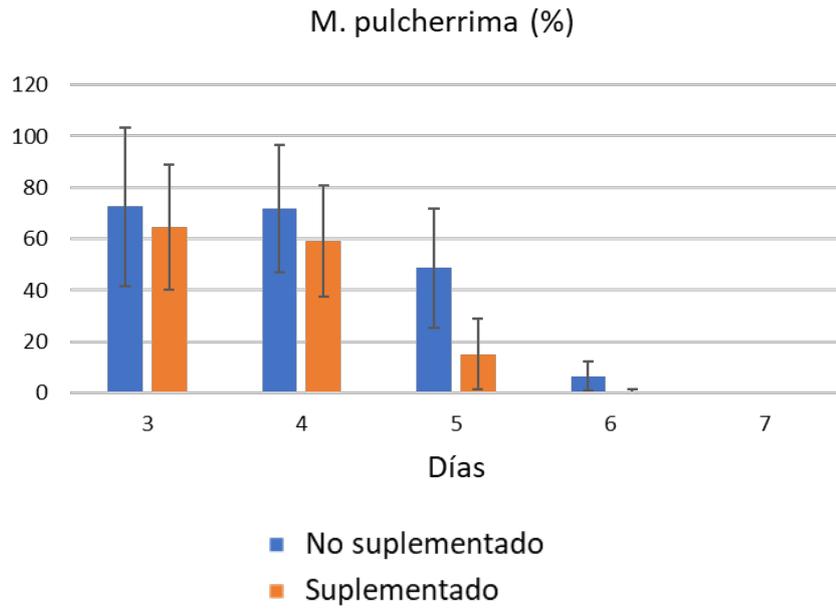
**Figura S2.3.** *Volcano plot* de los transcritos de  $\Delta\Delta$ Reg1,  $\Delta\Delta$ Hxk2 y el parental Fx10 en aerobiosis (Ae) y anaerobiosis (AN). Los puntos rojos indican genes con expresión estadísticamente significativa ( $FDR < 0,05$ ), sobreexpresados ( $LogFC > 1$ ) o reprimido ( $LogFC < -1$ ) (eje de abscisas). Los puntos negros indican ausencia de expresión significativa.



**Figura S2.4.** Ensayo de supervivencia a factores de estrés industrial de los clones F aislados desde las poblaciones evolucionadas. Medio MS30 sólido suplementado según lo indicado.



**Figura S3.5.** Heat map de los 54 compuestos volátiles identificados al final de las distintas fermentaciones. *M. pulcherrima* fue inoculada a una OD<sub>600</sub> de 0.2 en todas las condiciones de aireación: **1)** control (*S. cerevisiae* 0.20 OD<sub>600</sub>, anaeróbico). **2)** *S. cerevisiae* 0.02 OD<sub>600</sub>; 10 v/v/h aire. **3)** *S. cerevisiae* 0.05 OD<sub>600</sub>; 10 v/v/h aire. **4)** *S. cerevisiae* 0.10 od<sub>600</sub>; 10 v/v/h aire. **5)** *S. cerevisiae* 0.10 od<sub>600</sub>; 5 v/v/h aire (suplementación con nitrógeno) *S. cerevisiae* 0.10 od<sub>600</sub>; 5 v/v/h aire (sin suplementación). **7)** *S. cerevisiae* 0.10 od<sub>600</sub>; 2.5 v/v/h aire.



**Figura S3.6.** Evolución del porcentaje de unidades formadoras de colonia (UFC) de *M. pulcherrima* en condiciones de suplementación (naranja) o sin suplementación (azul).

---

## REFERENCIAS

---

---

---

Aguilera, A., Chávez, S., Malagón, F. (2000). Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast*, 16, 731–754.

Ahuatzi, D., Riera, A., Pela Ez, R., Herrero, P., Moreno, F. (2007). Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *The Journal of biological chemistry*, 282, 7, 4485–4493.

Akyereko, Y.G., Wireko-Manu, F.D., Alemawor, F., Adzanyo, M. (2021). Effects of Production Methods on Flavour Characteristics of Nonalcoholic Wine. *Journal of Food Quality*. Article ID 3014793.

Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., Gírio, F. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non- *Saccharomyces* wine-related strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, 965–972.

Almeida, P., Barbosa, R., Bensasson, D., Gonçalves, P., Sampaio, J.P. (2017). Adaptive divergence in wine yeasts and their wild relatives suggests a prominent role for introgressions and rapid evolution at noncoding sites. *Molecular Ecology*, 26, 7, 2167-2182.

Almeida, P., Barbosa, R., Zalar, P., Imanishi, Y., Shimizu, K., Turchetti, B., Legras, J.-L., Serra, M., Dequin, S., Couloux, A., Guy, J., Bensasson, D., Gonçalves, P., Sampaio, J.-P. (2015). A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication. *Molecular Ecology*, 24, 21, 5412-5427.

Alonso-Del-Real, J., Contreras-Ruiz, A., Castiglioni, G.L., Barrio, E., Querol, A. (2017). The Use of Mixed Populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* to Reduce Ethanol Content in Wine: Limited Aeration, Inoculum Proportions, and Sequential Inoculation. *Frontiers in microbiology*, 8, 2087.

Alsammar, H., Delneri, D. (2020). An update on the diversity, ecology, and biogeography of the *Saccharomyces* genus. *FEMS Yeast Research*, 20, foaa013.

Alston, J.M., Fuller, K.B., Lapsley, J.T., Soleas, G. (2011). Too much of a good thing? Causes and consequences of increases in sugar content of California wine grapes. *JWine Econ.*, 6, 135–159.

Analistas Financieros Internacionales (AFI). (2020). Importancia económica y social del sector vitivinícola en España. Informe encargado por la organización Interprofesional del vino de España (OIVE).

Bakalinsky, A.T., Snow, R. (1990). The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6, 367e382.

Bakker, B.M., Overkamp, K.M., Van Maris, A.J., Kötter, P., Luttik, M.A., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 15-37.

- 
- Barbosa, C., Lage, P., Esteves, M., Chambel, L., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A. (2018). Molecular and Phenotypic Characterization of *Metschnikowia pulcherrima* Strains from Douro Wine Region. *Fermentation*, 4, 1, 8.
- Bargues, M., Salom, D., Gómez, A., Paricio, N., Pérez-Alonso, M., Pérez-Ortín, J.E. (1996). Sequencing analysis of a 4.1 kb subtelomeric region from yeast chromosome IV identifies HXT15, a new member of the hexose transporter family. *Yeast*, 12, 1005e1011.
- Bartowsky, E.J., Costello, P.J., and Chambers, P.J. (2015). Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 663-669.
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21, 27e51.
- Bauer, K. (1990). *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties, and Uses*. Vch Pub: New York, NY, USA. ISBN 978-0-89573-919-3.
- Belda, I., Navascues, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., Benito, S. (2015). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1911-1922.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P., (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: Its variability and significance. *Am J Enol Vitic.*, 41,319-324.
- Berry, D.B., Gasch, A.P. (2008). Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 19, 4580-4587.
- Biddick, R.K., Law, G.L., Young, E.T. (2008). Adr1 and Cat8 mediate coactivator recruitment and chromatin remodeling at glucoseregulated genes. *PLoS One*, 3, e1436.
- Bidenne, C., Blondin, B., Dequin, S., Vezinhet, F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 22, 1e7.
- Bisson, L.F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 1, 107-119.
- Bokulich, N.A., Collins, T.S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S.E., Mills, D.A. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio*, 7, e00631.

- 
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111, 139-148.
- Borneman, A., Forgan, A.H., Kolouchova, R., Fraser, J.A., Schmidt, S.A. (2016). Whole genome comparison reveals high levels of inbreeding and strain redundancy across the spectrum of commercial wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3-Genes Genomes Genet.*, 6, 957-971.
- Boulton, R.B., Llaguno Marchena, C., Díaz Serrano, J.M. (2002). *Teoría y práctica de la elaboración de vino*. Editorial Acirbia, S.A.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (Eds.), (1996). *Principles and practices of winemaking*. New York, NY: Chapman.
- Brown, J.C.S., Lindquist, S. (2009). A heritable switch in carbon source utilization driven by unusual yeast prion. *Genes & Dev.*, 23, 19, 2320-2332.
- Buescher, W.A., Siler, E.E., Morris, J.R., Threlfall, R.T., Main, G.L., Cone, G.C. (2001). High Alcohol Wine Production from Grape Juice Concentrates. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 345-351.
- Buser, C.C., Newcomb, R.D., Gaskett, A.C., Goddard, M.R. (2014). Niche construction initiates the evolution of mutualistic interactions. *Ecology Letters*, 17, 1257-1264.
- Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., Dequin, S. (2011). Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *PloS One*, 6, e25147.
- Canonico, L., Solomon, M., Comitini, F., Ciani, M., Varela, C. (2019). Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-*Saccharomyces* yeast under different aeration conditions. *Food Microbiology*, 84, 103247.
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbial Research*, 181, 75-83.
- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89, 417-422.
- Carlson, M., Osmond, B.C., Botstein, D. (1989). SUC genes of Yeast: A dispersed gene family. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45, 799e803.
- Carrigan, M.A., Uryasev, O., Frye, C.B., Eckman, B.L., Myers, C.R., Hurley, T.D., Benner, S.A. (2015). Hominids adapted to metabolize ethanol long before human-directed fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 2, 458-463.

---

Castermans, D., Somers, I., Kriel, J., Louwet, W., Wera, S., Versele, M., Janssens, V., Thevelein, J.M. (2012). Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell research*, 22, 6, 1058-1077.

Catarino, M., Mendes, A. (2011). Dealcoholizing wine by membrane separation processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 3, 330-337.

Cavaliere, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., Polsinelli, M. (2003). Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. *J Mol Evol.*, 57, 226-232.

Cavin, J.-F., Andioc, V., Etievant, P.X., Diviès, C. (1993). Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 76-80.

Cebollero, E., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., Gonzalez, R. (2007). Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine?. *Biotechnol Lett.*, 29, 191-200.

Celenza, J.L., Carlson, M. (1989). Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol Cell Biol.*, 9, 5034-44.

Cherkasova, V., Qiu, H., Hinnebusch, A.G. (2010). Snf1 promotes phosphorylation of the subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 by activating Gcn2 and inhibiting phosphatases Glc7 and Sit4. *Mol Cell Biol.*, 30, 2862-73.

Cherry, J.M., Hong, E.L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E.T., Christie, K.R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hitz, B.C., Karra, K., Krieger, C.J., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Park, J., Skrzypek, M.S., Simison, M., Weng, S., Wong, E.D. (2012). *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), 700-705.

Chow, T.H.C., Sollitti, P., Marmur, J. (1989). Structure of the multigene family of MAL loci in *Saccaromyces*. *Mol. Gen. Genet.*, 217, 60e69.

Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J.A., Oro, L., Rodrigues, A.J., Gonzalez, R. (2016). Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Front. Microbiol.*, 7, 642.

Ciriacy, M. (1975). Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. *Mol. Gen. Genet.*, 138, 157-164.

Codón, A.C., Gasent-Ramírez, J.M., Benítez, T. (1995). Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* bakers yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 345e386.

- 
- Coelho, M.A., Gonçalves, C., Sampaio, J.P., Gonçalves, P. (2013). Extensive intra-kingdom horizontal gene transfer converging on a fungal fructose transporter gene. *PLoS Genet*, 9, e1003587.
- Conant, G.C., Wolfe, K.H. (2007). Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol Syst Biol.*, 3, 129.
- Conibear, H. (2006). Rising alcohol levels in wine -is this a cause for concern?. *AIM Digest*, 18, 4, 1-3.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C., Varela, C. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International journal of food microbiology*, 205, 7-15.
- Columela, L.J.M. De res rustica (4dc-70dc). Traducción por Sotomayor Y Rubio J.M.A (Ed), (1824). Los doce libros de agricultura que escribió en latín Lucio Junio Moderato Columela. Tomos I y II, Los doce libros compilados.
- Cordente, A.G., Curtin, C.D., Varela, C., Pretorius, I.S. (2012). Flavor-active wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 96, 601-18.
- Coulter, A.D., Henschke, P.A., Simos, C.A., Pretorius, I.S. (2008). When the heat is on, yeast fermentation runs out of puff. *Aust. NZ Wine Ind. J.*, 23, 5, 29-33.
- Cox, L.J., Kleiss, T., Cordier, J.L., Cordellana, C., Konkel, P., Pedrazzini, C., Beumer, R., Siebenga, A. (1989). *Listeria* spp. In food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiology*, 6, 49-61.
- Clowers, K.J., Heilberger, J., Piotrowski, J.S., Will, J.L., and Gasch, A.P. (2015). Ecological and genetic barriers differentiate natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Evol.*, 32, 2317-2327.
- Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. *Biochem J.*, 23, 536.
- Curiel, J.A., Salvadó, Z., Tronchoni, J., Morales, P., Rodrigues, A.J., Quirós, M., Gonzalez, R. (2016). Identification of target genes to control acetate yield during aerobic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact*, 15, 156.
- Czaja, W., Bensasson, D., Ahn, H.W., Garfinkel, D.J., Bergman, C.M. (2020). Evolution of Ty1 copy number control in yeast by horizontal transfer and recombination. *PLOS Genetics*, 16, e1008632.
- Dai, Z., Huang, M., Chen, Y., Siewers, V., Nielsen, J. (2018). Global rewiring of cellular metabolism renders *Saccharomyces cerevisiae* Crabtree negative. *Nature Communications*, 9.

---

De Barros Lopes, M., Eglinton, J.M., Henschke, P., Hoj, P.B., Pretorius, I.S. (2003). The connection between yeast and alcohol reduction in wine: managing the double-edged sword of bottled sunshine. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 18, 4, 17-22.

De Deken, R.H. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *J. gen. Microbiol.*, 44, 149-156.

De Jong-Gubbels, P., van den Berg, M.A., Luttkik, M.A., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1998). Overproduction of acetyl-coenzyme A synthetase isoenzymes in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells does not reduce acetate production after exposure to glucose excess. *FEMS Microbiol Lett.*, 1, 165, 1, 15-20.

De Jong-Gubbels, P., van den Berg, M.A., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* acetyl-coenzyme A synthetase encoded by the ACS1 gene, but not the ACS2-encoded enzyme, is subject to glucose catabolite inactivation. *FEMS Microbiol Lett.*, 153, 1, 75-81.

Dequin, S., Barre, P. (1994). Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH. *Bio/technology*. 12, 2, 173-177.

De Wever, V., Reiter, W., Ballarini, A., Ammerer, G., Brocard, C. (2005). A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *The EMBO journal*, 24, 23, 4115-4123.

Delneri, D., Colson, I., Grammenoudi, S., Roberts, I.N., Louis, E.J., Oliver, S. G. (2003). Engineering evolution to study speciation in yeasts. *Nature*, 422, 68e72.

De Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A. (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4003-4008.

Diban, N., Athes, V., Bes, M., Souchon, I. (2008). Ethanol and aroma compounds transfer study for partial dealcoholization of wine using membrane contactor. *Journal of membrane Science*, 311, 1-2, 136-146.

Dickinson, J.R. (2009). 31-Terpenoids in Beer. En: *Beer in Health and Disease Prevention*. Preedy, V.R. (Ed.). Academic Press: San Diego, CA, USA. pp 327-332.

Divol, B., Du Toit, M., Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 95, 601-613.

Dodyk, F., Rothstein, A. (1964). Factors influencing the appearance of invertase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 104, 478-486.

---

Duan, S.-F., Han, P.-J., Wang, Q.-M., Liu, W.-Q., Shi, J.-Y., Li, K., Zhang, X.-L., Bai, F.-Y. (2018). The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nat. Commun.*, 9, 2690.

Dunbar, R.I.M., Launay, J., Wlodarski, R., Robertson, C., Pearce, E., Carney, J., MacCarron, P. (2017). Functional Benefits of (Modest) Alcohol Consumption. *Adaptive Human Behavior and Physiology*. 3, 118–133.

Elena, S., Lenski, R. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet.*, 4, 457–469.

Ephrussi, B., Slonimski, P., Yotsuyanagi, Y. (1956). Cytoplasmic Structures in Yeasts. *Nature*, 177, 1041-1042.

Escartín González, E. (2004). Estudio económico sobre el tratado de Ibn Abdún el vino y los gremios en al-Andalus antes del siglo XII. (Tesis Doctoral Inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla.

Escudero, A., Cacho, J., Ferreira, V. (2000). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography–olfactometric study. *Eur. Food Res. Technol.*, 211, 105–110.

Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 469–486.

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32, 3047–3048.

Fay, J.C., A Benavides, J. (2005). Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1, e5.

Federación Española del vino (FEV): <http://www.fev.es/sector-cifras/>.

Fedrizzi, B., Nicolis, E., Camin, F., Bocca, E., Carbognin, C., Scholz, M., Barbieri, P., Finato, F., Ferrarini, R. (2014). Stable Isotope Ratios and Aroma Profile Changes Induced Due to Innovative Wine Dealcoholisation Approaches. *Food Bioprocess Technol.*, 7, 62–70 (2014).

Feng, Z.H., Wilson, S.E., Peng, Z.Y., Schlender, K.K., Reimann, E.M., Trumbly, R.J. (1991). The yeast *GLC7* gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *The Journal of biological chemistry*, 266, 35, 23796–23801.

Fernández-García, P., Peláez, R., Herrero, P., Moreno, F. (2012). Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling. *The Journal of biological chemistry*, 287, 50, 42151–42164.

Fischer, G., James, S.A., Roberts, I.N., Oliver, S.G., Louis, E.J. (2000). Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature*, 405, 451e454.

---

Fischer, G., Neuveglise, C., Durrens, P., Gaillardin, C., Dujon, B. (2001). Evolution of gene order in the genomes of two related yeast species. *Genome Res.*, 11, 2009e2019.

Fleet, G.H. (1990). Growth of yeasts during wine fermentations. *Journal of Wine Research*, 1, 211-223.

Fleet, G.H. (2007). Wine. En: Doyle, M.P., Beuchat L.R. (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (3rd ed.), (pp. 863-890) Washington, DC: ASM Press.

Fleet, G.H., Heard, G. (1993). Yeast growth during fermentation. En: G. Fleet (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology* (pp. 27e57). Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.

Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S., and Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic Acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. *Applied and environmental microbiology*, 48, 1034-1038.

Flick, K.M., Spielewoy, N., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.C., Wittenberg, C. (2003). Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters. *Molecular biology of the cell*, 14, 8, 3230-3241.

Flikweert, M.T., van der Zanden, L., Wouter, M.Th.M., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1996). Pyruvate decarboxylase: An indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast*, 12, 247-257.

Fugelsang, K. C., Edwards, C. G. (2007). *Wine microbiology: Practical applications and procedures*. New York, NY: Springer.

Galeote, V., Novo, M., Salema-Oom, M., Brion, C., Valério, E., Gonçalves, P., Dequin, S. (2010). FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H<sup>+</sup> symporter. *Microbiology*, 156, 3754-3761.

Gambutì, A., Rinaldi, A., Lisanti, M.T., Pessina, R., Moio, L. (2011). Partial dealcoholisation of red wines by membrane contactor technique: influence on colour, phenolic compounds and saliva precipitation index. *European Food Research and Technology*. 233, 4, 647.

Gamero-Sandemetrio, E., Paya-Tormo, L., Gomez-Pastor, R., Aranda, A., Matallana, E. (2018). Non-canonical regulation of glutathione and trehalose biosynthesis characterizes non-*Saccharomyces* wine yeasts with poor performance in active dry yeast production. *Microbial Cell*, 5, 4, 184-197.

Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol R.*, 62, 334-61.

---

Gancedo, J. M. (1992). Carbon catabolite repression in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 206, 297-313.

Gancedo, C., Salas, M.L., Giner, A., Sols, A. (1965). Reciprocal effects of carbon sources on the levels of the AMP-sensitive fructose-1,6 diphosphatase and phosphofructokinase in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20, 15-20.

García, M., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J.M., Arroyo, T. (2020). Sequential Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentations to Reduce the Alcohol Content in Wine. *Fermentatin*, 6, 2, 60.

García-Ríos, E., Morard, M., Parts, L., Liti, G., Guillamón, J.M. (2017). The genetic architecture of low temperature adaptation in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genom.*, 18, 1-13.

García-Ríos, E., Nuévalos, M., Barrio, E., Puig, S., Guillamón, J.M. (2019). A new chromosomal rearrangement improves the adaptation of wine yeasts to sulfite. *Environ Microbiol.* 21, 5,1771-1781.

Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A., Matallana, E. (2010). Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 295-303.

Giovanelli, G., Peri, C., Parravicini, E. (1996). Kinetics of grape juice fermentation under aerobic and anaerobic conditions. *American journal of enology and viticulture*, 47, 4, 429-434.

Goddard, M.R. (2008). Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*, 89, 2077-2082.

Goddard, M.R., Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS Yeast Research*, 15, fov009.

Godden, P., Wilkes, E., Johnson, D. (2015). Trends in the composition of Australian wine 1984-2014. *Aust J Grape Wine Res.*, 21, 741-753.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.w., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274, 546-567.

Gojković, Z., Knecht, W., Zameitat, E., Warneboldt, J., Coutelis, J.B., Pynyaha, Y., Neuveglise, C., Møller, K., Löffler, M., Piskur, J. (2004). Horizontal gene transfer promoted evolution of the ability to propagate under anaerobic conditions in yeasts. *Mol Genet Genom.*, 271, 387-393.

- 
- Goldner, M.C., Zamora, M.C., Di Leo Lira, P., Gianninoto, H., Bandoni, A. (2009). Effect of ethanol level in the perception of aroma attributes and the detection of volatile compounds in red wine. *Journal of Sensory Studies*, 24, 2.
- Gómez-Mínguez, M.J., Gómez-Mínguez, M., Vicario, I. M., Heredia, F.J. (2007). Assessment of colour and aroma in with wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. *Journal of Food Engineering*. 79, 3, 758-764.
- Gonçalves, P., Gonçalves, C. (2022). Horizontal gene transfer in yeasts. *Current Opinion in Genetics & Development*, 76, 101950.
- Gonçalves, F., Ribeiro, R., Neves, L., Lemperle, T., Lança, M., Ricardo da Silva, J., Laureano, O. (2013). Alcohol reduction in wine by nanofiltration. Some comparisons with reverse osmosis technique. En: Proc. 1st International Symposium of Oenoviti International Network (pp. 64-67).
- Gonzalez, R., Guindal, A.M., Tronchoni, J., Morales, P. (2021). Biotechnological Approaches to Lowering the Ethanol Yield during Wine Fermentation. *Biomolecules*, 11, 11, 1569.
- Gonzalez, R., Morales, P., Tronchoni, J., Cordero-Bueso, G., Vaudano, E., Quiros, M., Novo, M., Torres-Pérez, R., Valero, E. (2016). New genes involved in osmotic stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol.*, 7, 1545.
- Gonzalez, R., Quirós, M., Morales, P. (2013). Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends Food Sci. Technol.*, 29, 55-61.
- Goold, H.D., Kroukamp, H., Williams, T.C., Paulsen, I.T., Varela, C., Pretorius, I.S. (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microb. Biotechnol.*, 10, 264-278.
- Graça da Silveira, M., San Romão, M.V., Loureiro-Dias, M.C., Rombouts, F.M., Abee, T. (2002). Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 12.
- Griffioen, G., Anghileri, P., Imre, E., Baroni, M.D., Ruis, H. (2000). Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 275, 2, 1449-1456.
- Guerzoni, M.E., Sinigaglia, M., Gardini, F., Ferruzzi, M., Torriani, S. (1995). Effects of pH, Temperature, Ethanol, and Malate Concentration on *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc oenos*: Modelling of the Malolactic Activity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 368-374.

- 
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 1264–1300.
- Haarasilta, S., Oura, E. (1975). On the activity and regulation of anaplerotic and gluconeogenic enzymes during the growth process of baker's yeast. *European Journal of Biochemistry*, 52, 1-7.
- Hagman, A., Sall, T., Compagno, C., Piskur, J. (2013). Yeast “make-accumulate-consume” life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS One*, 8, e68734.
- Hall, C., Brachat, S., Dietrich, F.S. (2005). Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 4, 1102-1115.
- Hall, C., Dietrich, F.S. (2007). The reacquisition of biotin prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae* involved horizontal gene transfer gene duplication and gene clustering. *Genetics*, 177, 2293-2307.
- Hartman, P.J., McNair, H.M., Zoecklein, B.W. (2002). Measurement of 3-Alkyl-2-Methoxypyrazine by Headspace Solid-Phase Microextraction in Spiked Model Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 4, 285-288.
- Harutyunyan, M., Malfeito-Ferreira, M. (2022). The rise of wine among ancient civilizations across the Mediterranean basin. *Heritage*, 5, 788-812.
- Hyma, K.E., Saerens, S.M., Verstrepen, K.J., Fay, J.C. (2011). Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 11, 540-551.
- Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., Dickinson, J.R. (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: A Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 2259–2266.
- Hedbacker, K., Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci.*, 13, 2408–20.
- Hedges, D., Proft, M., Entian, K.D. (1995). CAT8, a new zinc cluster encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, 15, 1915–22.
- Hohmann, S. (2015). An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Current Genet.*, 61, 373–382.
- Holland, T., Smit, B. (2010). Climate change and the wine industry: current research themes and new directions. *Journal of Wine Research*, 21, 2-3, 125-136.
- Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases.

---

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 15, 8839–8843.

Hou, J., Friedrich, A., De Montigny, J., Schacherer, J. (2014). Chromosomal rearrangements as a major mechanism in the onset of reproductive isolation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.*, 24, 1153–1159.

Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.*, 37, 1–13.

Hyma, K., Fay, J. (2012). Mixing of vineyard and oak-tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards. *Mol. Ecol.*, 40, 1301–1315.

Jiang R, Carlson M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Gene Dev.*, 10, 3105–15.

Johnston, J.R., Mortimer, R.K. (1986). Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Saccharomyces* and other yeast. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, 569–572.

Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast*, 14, 215–37.

Jones, G.V., Webb, L.B. (2010). Climate change, viticulture, and wine: challenges and opportunities. *Journal of Wine Research*, 21, 2–3, 103–106.

Jones, G.V, White, M.A., Cooper, O.R., Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic change*, 73, 319–343.

Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 27–30.

Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J.H., Johnston, M. (2004). Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 3, 1, 221–31.

Kayikci, Ö., Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15, 6.

Kecskeméti, E., Berkelmann-Löhnertz, B., Reineke, A. (2016). Are epiphytic microbial communities in the carposphere of ripening grape clusters (*Vitis vinifera* L.) different between conventional, organic, and biodynamic grapes? *PLoS One*, 11, 1–23.

Keller, M. (2010). Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 56–69.

- 
- Kellis, M., Birren, B., Lander, E. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 428, 617–624
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., Lander, E.S. (2003). Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, 423, 241e254.
- Kim, J.-H., Johnston, M. (2006). Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 281, 26144–9.
- Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C., Salzberg, S.L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37, 907–915.
- King, E.S., Kievit, R.L., Curtin, C., Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., Bastian, S.E.P., Francis, I.L. (2010). The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference. *Food Chem.*, 122, 618–626.
- King, E.S, Swiegers, J.H., Travis, B., Francis, I.L., Bastian, S.E.P., Pretorius, I.S. (2008). Coinoculated fermentations using *Saccharomyces yeasts* affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc wines. *J Agr Food Chem.*, 56, 10829–10837.
- Kioroglou, D., Kraeva-Deloire, E., Schmidtke, L.M., Mas, A., Portillo, M.C. (2019). Geographical origin has a greater impact on grape berry fungal community than grape variety and maturation state. *Microorganisms*, 7, 9–14.
- Koufopanou, V., Goddard, M.R., Burt, A. (2002). Adaptation for Horizontal Transfer in a Homing Endonuclease. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 239-546.
- Kutyna, D.R., Varela, C., Henschke, P.A., Chambers, P.A., Stanley, G.A. (2010). Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends Food Sci. Technol.*, 21, 293–302.
- Labanda, J., Vichi, S., Llorens, J., López-Tamames, E. (2009). Membrane separation technology for the reduction of alcoholic degree of a white model wine. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 8, 1390-1395.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983). Wine and brandy. En: G. Reed (Ed.), *Biotechnology* (pp. 81-163). Heidelberg, Germany: Verlag-Chemie.
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 97–129.

---

League, G.P., Slot, J.C., Rokas, A. (2012). The ASP3 locus in *Saccharomyces cerevisiae* originated by horizontal gene transfer from *Wickerhamomyces*. *FEMS Yeast Res.*, 12, 859-863.

Le Berre, E., Atanasova, B., Langlois, D., Etiévant, P., Thomas-Danguin, T. (2007). Impact of ethanol on the perception of wine odorant mixtures. *Food Quality and Preference*, 18, 6, 901-908.

Leech, A., Nath, N., McCartney, R.R., Schmidt, M.C. (2003). Isolation of mutations in the catalytic domain of the *snf1* kinase that render its activity independent of the *snf4* subunit. *Eukaryotic cell*, 2, 2, 265-273.

Legras, J.L., Galeote, V., Bigey, F., Camarasa, C., Marsit, S., Nidelet, T., Sanchez, I., Couloux, A., Guy, J., Franco-Duarte, R., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T., Schuller, D., Sampaio, J.P., Dequin, S. (2018). Adaptation of *S. cerevisiae* to Fermented Food Environments Reveals Remarkable Genome Plasticity and the Footprints of Domestication, *Molecular Biology and Evolution*, 35, 7, 1712-1727.

Legras, J.-L., Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 2, 249-255.

Legras, J.L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.M., Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.*, 16, 2091-2102.

Lemoignme, M., Aubert, J.P., Millet, J. (1954). La production d'alcool et le rendement de croissance de la levure de boulangerie cultivée en ahobiose. *Ann. Inst. Pasteur*, 87, 427.

Lepe, J.A.S., Leal, B.I. (2004). *Microbiología Enológica: Fundamentos de vinificación*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 714.

Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E.J., Shi, Z., Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*, 47, 199-205.

Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O'Kelly, M.J., van Oudenaarden, A., Barton, D.B., Bailes, E., Nguyen, A.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, 19, 458, 7236, 337-41.

Liti, G., Peruffo, A., James, S.A., Roberts, I.N., Louis, E.J. (2005). Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR- retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, 22, 177-192.

- 
- Lleixà, J., Martín, V., Giorello, F., Portillo, M.C., Carrau, F., Beltran, G., Mas, A. (2019). Analysis of the NCR Mechanisms in *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* During Winemaking. *Frontiers in Genetics*, 9, 747.
- Longo, E., Vézinhel, F. (1993). Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 322–326.
- Lück, E., Jager, M. (1997). Chapter 12: Sulfur Dioxide. En: *Antimicrobial Food Additives*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ludin K, Jiang R, Carlson M. (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *P Natl Acad Sci USA.*, 95, 6245–50.
- Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O., Johnston, M. (1998). Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 150, 4, 1377–1391.
- Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Julien, A., and Salmon, J.M. (2004). Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 65, 25–32.
- Lynen, E., Hartmann, G., Netter, K.F., Schuegraf, A. (1959). Phosphate turnover and Pasteur effect. En: *Regulation of Cell Metabolism*. G.E.W. Wolsteholme and C.M. O'Connor (Eds), J. & A. Churchill, London.
- Margallo, M., Aldaco, R., Barcelo, A., Diban, N., Ortiz, I., Irabien, A. (2015). Life cycle assessment of technologies for partial dealcoholisation of wines. *Sustainable Prod. Consumption*, 2, 29–39.
- Marks, V.D., Ho Sui, S.J., Erasmus, D., van der Merwe, G.K., Brumm, J., Wasserman, W.W., Bryan, J., van Vuuren, H.J.J. (2008). Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Res.*, 8, 35–52.
- Marsit, S., Dequin, S. (2015). Diversity and adaptative evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS yeast research*, 15, 7.
- Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F.X., Couloux, A., Guy, J., Legras, J.L., Barrio, E., Dequin, S., Galeote, V. (2015). Evolutionary advantage conferred by an eukaryote-to-eukaryote gene transfer event in wine yeasts. *Mol. Biol. Evol.*, 32, 1695–1707.
- Martini, A. (1993). Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*, 4, 3, 165-176.

---

Martín i Oliveras, A., Martín-Arroyo Sánchez, J.D., Revilla Calvo, V. (2017). The Wine Economy in Roman Hispania. Archaeological Data and Modellization. En Remesal Rodríguez, J., (Ed.), The Roman Economy. New Perspectives. (pp. 189-237). Universidad de Barcelona.

Maturano, Y.P., Assof, M., Fabani, M.P., Nally, M.C., Jofré, V., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Castellanos de Figueroa, L.I., Vazquez, F. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108, 1239–1256.

Mayer, F.V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M.J., Carmena, D., McCartney, R.R., Leiper, F.C., Xiao, B., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L.F., Ogrodowicz, R., Martin, S.R., Schmidt, M.C., Gamblin, S.J., Carling, D. (2011). ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism*, 14, 5, 707–714.

McCartney, R.R., Schmidt, M.C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem.*, 276, 36460–6.

McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 101, 51, 17593–17598.

McGovern, P.E., Luley, B.P., Rovira, N., Mirzoian, A., Callahan, M.P., Smith, K.E., Hall, G.R., Davidson, T., Henkin, J.M. (2013). Beginning of viticulture in France. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 10147–10152.

Meillon, S., Viala, D., Medel, M., Urbano, C., Guillot, G., Schlich, P. (2010). Impact of partial alcohol reduction in Syrah wine on perceived complexity and temporality of sensations and link with preference. *Food Quality and Preference*, 21, 7, 732-740.

Mele, M.A., Kang, H.-M., Lee, Y.-T., Islam, M.Z. (2021). Grape Terpenoids: Flavor Importance, Genetic Regulation, and Future Potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 61, 1429–1447.

Mencher, A., Morales, P., Tronchoni, J., Gonzalez, R. (2021). Mechanisms Involved in Interspecific Communication between Wine Yeasts. *Foods*, 10, 8, 1734.

Mestre, M.V., Maturano, Y.P., Combina, M., Mercado, L.A., Toro, M.E., Vazquez, F. (2017). Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Research*, 17, 2.

---

Mira, H., de Pinho, M.N., Guiomar, A., Geraldés, V. (2017). Membrane processing of grape must for control of the alcohol content in fermented beverages. *Journal of Membrane Science and Research*, 3, 4, 308-312.

Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.*, 43, 1844-1855.

Mira De Orduña, R., Patchett, M.L., Liu, S.Q., Pilone, G.J. (2001). Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1657-1662.

Mizuno, A., Tabei, H., Iwahuti, M. (2006). Characterization of low-acetic-acid-producing yeast isolated from 2-deoxyglucose-resistant mutants and its application to high-gravity brewing. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101, 1, 31-37.

Morales, M.L., Ochoa, M., Valdivia, M., Ubeda, C., Romero-Sanchez, S., Ibeas, J.I., Valero, E. (2020). Volatile metabolites produced by different flor yeast strains during wine biological ageing. *Food Res. Int.*, 128, 108771.

Morales, P., Rojas, V., Quiros, M., Gonzalez, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 3993-4003.

Mortimer, R., Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150, 199-204.

Muñoz, R., Moreno-Arribas, M., de las Rivas, B. (2011). Lactic Acid Bacteria. *Molecular Wine Microbiology*, 1st ed; Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R., Eds, pp.191-226.

Nath, N., McCartney, R.R., Schmidt, M.C. (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol Cell Biol*, 23, 3909-17.

Naumova, E.S., Turakainen, H., Naumov, G.I., Korhola, M. (1997). Superfamily of alpha-galactosidase MEL genes of the *Saccharomyces sensu stricto* species complex. *Mol. Gen. Genet.*, 253, 111-117.

Neigeborn, L., Carlson, M. (1987). Mutations Causing Constitutive Invertase Synthesis in Yeast: Genetic Interactions with snf Mutations. *Genetics*, 115, 2, 247-253.

Ness, F., Aigle, M. (1995). RTM1: A member of a new family of telomeric genes in yeast. *Genetics*, 140, 945-956.

Nilsson, A., Nielsen, J. (2016). Metabolic Trade-offs in Yeast are Caused by F1F0-ATP synthase. *Scientific Reports*, 6, 2264.

---

NOAA National Centers for Environmental Information. State of the Climate: Monthly global climate report for annual 2020. Publicado online: enero 2021, descargado en mayo de 2022 desde:

<https://www.ncei.noaa.gov/access/monitoring/monthly-report/global/202013>

Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, C., Legras, J.-L., Wincker, P., Casaregola, S., Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 16333–16338.

Novo, M., Quiros, M., Morales, P., Gonzalez, R. (2012). Wine technology. En: *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Sinha, N.K., Sidhu, J.S., Barta, J., Wu, J. S.B., Cano, M. P. (Eds.). Oxford, UK: John Wiley and Sons LTD, capítulo 28, pp 806-862.

Okonechnikov, K., Conesa, A., García-Alcalde, F. (2015). Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 32, btv566.

Okuda, Y., Sasaki, D., Nogami, S., Kaneko, Y., Ohya, Y., Anraku, Y. (2003). Occurrence, horizontal transfer and degeneration of VDE intein family in *Saccharomycete* yeasts. *Yeast*, 20, 563-573.

Olego, M.Á., Álvarez-Pérez, J.M., Quiroga, M.J., Cobos, R., Sánchez-García, M., Medina, J.E., González-García, S., Rubio Coque, J.J., Garzón-Jimeno, J.E. (2016). Viticultural and Biotechnological Strategies to Reduce Alcohol Content in Red Wines. En: *Grape and Wine Biotechnology*. Morata, A., Loira, I. (Eds.). IntechOpen.

Olivares-Marin, I.K., González-Hernández, J.C., Regalado-Gonzalez, C., Madrigal-Perez, L.A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. *Journal of Visualized Experiments*, 139.

Özcan, S., Dover, J., Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signalling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17, 2566-2573.

Özcan, S., Johnston, M. (1999). Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 3.

Özcan, S. (2002). Two different Signal Regulate Repression and Induction of Genes Expression by Glucose. *journal of biological chemistry*. 27, 49, 46993-46997.

Ozturk, B., Anli, E. (2014). Different techniques for reducing alcohol levels in wine: A review. En: *BIO Web of Conferences*, 3, pp02012, EDP Sciences.

- 
- Palacios, A., Raginel, F., Ortiz-Julien, A. (2007). Can the selection *Saccharomyces cerevisiae* yeast lead to variations in the final alcohol degree of wines?. Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak., 527, 71–75.
- Palomino A, Herrero P, Moreno F. (2006). Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. Nucleic Acids Res., 34, 1427–38.
- Papini, M., Nookaew, I., Uhlén, M., Nielsen, J. (2012). *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial cell factories, 11, 1, 136.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and Its Industrial Applications. AIMS. Microbiol., 6, 1–31.
- Pasteur, L. (1857). Mémoire sur la fermentation alcoolique. Comptes rendus – Biologies, 45, 1032-1036.
- Pasula, S., Chakraborty, S., Choi, J.H., Jeong-Ho, K. (2010). Role of casein kinase 1 in the glucose sensor-mediated signalling pathway in yeast. BMC Cell Biol., 11, 17.
- Peláez R, Herrero P, Moreno F. (2010). Functional domains of yeast hexokinase 2. Biochem J., 432, 181–90.
- Pérez-Gil, M., Pérez-Lamela, C., Falqué-López, E. (2022). Comparison of Chromatic and Spectrophotometric Properties of White and Red Wines Produced in Galicia (Northwest Spain) by Applying PCA. Molecules, 27, 20, 7000.
- Pérez-Ortín, J.E., Querol, A., Puig, S., Barrio, E. (2002). Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. Genome Res., 12, 1533–9.
- Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J.X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freel, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J.M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G., Schacherer, J. (2018). Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. Nature, 556, 7701, 339-344.
- Pickering, G.J. (2000). Low-and reduced-alcohol wine: a review. Journal of wine research. 11, 2, 129-144.
- Pickering, G.J., Heatherbell, D.A., Barnes, M.F. (1998). Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. Food Research International, 31, 10, 685-692.

- 
- Pickering, G.J., Heatherbell, D.A., Barnes, M.F. (1999). The Production of Reduced-Alcohol Wine Using Glucose Oxidase Treated Juice. Part I. Composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 307-316.
- Piper, P.W. (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett.*, 134, 121-127.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.*, 22, 183-186.
- Polakis, E.S., Bartley W. (1965). Changes in the Enzyme Activities of *Saccharomyces cerevisiae* during Aerobic Growth on Different Carbon Sources. *Biochemical Journal*, 97, 284-297.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 8.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 1607-1633.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E., Perez-Ortín, J.E. (2000). Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2057-2061.
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., Morales, P., (2014) Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *Int. J. Food Microbiol.*, 181, 85-91.
- R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rachidi, N., Barre, P., Blondin, B. (1999). Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 261, 841-850.
- Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M., Entian, K.D. (1997). Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Molecular and cellular biology*, 17, 5, 2502-2510.
- Rapp, A. (1990). Natural flavours of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 337, 7, 777-785.
- Reimand, J., Isserlin, R., Voisin, V., Kucera, M., Tannus-Lopes, C., Rostamianfar, A., Wadi, L., Meyer, M., Wong, J., Xu, C., Merico, D., Bader, G.D. (2019). Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g: Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nature protocols*, 14, 2, 482-517.

- 
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.C., Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int. J. Food Microbiol.*, 207, 40–48.
- Renault, P., Coulon, J., Moine, V., Thibon, C., Bely, M. (2016). Enhanced 3-Sulfanylhexas-1-ol production in sequential mixed fermentation with *Torulaspota delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* reveals a situation of synergistic interaction between two industrial strains. *Front. Microbiol.*, 7.
- Robinson, A.L., Boss, P.K., Heymann, H., Solomon, P.S., Trengove, R.D. (2011). Influence of yeast strain, canopy management, and site on the volatile composition and sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines from Western Australia. *J Agr Food Chem.*, 59, 3273–3284.
- Robinson, A.L., Ebeler, S.E., Heymann, H., Boss, P.K., Solomon, P.S., Trengove, R.D. (2009). Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 21, 10313–10322.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26, 139– 140.
- Röcker, J., Strub, S., Ebert, K., Grossman, M. (2016). Usage of different aerobic non-*Saccharomyces yeasts* and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines. *Eur Food Res Technol.*, 242, 2051–70.
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N., Carroll, S.B. (2003). Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature*, 425, 798–804.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169– 180.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, 20, 1369–1385.
- Rossouw, D., Bauer, F.F. (2016) Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food Microbiol.* 55, 32-46.
- Roth, S., Kumme, J., Schüller, H.J. (2004). Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.*, 45, 121–8.
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., Capozzi, V. (2020). Non- *Saccharomyces* commercial starter cultures: Scientific trends, recent patents, and innovation in the wine sector. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, 11, 27–39.

---

Roy, D.J., Dawes, I.W. (1987). Cloning and characterization of the gene encoding lipoamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 925-933.

Roy, A., Jouandot, D., Cho, K.H., Kim, J.H. (2014). Understanding the mechanism of glucose-induced relief of Rgt1-mediated repression in yeast. *FEBS open bio*, 4, 105-111.

Roy, A., Shin, Y.J., Cho, K.H., Kim, J.H. (2013). Mth1 regulates the interaction between the Rgt1 repressor and the Ssn6-Tup1 corepressor complex by modulating PKA-dependent phosphorylation of Rgt1. *Molecular biology of the cell*, 24, 9, 1493-1503.

Rubenstein, E.M., McCartney, R.R., Zhang, C., Shokat, K.M., Shirra, M.K., Arndt, K.M., Schmidt, M.C. (2008). Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. *The Journal of biological chemistry*, 283, 1, 222-230.

Ruiz-Mata, D. (2018). Various aspects of the Turdetani-Punic wine and winery of the Sierra de San Cristobal, in *El Puerto de Santa María (Cadiz)*. *Historia de El puerto*, 1, 60, 9-131.

Ruiz Pulpón, A.R., Cañizares Ruiz, M.C. (2019). Potential of vineyard landscapes for sustainable tourism. *Geosciences*, 9, 11, 472.

Russell, D.W., Smith, M., Williamson, V.M., Young, E.T. (1983). Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. *J. Biol. Chem.*, 258, 2674-2682.

Sadoudi, M., Tourdot-Marechal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacon, J.J., Ballester, J., Vichi, S., Guerin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*, 32, 243-253.

Sadraud, P., Chauvet, S. (1985). Activite antilevure de l'anhydride sulfureux moleculaire. *Connais. Vigne Vin.*, 19, 31-40.

Saerens, S.M.G., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M. (2010). Production and Biological Function of Volatile Esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Biotechnol.*, 3, 165-177.

Saliba, A.J., Ovington, L.A., Moran, C.C. (2013). Consumer demand for low-alcohol wine in an Australian sample. *Int. J. Wine. Res.*, 5, 1-8.

Salmon, J.M. (1997). Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 253-260.

- 
- Santangelo, G.M. (2006). Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 253-282.
- Schmidtke, L.M., Blackman, J.W., Agboola, S.O. (2012). Production Technologies for Reduced Alcoholic Wines. *Journal of Food Science*, 77, 25-41.
- Schmidtke, L.M., Clark, A.C., Scollary, G.R. (2011). Micro-oxygenation of redwine: techniques, applications, and outcomes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51, 2, 115-131.
- Schmidt, M.C., O'Donnell, A.F. (2021). 'Sugarcoating' 2-deoxyglucose: mechanisms that suppress its toxic effects. *Current genetics*, 67, 1, 107-114.
- Schuller, D., Casal, M. (2005). The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 68, 3, 292-304.
- Schreier, P. (1979). Flavour composition of wines: a review. *CRC Critical Review in Food Science and Nutrition*, 12, 59-111.
- Shirra, M.K., Patton-Vogt, J., Ulrich, A., Liuta-Tehlivets, O., Kohlwein, S.D., Henry, S.A., Arndt, K.M. (2001). Inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase activity restores expression of the INO1 gene in a snf1 mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 21, 17, 5710-5722.
- Silva Ferreira, A.C., Barbe, J.C., Bertrand, A. (2002). Heterocyclic acetals from glycerol and acetaldehyde in Port wines: evolution with aging. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2560-2564.
- Smith, P.M. (1995). Biological processes for the reduction of alcohol in wines. (Doctoral dissertation, Lincoln University).
- Sorio, R., Siadou-Martin, B. (2019). Adoption ou rejet de l'innovation, une approche par la théorie des prospects: le cas des vins allégés en alcool. *Innovations*, 58, 161-187.
- Spielewoy, N., Flick, K., Kalashnikova, T.I., Walker, J.R., Wittenberg, C. (2004). Regulation and recognition of SCFGrr1 targets in the glucose and amino acid signaling pathways. *Molecular and cellular biology*, 24, 20, 8994-9005.
- Stasi, A., Bimbo, F., Viscecchia, R., Seccia, A. (2014). Italian consumers' preferences regarding dealcoholized wine, information and price. *Wine Economics and Policy*, 3, 1, 54-61.
- Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., Cavalieri, D. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 13398-13403

- 
- Stewart, G.G. (2017). The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations. *Fermentation*, 3, 63.
- Stoll, M., Lafontaine, M., Schultz, H.R. (2010). Possibilities to reduce the velocity of berry maturation through various leaf area to fruit ratio modifications in *Vitis vinifera* L. Riesling. *Progrès Agricole et Viticole*, 127, 3, 68-71.
- Styger, G., Jacobson, D., Prior, B.A., Bauer, F.F. (2013). Genetic analysis of the metabolic pathways responsible for aroma metabolite production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 4429-4442.
- Styger, G., Prior, B.A., Bauer, F.F. (2011). Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 1145-1159.
- Sumby, K.M., Grbin, P.R., Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chem*, 121, 1-16.
- Sutherland, C.M., Hawley, S.A., McCartney, R.R., Leech, A., Stark, M.J., Schmidt, M.C., Hardie, D.G. (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Current biology: CB*, 13, 15, 1299-1305.
- Sutton, D.D., Lampen, J.O. (1962). Localization of sucrose and maltose fermenting systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 56, 303-312.
- Swanson, W.H., Clifton, C.E. (1948). Growth and assimilation in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, 56, 115.
- Swan, T.M., Watson, K. (1997). Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Can. J. Microbiol.*, 43, 70-77.
- Swiegers, J.H., Kievit, R.L., Siebert, T., Lattey, K.A., Bramley, B.R., Francis, I.L., King, E.S., Pretorius, I.S. (2009). The influence of yeast on the aroma of Sauvignon blanc wine. *Food Microbiol.*, 26, 204-211.
- Tachibana, C., Biddick, R., Law, G.L., Young, E.T. (2007). A poised initiation complex is activated by SNF1. *The Journal of biological chemistry*, 282, 52, 37308-37315.
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 1959-1967.
- Taylor, M.W., Tsai, P., Anfang, N., A Ross, H., Goddard, M.R. (2014). Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ Microbiol.*, 16, 2848-2858.

---

Teunissen, A.W., Steensma, H.Y. (1995). The dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast*, 11, 1001-1013.

Thomas, R.I. (2011). Roman vessel stoppers. En: Peacock, D., Blue, L., Whitewright, J., (Eds.).(2011). *Myos Hormos—Quseir al-Qadim, Roman and Islamic Ports on the Red Sea: Volume 2 Finds from the Excavations 1999–2003*. BAR International Series No. 2286; Archaeopress: Oxford, UK, pp. 11–34.

Thomson, J.M., Gaucher, E.A., Burgan, M.F., De Kee, D.W., Li, T., Aris, J.P., Benner, S.A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet.*, 37, 6, 630-5.

Tilloy, V., Cadière, A., Ehsani, M., Dequin, S. (2015). Reducing alcohol levels in wines through rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, 213, 49–58.

Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., Dequin, S. (2014). Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 2623–2632.

Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozes, N. (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces species* on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol.*, 85, 127–136.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 345–352.

Treitel, M.A., Carlson, M. (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *P Natl Acad Sci USA*. 92, 3132–6.

Tronchoni, J., Curiel, J.A., Sáenz-Navajas, M.P., Morales, P., de-la-Fuente-Blanco, A., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Gonzalez, R. (2018). Aroma profiling of an aerated fermentation of natural grape must with selected yeast strains at pilot scale. *Food Microbiol.*, 70, 214–223.

Tronchoni, J., Gonzalez, R., Guindal, A.M., Calleja, E., Morales, P. (2022). Exploring the suitability of *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking under aerobic conditions. *Food Microbiol.*, 101, 103893.

Tronchoni, J., Setati, M.E., Fracassetti, D., Valdetara, F., Maghradze, D., Foschino, R., Curiel, J.A., Morales, P., Gonzalez, R., Vigentini, I., Bauer, F.F. (2022). Identifying the Main Drivers in Microbial Diversity for Cabernet Sauvignon

---

Cultivars from Europe to South Africa: Evidence for a Cultivar-Specific Microbial Fingerprint. *J. Fungi*, 8, 1034.

Tu, J., Carlson, M. (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 14, 5939–46.

Tufariello, M., Fragasso, M., Pico, J., Panighel, A., Castellarin, S.D., Flamini, R., Grieco, F. (2021). Influence of Non-*Saccharomyces* on Wine Chemistry: A Focus on Aroma-Related Compounds. *Molecules*. 26, 3, 644.

Van den Berg, M.A., de Jong-Gubbels, P., Kortland, C.J., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., Steensma, H.Y. (1996). The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 271, 46, 28953-9.

Van Dijken, J.P., Bauer, J., Brambilla, L., Duboc, P., Francois, J.M., Gancedo, C., Giuseppin, M.L., Heijnen, J.J., Hoare, M., Lange, H.C., Madden, E.A., Niederberger, P., Nielsen, J., Parrou, J.L., Petit, T., Porro, D., Reuss, M., van Riel, N., Rizzi, M., Steensma, H.Y., Verrips, C.T., Vindeløv, J., Pronk, J.T. (2000). An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microbial Technology*, 26, 706-714.

Van Dijken, W.P., Scheffers, A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 32, 199-224.

Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 187-216.

Van Leeuwen, C., Darriet, P. (2015). The impact of climate change on viticulture and wine quality. *J. Wine Econ.*, 11, 150-167.

Van Wijk, R., Ouwehand, J., van den Bos, T., Koningsberger, V.V. (1969). Induction and catabolite repression of  $\alpha$ -glucosidase synthesis in protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 186, 178-191.

Van Wyk, N., Kroukamp, H., Espinosa, M.I., von Wallbrunn, C., Wendland, J., Pretorius, I.S. (2020). Blending wine yeast phenotypes with the aid of CRISPR DNA editing technologies. *International journal of food microbiology*, 324, 108615.

Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., McLean, H., Henschke, P.A. (2009). Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with "wild" indigenous and inoculated yeast: role of yeast volatile compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 238– 248.

- 
- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., Dillies, M.-A. (2016). SARTools: a DESeq2- and EdgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. *PLoS One*, 11, 6, e0157022.
- Vázquez-Lima, F., Silva, P., Barreiro, A., Martínez-Moreno, R., Morales, P., Quirós, M., Gonzalez, R., Albiol, J., Ferrer, P. (2014). Use of chemostat cultures mimicking different phases of wine fermentations as a tool for quantitative physiological analysis. *Microbial cell factories*, 13, 85.
- Vilela, A. (2021). An Overview of CRISPR-Based Technologies in Wine Yeasts to Improve Wine Flavor and Safety. *Fermentation*. 7, 1, 5.
- Walker, M. (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons (Ed.). ISBN: 978-0-471-96446-9.
- Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. (2015). Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 206, 67-74.
- Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. (2016). The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific. *Front. Microbiol.*, 7.
- Wang, Q.-M., Liu, W.-Q., Liti, G., Wang, S.-A., Bai, F.-Y. (2012). Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Mol. Ecol.*, 21, 5404-5417.
- Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F.A., Zia, A., Gjuvsland, A., Simpson, J.T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S.W., Louis, E.J., Liti, G., Moses, A., Blomberg, A. (2011). Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS genetics*, 7, 6, e1002111.
- Weinhandl, K., Winkler, M., Glieder A., Camattari, A. (2014). Carbon source dependent promoters in yeasts. *Microb Cell Fact*, 13, 5.
- Wenzel, T.J., Luttk, M.A.H., van der Berg, J.A., Steensma, H.Y. (1993). Regulation of the PDA1 gene encoding the E1 $\alpha$  subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 218, 405-411.
- Whiting, J. (2010). Regulating winegrape sugar accumulation through leaf removal. *Australian and New Zealand grape grower and winemaker*, 555, 18-20.
- Winge, O. (1994). On segregation and mutation in yeast. *Comptes rendus des travaux du laboratoire Carlsberg, Serie Physiologie*, 24, 79-96.
- Witt, I., Kronau, R., and Holzer, H. (1966). Repression of alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, isocitrate lyase and malate synthase in yeast by glucose.

---

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Enzymology and Biological Oxidation, 118, 522-537.

Wolfe, K.H., Shields, D.C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387, 708–713.

Woods, A., Munday, M. R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., Carling, D. (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 269, 30, 19509–19515.

Xu, W., Liu, B., Wang, C., Kong, X. (2020). Organic cultivation of grapes affects yeast succession and wine sensory quality during spontaneous fermentation. *LWT - Food Sci. Technol.*, 120,108894.

Yona, A.H., Manor, Y.S., Herbst, R.H., Romano, G.H., Mitchell, A., Kupiec, M., Pilpel, Y., Dahan, O. (2012). Chromosomal duplication is a transient evolutionary solution to stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 21010–21015.

Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C., Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *The Journal of biological chemistry*, 278, 28, 26146–26158.

Zamora, F., (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. En: Moreno, M.V.A. y Polo, M.C., (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer Science, New York. pp3-26.

Zhu, X., Navarro, Y., Mas, A., Torija, M.-J., Beltran, G. (2020). A Rapid Method for Selecting Non-*Saccharomyces* Strains with a Low Ethanol Yield. *Microorganisms*. 8, 5, 658.

Zimmer, A., Durand, C., Loira, N., Durrens, P., Sherman, D.J., and Marullo, P. (2014). QTL dissection of lag phase in wine fermentation reveals a new translocation responsible for *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to sulfite. *PLoS One*, 9, e86298.