



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Programa de Doctorado
en Biomedicina y Biotecnología**

**Caracterización enológica y molecular de
híbridos naturales y artificiales entre las
especies *Saccharomyces cerevisiae* y
*Saccharomyces kudriavzevii***

TESIS DOCTORAL

Autor:

María Guadalupe Ortiz Tovar

Dirigida por:

**Dra. Amparo Querol Simón
Dr. Eladio Barrio Esparducer**



iata

Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos

Octubre, 2018

**Caracterización enológica y molecular de híbridos
naturales y artificiales entre las especies
Saccharomyces cerevisiae y *Saccharomyces kudriavzevii***



**Esta tesis se presenta para optar al grado de
Doctor por la Universitat de València**

Directores de la Tesis:

Dra. Amparo Querol Simón y Dr. Eladio Barrio Esparducer

Tutora de la Tesis:

Dra. Carmen Amaro González

María Guadalupe Ortiz Tovar

Valencia, Julio 2018

La Dra. Amparo Querol Simón, Profesora de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA) y el Dr. Eladio Barrio Esparducer, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universitat de València.

CERTIFICAN

Que la presente memoria “Caracterización enológica y molecular de híbridos naturales y artificiales entre las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces kudriavzevii*” constituye la tesis doctoral de María Guadalupe Ortiz Tovar para optar al grado de doctor en Biomedicina y Biotecnología por la Universitat de València. Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo como su redacción.

Y para que conste para los trámites de lectura y defensa de la tesis doctoral, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia, a 12 de junio de 2018

Fdo. Amparo Querol Simón

Fdo. Eladio Barrio Esparducer

Para mis padres

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de la beca para estudios de doctorado en el extranjero número 176060 por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), organismo público del gobierno federal mexicano.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Amparo Querol y el Dr. Eladio Barrio Esparducer por todo lo que han hecho por mí, antes, durante y después de mi estancia en el IATA. Gracias por todo el apoyo técnico, científico y personal que me han dado. Gracias por insistir en que no me diera por vencida. Aprendí muchísimo. Nunca olvidaré el momento de felicidad que compartí con ustedes cuando por fin obtuvimos los híbridos artificiales. Los admiro por todos sus logros y su amplia trayectoria científica pero más aún por su gran calidad humana. Me considero muy afortunada de que hayan sido mis directores de tesis. Gracias.

Nada de lo que ha pasado sería posible sin el apoyo del Dr. Oscar Soto. Muchas gracias por todas las oportunidades que me has regalado. Nunca imaginé que al solicitar que tu fueras mi director de tesis en la maestría vendrían tantas oportunidades. Gracias por aceptarme como tesista, por animarme a salir de Durango, por motivarme a continuar con mis estudios y ayudarme a conseguirlo. Gracias.

Gracias al Dr. Roberto Pérez Torrado a quien admiro porque siempre está investigando, siempre leyendo, escribiendo, experimentando, siempre trabajando y siempre ayudando. Sin duda eres un gran científico, compañero y jefe a la vez.

A la Dra. Ana Cristina Adams porque siempre que iba a buscarla recibía su ayuda, aclaraba mis dudas y siempre con la mejor disposición. Me hubiera gustado conocerla antes y haber aprendido más de ti.

Gracias al Dr. Francisco Noé Arroyo López por ayudarme con el análisis estadístico de datos en el Instituto de la Grasa en Sevilla, pero sobre todo por ayudarme a que mi estancia fuera una grata experiencia. Agradezco la oportunidad de conocerla personalmente y comprobar que son ciertas todas las cosas buenas que Amparo dice de ti.

A quienes me ayudaron también a llegar hasta aquí, a la M.I. Judith Jiménez porque ha sido de gran apoyo para mí desde que la conozco. Gracias por ser un gran ser humano y ayudarme como lo hizo. Es alguien querida por muchas personas porque tiene un gran corazón y se merece lo mejor del mundo. Un agradecimiento muy especial para el Dr. Ernesto Favela Torres que me apoyó en el largo camino para conseguir la beca CONACYT y que es además de un gran investigador un gran ser humano y me regaló el mejor consejo que un profesor le puede dar a un estudiante. Gracias a la Dra. Andrea Cerrillo Soto porque siempre he podido contar con ella, porque también me ha ayudado en este largo proceso, siempre con mucho cariño.

A mi querida amiga Mary a quién tengo presente a pesar del tiempo y la distancia, gracias por los buenos momentos compartidos y por ser un excelente ser humano conmigo y con todos y por regalar tanto de sí misma a los demás. En el momento que te conocí, no sabía que iba a llegar a quererte tanto. Te mereces lo mejor del mundo.

A Nacho, por preocuparse por mí y por motivarme siempre, cómo olvidar tus palabras de motivación, siempre me decías que era una campeona, aunque llegara al último. Ojalá hubiera más personas como tú, porque haces tu trabajo de manera excepcional. A David porque hacía que todo fuera mejor cuando decía que tenía que hacer las cosas con alegría y decisión. Gracias por la motivación, el apoyo y la preocupación de que todo estuviera bien. Moltíssimes gràcies als dos

A Pepe y a Mayte porque fueron geniales y los recuerdo con mucho cariño. Gracias por ser tan buenos conmigo y compartirme sus consejos, su alegría y su compañerismo.

Gracias a mis amigos Gema y Julio, por haber compartido conmigo su alegría, su música, el pueblo, la familia y momentos muy bonitos.

A la Ing. Faviola Olivas Porras quién hace mucho tiempo me confundía con una estudiante de licenciatura. Muchas gracias por todos los buenos deseos y las palabras de motivación que nunca olvidaré.

A la Dra. Carmen Benloch a quien recuerdo con mucho cariño, admiración y respeto. Siempre que me la encontraba por los pasillos me saludaba con su “Hola Xiqueta” y me preguntaba muy seguido que como iba la tesis.

Al Dr. José Manuel Guillamón a quién también recordaré siempre porque además de ser un gran investigador, es una gran persona y me gustaba mucho compartir la hora de comida con él. Siempre tan respetuoso y tan noble.

Al Dr. Alexander Neef con quién algunas veces llegué a coincidir a la hora de comida y siempre tenía una charla interesante. Gracias por el consejo de nunca perder la esperanza y recordar que muchas personas antes que yo han escrito y defendido una tesis.

Thanks to Dr. Cristina Toft for her kindness and advices. It was always a pleasure to talk to you about everything. Thanks for the Scandinavian hug.

Thanks to my friend Aneza for giving me great moments in Spain and Greece. I will always remember you as a very sweet and very gentle person. Thanks for everything you shared with me.

A mi amigo Antonio Benítez, de la Puebla de Cazalla. Gracias por todo tu apoyo durante mi estancia en Sevilla, tanto en el laboratorio como fuera de él. Sin duda, hiciste que todo fuera mucho más fácil para mí en Sevilla. Gracias por tu alegría y compañerismo.

A David Mateo, mi amigo de Vinaroz que es un chico excepcional y siempre me alegraba el día con sus ocurrencias. ¿Cómo olvidarme de ti?; siempre te recuerdo cuando tengo que poner el signo de interrogación al inicio de una pregunta, cuando digo Daviz y cuando me acuerdo de los festejos al final de los bautizos.

Gracias a David Lázaro por toda su ayuda durante mi estancia en el IATA, como olvidar que siempre me salvaba de las PCR imposibles. Gracias a Javi por su ayuda con las extracciones de RNA y por enseñarme a apurar. Gracias a David Peris por ser tan majo y enseñarme nuevos ritmos. Gracias a Romain por su colaboración en este trabajo. Gracias al tío Isaac Córcoles por cantarme las mañanitas en mi cumpleaños y por sus abrazos. Gracias a Pablo Serna, que siempre me recibía en el IATA con una sonrisa. Gracias a Celestino que siempre fue tan amable conmigo y a Ana por ser tan amable y por enseñarme a tocar las castañuelas.

A mi amiga Lidia Ballester porque siempre pude contar con ella, gracias por compartir tu familia y tu pueblo conmigo. Moltíssimes gràcies Lidia.

A David Martínez, gracias por tu cariño y por hacer todo más sencillo en Valencia. Sin duda alguna conocerte ha sido una gran fortuna. Gracias por compartir tu tiempo conmigo, por escucharme y por aconsejarme. Te quiero mucho.

Gracias a mis abuelitos por todo lo que me han enseñado y por todo su cariño. Siempre han estado presentes en mi vida, en los buenos y en los malos momentos. Jamás olvidaré las despedidas y recibimientos en el aeropuerto, aunque eso significaba levantarse de madrugada, siempre estaban ahí. Gracias por planear que todo fuera tan especial.

Gracias a mis padres, para quienes no hay palabras que puedan expresar todo mi amor y agradecimiento, porque lo han dado todo por mí desde el primer momento y cada día de mi vida. Estoy muy orgullosa de que sean mis padres, los admiro y los respeto, pero sobretodo los quiero con todo mi corazón.

Gracias a Dios por la vida y por todo lo que me ha regalado.

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Las levaduras.....	3
2. El género <i>Saccharomyces</i>	5
2.1 Especies del género <i>Saccharomyces</i> relevantes en biotecnología.....	5
2.2 Ciclo de vida.....	8
3.Estructura celular.....	12
3.1 Pared celular y membrana plasmática.....	14
4. Características metabólicas: fermentación alcohólica.....	18
5.Características de las levaduras industriales.....	20
5.1 Condiciones de crecimiento.....	20
6. Diversidad genética en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
7.Mecanismos de duplicación de genes y sus consecuencias evolutivas.....	26
7.1 Renovación genómica.....	26
7.2 Duplicaciones.....	27
7.2.1 Duplicaciones de un gen o de segmentos génicos.....	27
7.2.2 Duplicaciones cromosómicas: aneuploidias.....	28
7.2.3 Poliploidía o duplicación del genoma completo.....	30
7.3 Reordenamientos cromosómicos.....	31
7.4 Formación de híbridos.....	32
8. Producción de bebidas alcohólicas.....	33
8.1 Vino.....	34
8.1.1 Composición del mosto de uva.....	34
8.1.2 Demandas en el sector enológico.....	36
9. Fermentaciones a bajas temperaturas.....	42
10. Construcción de cepas mejoradas genéticamente.....	44
10.1 Evolución adaptativa.....	44

Índice

10.2 Hibridación	45
10.2.1 Conjugación de esporas	45
10.2.2 Rare mating”	46
OBJETIVOS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1. Cepas de levaduras.	55
2. Medios de cultivo.....	56
2.1 Composición del GPY (Extracto de Levadura Glucosa Peptona).	57
2.2 Mosto sintético.	57
2.2.1 Solución stock de aminoácidos.....	59
2.2.2 Solución stock de vitaminas.....	59
2.2.3 Solución stock de oligoelementos.....	60
3. Cebadores.....	60
4. Plásmidos utilizados.	63
5. Transformación de levaduras con marcadores de resistencia a antibióticos mediante el método del acetato de litio.	64
6. Construcción del híbrido <i>S. cerevisiae</i> T73 x <i>S. kudriavzevii</i> CR85.	65
6.1. “Rare-Mating”.....	65
7. Evolución experimental del híbrido artificial.....	65
8. Ensayos de goteo a diferentes temperaturas.	67
9. Seguimiento del crecimiento de levaduras por densidad óptica a 600 nm ..	67
10. Análisis de crecimiento utilizando el SPECTROstar®.	68
11. Caracterización fisiológica de las cepas evolucionadas.....	69
12. Microvinificaciones.	70
12.1 Cinética de consumo de azúcares.	70
13. Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Cromatografía de Gases.	72
14. Cuantificación de compuestos volátiles.....	72

15. Estimación de los parámetros de crecimiento mediante la OD a 600 nm ..	73
16. Análisis moleculares.....	73
16.1 ADN genómico de levaduras.....	73
16.2 Análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)	74
17. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	75
18. Medición de la expresión génica.	76
19. Análisis de polimorfismos en la secuencia amplificada del ADN inter- δ	77
20. Análisis mitocondrial del ADN mediante polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (mtDNA-RFLP).....	78
21. Citometría de flujo.	78
22. Análisis de los datos.....	79
CAPÍTULO 1.....	81
1. Caracterización fisiológica y molecular de híbridos naturales entre las especies <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. kudriavzevii</i>.....	83
1.1 Resultados	84
1.1.1 Capacidad de crecer a bajas temperaturas.....	84
1.1.2 Ensayos de goteo en placa	85
1.1.3 Tasa de crecimiento y fase de latencia de los híbridos crecidos a bajas temperaturas	87
1.1.4 Contribuye el genoma de <i>S. kudriavzevii</i> en la adaptación de los híbridos a bajas temperaturas.....	91
1.1.5 Correlación entre el contenido de genoma de los híbridos y la adaptación a crecer a bajas temperaturas.	91
1.1.6 Expresión relativa de los genes <i>NSR1</i> , <i>GPD1</i> y <i>GUT2</i> a baja temperatura.....	96
1.2 Conclusiones.....	97
CAPÍTULO 2	99
2. Microvinificaciones a baja temperatura usando híbridos interespecíficos naturales <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i>	101

Índice

2.1 Resultados	102
2.1.1 Consumo de azúcares totales	103
2.1.2 Tiempo requerido para consumir el 50% de azúcares totales.....	107
2.1.3 Tiempo requerido para consumir el 95% de azúcares totales.....	108
2.1.4 Tasa máxima de consumo de azúcares	109
2.1.5 Fase de adaptación.....	110
2.1.6 Producción de metabolitos	111
2.1.7 Producción de aromas	113
2.2 Conclusiones	116
CAPÍTULO 3	117
3. Construcción y evolución de híbridos artificiales entre las especies <i>S.cerevisiae</i> y <i>S. kudriavzevii</i>	119
3.1 Resultados	121
3.1.1 Selección de los marcadores de hibridación de las cepas parentales.....	121
3.1.2 Construcción y caracterización del híbrido.....	122
3.1.3 Caracterización genómica de los híbridos estabilizados bajo diferentes condiciones de estrés.....	124
3.1.4 Caracterización fisiológica de los híbridos estabilizados bajo diferentes condiciones de estrés.....	129
3.1.5 Caracterización del crecimiento a 12°C de los híbridos.....	130
a. Crecimiento máximo asintótico de los híbridos caracterizados a 12°C.....	132
b. Parámetro μ en híbridos caracterizados a 12°C.....	135
c. Parámetro λ en híbridos caracterizados a 12°C.....	139
3.1.6 Caracterización del crecimiento en GPY + 10% de etanol a 25°C de los híbridos.....	143
a. Parámetro A de híbridos caracterizados en GPY + 10% de etanol..	145
b. Parámetro μ de híbridos caracterizados en GPY + 10% de etanol...	148

c. Parámetro λ de híbridos caracterizados en GPY + 10% de etanol a 25°C.....	152
3.1.7. Caracterización del crecimiento en GPY a 25°C de los híbridos.....	156
a. Parámetro A de híbridos caracterizados en GPY a 25°C.....	158
b. Parámetro μ de híbridos caracterizados en GPY a 25°C.....	161
c. Parámetro λ de híbridos caracterizados en GPY a 25°C.....	165
3.1.8 Caracterización del crecimiento en mosto sintético a 25°C de los híbridos.....	169
a. Parámetro A de crecimiento de los híbridos en mosto sintético a 25°C.....	171
b. Parámetro μ de híbridos caracterizados en mosto sintético a 25°C.....	174
c. Parámetro λ de híbridos caracterizados en mosto sintético a 25°C.....	177
3.2 Conclusiones.....	181
DISCUSIÓN.....	183
CONCLUSIONES GENERALES.....	189
BIBLIOGRAFÍA.....	193

Índice de Figuras

Figura I.1. Micrografía de una célula de levadura en división..	3
Figura I.2. Ciclo de vida de <i>Saccharomyces</i>	9
Figura I.3. Células de <i>S. cerevisiae</i> bajo el microscopio.....	13
Figura I.4. Esquema de una célula de levadura.....	14
Figura I.5. Representación esquemática de la pared celular de una levadura..	15
Figura I.6. Esquema de las rutas envueltas en la asimilación de glucosa y etanol.....	20
Figura I.7. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> con linajes limpios y origen geográfico	22
Figura I.8. Árbol Neighbor-Joining de 63 cepas <i>S. cerevisiae</i>	23
Figura I.9. Árbol filogenético de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas.....	25
Figura M.1. Proceso de estabilización de un híbrido artificial sometido a distintas condiciones de estrés.....	66
Figura M.2. Diagrama de las condiciones de evolución de los híbridos artificiales y las condiciones en las que estos híbridos evolucionados fueron caracterizados fisiológicamente.....	70
Figura 1.1. Ensayos de goteo en placa a 24, 12 and 8 °C.....	86
Figura 1.2. Tasa de crecimiento (h^{-1}) de híbridos <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> , incluyendo las cepas representativas <i>S. cerevisiae</i> (T73) y <i>S. kudriavzevii</i> (CR85), a 8 °C, 12 °C y 24 °C.....	88
Figura 1.3. La fase de latencia (h) de los híbridos naturales <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> , incluyendo a las cepas representativas <i>S. cerevisiae</i> (T73) y <i>S. kudriavzevii</i> (CR85), a 8°C, 12°C y 24°C.....	90
Figura 1.4. Correlación entre el porcentaje de <i>S. kudriavzevii</i> y la fase de adaptación de los híbridos a 8°C.....	92
Figura 1.5 Análisis de componentes principales (PCA) de cepas híbridas de acuerdo a los datos fisiológicos que se muestran en pequeño al margen izquierdo de la figura.....	95
Figura 1.6. Expresión relativa del alelo <i>S. kudriavzevii</i> de los genes NSR1, GUT2 y GPD1 relacionados al alelo <i>S. cerevisiae</i> en una levadura híbrida natural a 8°C. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas.....	97
Figura 2.1 Cinéticas de consumo de azúcares de <i>S. cerevisiae</i> T73(a), <i>S. kudriavzevii</i> CR85(a) y 23 híbridos naturales provenientes de diferentes	

ambientes y de distintas regiones del mundo. Vino austriaco (b), Cerveza belga (c), Vino suizo (d y e), Cerveza alemana, inglesa y neozelandesa (f), Vino alemán, sudafricano y español (g), Origen no alcohólico (h). 106

Figura 2.2 Tiempo transcurrido para el consumo del 50% de los azúcares presentes en el mosto sintético (t50) por *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C. 107

Figura 2.3 Tiempo transcurrido para el consumo del 95% de los azúcares presentes en el mosto sintético (t95) por *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C. 109

Figura 2.4 Tasa máxima de consumo de azúcares (m) de *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C. 110

Figura 2.5 Fase de adaptación (λ) de *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C. 111

Figura 2.6 Producción de glicerol por *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C. 112

Figura 2.7 Producción de etanol por *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C. 112

Figura 3.1 Patrón de restricción obtenido para los parentales *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* con el enzima *HaeIII* para el gen *BRE5* y *PPR1*. M=Marcador molecular, 1=BRE5/CR85, 2=BRE5/T73, 3=PPR1/CR85, 4=PPR1/T73..... 122

Figura 3.2 Patrón de restricción obtenido para el híbrido a modo de ejemplo con el enzima *HaeIII* para el gen *BRE5* y *PPR1*. M= Marcador molecular, asterisco rojo= *S. cerevisiae*, asterisco azul= *S. kudriavzevii* 123

Figura 3.3 Análisis de restricción del ADN mitocondrial con el enzima de restricción *Hinfl*. Las líneas señaladas con M corresponden al marcador molecular, 1= T73, 2= Híbrido, 3=CR85..... 128

Figura 3.4 Patrón de restricción de elementos delta de diez híbridos de los pases 3 y 4 evolucionados bajo estrés por etanol y los parentales. En asterisco se indican algunas bandas diferentes 129

Figura 3.5 Efecto de interacción Condición de evolución*Pase*Línea sobre el máximo crecimiento asintótico (Parámetro A) en GPY a 12°C. 132

Figura 3.6 Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (Parámetro A) en GPY a 12°C..... 133

Figura 3.7 Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A)..... 134

Figura 3.8 Efecto de interacción entre el máximo crecimiento asintótico (Parámetro A) y la etapa de evolución (Pase)..... 135

Índice de Figuras

Figura 3.9 Efecto principal de la condición de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY a 12°C.	136
Figura 3.10 Efecto de la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) a en GPY a 12°C.	137
Figura 3.11 Efecto de interacción entre la tasa máxima de crecimiento (μ) y la etapa de evolución (Pase) en GPY a 12°C.	138
Figura 3.12 Tasa de crecimiento (μ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 12°C.....	139
Figura 3.13 Efecto principal de la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en GPY a 12°C.	140
Figura 3.14 Efecto de la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) a 12°C	141
Figura 3.15 Efecto de de interacción entre la etapa de evolución (Pase) y la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en GPY a 12°C.....	142
Figura 3.16 Fase de latencia (λ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 12°C.....	143
Figura 3.17 Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C	145
Figura 3.18 Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.....	146
Figura 3.19 Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (Parámetro A) en PY adicionado con 10% de etanol a 25°C	147
Figura 3.20 Valores determinados del crecimiento máximo asintótico (parámetro A) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.....	148
Figura 3.21 Efecto de la condición de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C	149
Figura 3.22 Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C... ..	150
Figura 3.23 Efecto de la condición de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C	151

Figura 3.24 Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase).....	151
Figura 3.25 Tasa de crecimiento (μ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.....	152
Figura 3.26 Efecto principal de la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C	153
Figura 3.27 Efecto principal de la condición de etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.....	154
Figura 3.28 Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.....	155
Figura 3.29 Fase de de latencia (λ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.....	156
Figura 3.30 Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY a 25°C	158
Figura 3.31 Efecto de la condición de etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY a 25°C	159
Figura 3.32 Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY a 25°C	160
Figura 3.33 Valores determinados del crecimiento máximo asintótico (parámetro A) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 25°C	161
Figura 3.34 Efecto principal de la condición de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY a 25°C	162
Figura 3.35 Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY a 25°C.....	163
Figura 3.36 Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY a 25°C...	164
Figura 3.37 Tasa de crecimiento (m) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 25°C.....	165

Índice de Figuras

Figura 3.38 Efecto principal de la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en GPY a 25°C	166
Figura 3.39 Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de adaptación (λ) en GPY a 25°C	167
Figura 3.40 Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en GPY a 25°C	168
Figura 3.41 Fase de latencia (λ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 25°C	169
Figura 3.42 Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en mosto sintético a 25°C	171
Figura 3.43 Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (Parámetro A) en mosto sintético a 25°C	172
Figura 3.44 Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en mosto sintético a 25°C	173
Figura 3.45 Valores determinados del crecimiento máximo asintótico (parámetro A) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos a en mosto sintético a 25°C	174
Figura 3.46 Efecto principal de la condición de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en mosto sintético a 25°C	175
Figura 3.47 Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en mosto sintético a 25°C	175
Figura 3.48 Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en mosto sintético a 25°C	176
Figura 3.49 Tasa máxima de crecimiento (μ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en mosto sintético a 25°C	177
Figura 3.50 Efecto de la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en mosto sintético a 25°C	178
Figura 3.51 Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en mosto sintético a 25°C	179
Figura 3.52 Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en mosto sintético a 25°C	180

Figura 3.53 Fase de latencia (λ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en mosto sintético a 25°C 181

Índice de Tablas

Tabla I.1. Composición de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i> creciendo en forma de levadura.....	16
Tabla I.2. Composición cuantitativa promedio del mosto por grupos de compuestos	36
Tabla M.1. Lista de cepas usadas en este estudio.....	56
Tabla M.2. Regiones génicas bajo análisis de restricción y cebadores usados para la amplificación por PCR.....	61
Tabla 1.1 Porcentaje de genoma correspondiente a la especie <i>S. kudriavzevii</i> de cada híbrido.....	94
Tabla 2.1 Parámetros relativos a la curva de consumo de azúcares de los híbridos naturales.....	103
Tabla 2.2 Concentraciones de los principales metabolitos al final de la fermentación.....	104
Tabla 2.3 Concentraciones de los principales compuestos aromáticos de la fermentación.....	114
Tabla 2.4 Umbral de percepción y valor de la actividad aromática (OAV) de los compuestos aromáticos al final de la fermentación.....	115
Tabla 3.1 Resultados de ploidía de el híbrido artificial sin evolucionar (híbrido inicial), híbridos de los pases 4 y 16 en las tres condiciones de evolución (e=10% de etanol en el medio, h=GPY a 25°C y f=GPY a 12°C), además de las cepas parentales (<i>S. cerevisiae</i> T73 y <i>S. kudriavzevii</i> CR85)	124
Tabla 3.2 RFLPs de los híbridos evolucionados bajo las tres condiciones de estrés correspondientes a la etapa 9 del proceso de evolución	126
Tabla 3.3 Parámetros de crecimiento de los híbridos de la etapa 4, 9 y 16 caracterizados en GPY a 12°C.....	131
Tabla 3.4 Parámetros de crecimiento de los híbridos de la etapa 4, 9 y 16 caracterizados en GPY + 10% de etanol a 25°C.....	144
Tabla 3.5 Parámetros de crecimiento de los híbridos de la etapa 4, 9 y 16 caracterizados en GPY a 25°C.....	157
Tabla 3.6 Parámetros de crecimiento de los híbridos de la etapa 4, 9 y 16 caracterizados en Mosto Sintético a 25°C.....	170

INTRODUCCIÓN

1. Las levaduras.

Las levaduras son hongos unicelulares, no filamentosos que se clasifican mayoritariamente dentro de la clase *Ascomycetes*. Normalmente presentan una morfología esférica, ovalada o cilíndrica. Aunque la mayoría de estos microorganismos poseen esta morfología celular, bajo determinadas condiciones, algunas especies pueden formar filamentos que, en ciertas especies como *Candida albicans*, son imprescindibles para desarrollar su patogenicidad. Se reproducen asexualmente por gemación (Figura I.1) o bipartición al formar colonias de origen unicelular, las cuales a medida que crecen, aumentan el número de levaduras; o por fisión, proceso en el que la célula parental se alarga, se divide y forma dos células hijas. Si existe reproducción sexual, las esporas, denominadas ascosporas o basidiosporas, se forman dentro de un cuerpo fructífero. Cuando no se encuentra alguna estructura de reproducción sexual, las especies se denominan levaduras imperfectas o anamórficas y se agrupan en la clase *Blastomycetes* (Kurtzman y Fell, 1998).

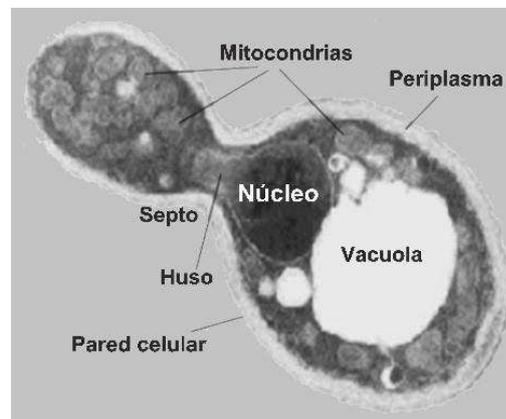


Figura I.1. Micrografía de una célula de levadura en división (Feldmann y Branduardi, 2012).

Las levaduras son organismos saprofitos que crecen sobre una gran variedad de sustratos de origen vegetal o animal, o bien como parásitos de plantas y animales. Son habitantes comunes de nichos donde hay azúcares (flores, frutos y corteza de árboles). Son responsables de muchas actividades beneficiosas para el hombre, por lo que se les ha utilizado durante milenios

Introducción

para la producción de alimentos fermentados y bebidas alcohólicas, e incluso en la producción de antibióticos, vitaminas y enzimas. Ahora bien, las levaduras también son responsables de actividades perjudiciales como el deterioro de alimentos y productos manufacturados, al igual que la producción de enfermedades infecciosas en el hombre y los animales. Las levaduras participan en la producción de la mayor cantidad de productos biotecnológicos a nivel mundial, superando tanto en producción, como en ingresos económicos, a cualquier otro grupo de microorganismos industriales. Una de las especies de levaduras de mayor interés biotecnológico y ampliamente conocida es *S. cerevisiae* (Moyad, 2007).

S. cerevisiae es también un organismo de gran importancia comercial, ya que estos microorganismos han sido utilizados desde hace mucho tiempo para fermentar azúcares provenientes de distintos cereales y frutas, para la producción de bebidas alcohólicas, en la industria de la panificación, para expandir o hacer crecer la masa e incluso para la obtención de destilados. Además, *Saccharomyces cerevisiae* es utilizada como suplemento proteínico, estimulador de energía, potenciador inmune como vehículo donde otros compuestos pueden ser insertados para crear un producto de salud comercializable (Moyad, 2007). Como ejemplo de la relevancia de esta especie, podemos indicar que la producción de biomasa anual a nivel mundial de *S. cerevisiae* supera el millón de toneladas, un nivel que excede la producción conjunta de otros microorganismos industriales en dos órdenes de magnitud.

Sin embargo, *S. cerevisiae* no es la única especie del género *Saccharomyces* que tiene relevancia industrial, otras especies pertenecientes al género *Saccharomyces* tales como *S. kudriavzevii*, *S. paradoxus*, *S. uvarum* y *S. eubayanus*, una nueva especie aislada en Argentina (Libkind et al., 2011), así como los híbridos de estas especies, también tienen un papel importante en la elaboración de bebidas como sidra, cerveza o vino.

2. El género *Saccharomyces*

Las especies reconocidas del género *Saccharomyces* son *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. eubayanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* y *S. uvarum* y 2 antiguas especies que corresponden a híbridos, *S. bayanus* (*S. eubayanus* x *S. uvarum*) y *S. pastorianus* (*S. cerevisiae* x *S. eubayanus*) (Almeida et al., 2014; Boynton y Greig, 2014; Naseeb et al., 2017). Además, dentro del género es frecuente encontrar en procesos industriales otros híbridos naturales, tales como *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* x *S. uvarum*, y triples híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. uvarum* (González et al., 2006; Lopes et al., 2010; Pérez-Través et al., 2014; Pérez-Torrado et al., 2017; Peris et al., 2018, 2012b, 2012a). A continuación, se indican las características más importantes de las especies relevantes a nivel biotecnológico.

2.1 Especies del género *Saccharomyces* relevantes en biotecnología

La especie *S. cerevisiae* es la especie predominante y responsable de la fermentación alcohólica en la producción de vino, cerveza, sake y diferentes bebidas tradicionales fermentadas. Es la levadura mejor adaptada para crecer a altas temperaturas dentro del género *Saccharomyces*, con las temperaturas de crecimiento óptimas más altas (32.3 °C) y máximas (45.4 °C) (Salvadó et al., 2011). También es la especie con mayor resistencia al etanol (Arroyo-López et al., 2010). Además de su papel tradicional en la fermentación alcohólica, entre las especies del género *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* es también la más utilizada para la producción de bioetanol a partir de hexosas, habiendo empleado regularmente cepas de alto rendimiento en la producción de etanol y tolerantes a crecer a altas temperaturas (Greetham et al., 2014; Wimalasena et al., 2014). En el siguiente párrafo analizaremos aquellas otras especies que se han utilizado como alternativas a la especie *S. cerevisiae* en aplicaciones biotecnológicas.

Introducción

La especie *S. paradoxus* también ha sido utilizada para la fermentación de vinos croatas (Redžepovi et al., 2002) y es la más cercana a *S. cerevisiae*, según las reconstrucciones filogenéticas (Scannell et al., 2011). Esta levadura silvestre es una especie natural distribuida en todo el mundo con una presencia fortuita en los procesos de fermentación, aunque sus cepas se han aislado de ambientes naturales generalmente asociados con exudados de árboles (Kurtzman, 2003).

La especie *S. kudriavzevii* se ha aislado principalmente en ambientes naturales, como hojas en descomposición (Naumov et al., 2000) o cortezas de roble (Sampaio y Gonçalves, 2008; Lopes et al., 2010). Esta especie participa en la formación de híbridos con especies de *S. cerevisiae*, que están presentes en fermentaciones industriales en Europa central (Masneuf et al., 1998; Lopandic et al., 2007; González et al., 2008, 2007, 2006; Sipiczki, 2008; Belloch et al., 2009; Peris et al., 2012a, 2012b). La caracterización fisiológica de las cepas de *S. kudriavzevii* ha demostrado su criotolerancia, creciendo bastante bien a bajas temperaturas (10-15°C) (Belloch et al., 2008; Tronchoni et al., 2009; Salvadó et al., 2011).

La cepa criofílica, *S. bayanus*, aunque se ha encontrado en hábitat natural en el lejano oriente junto con cepas de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, también aparece asociada a diferentes procesos de fermentación como vinificación (Demuyter et al., 2004; Le Jeune et al., 2007), producción de sidra (Coton et al., 2006), elaboración de cerveza, o como contaminante del mosto de uva. La cepa tipo de esta especie, originalmente aislada de cerveza, ha sido descrita como un híbrido que posee también genoma nuclear de *S. cerevisiae* (de Barros Lopes et al., 2002; Nguyen y Gaillardin, 2005), lo que llevó a la propuesta de la reinstauración de la especie *S. uvarum*, un antiguo taxón incluido en *S. bayanus*, como una especie distinta (Nguyen y Gaillardin, 2005) o como una variedad diferente dentro de *S. bayanus* (Naumov et al., 2000). En un estudio reciente, Pérez-Través et al., (2014) mostraron que el grupo 'uvarum' presenta una alta homogeneidad intraespecífica y que las cepas de *S. bayanus* tienen distintos niveles de homocigosidad, hibridación e

introgresión. Todas las cepas de *S. bayanus* son híbridos entre *S. uvarum* y *S. eubayanus* y no se identificó una cepa pura de *S. bayanus* var. *bayanus*.

La comparación fenotípica entre *S. uvarum* y *S. cerevisiae* revela que *S. uvarum* crece mejor a bajas temperaturas, produce cantidades más pequeñas de ácido acético, menores cantidades de alcoholes amílicos, pero mayores cantidades de glicerol, ácido succínico, ácido málico, alcohol isobutílico, alcohol isoamílico y numerosos compuestos secundarios de la fermentación alcohólica (Sipiczki, 2008). Los vinos producidos por cepas de *S. uvarum* tienen una mayor intensidad aromática que los producidos por *S. cerevisiae* (Coloretti et al., 2006; Gamero et al., 2013). Por otro lado, *S. uvarum* es menos común y aparece principalmente en fermentaciones a bajas temperaturas ya que tiene la capacidad de crecer mejor que *S. cerevisiae* en este tipo de fermentaciones (Demuyter et al., 2004; Masneuf-Pomarède et al., 2010).

En la naturaleza, así como en la fabricación y elaboración de vino, se han aislado levaduras híbridas tanto homoploides como aloploides cuyos genomas se derivan total o parcialmente de dos o más miembros diferentes del género *Saccharomyces* como describimos anteriormente. Estas especies de *Saccharomyces* también se pueden aparear en el laboratorio para crear híbridos interespecíficos *de novo* (Pérez-Través et al., 2012; Dunn et al., 2013). Híbridos naturales de *S. cerevisiae*, *S. bayanus* y *S. kudriavzevii* que realizan fermentaciones de vino se han caracterizado genéticamente (González et al., 2008, 2006; Belloch et al., 2009; Peris et al., 2018, 2012b, 2012a). Los híbridos entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* pueden fermentar mostos a bajas temperaturas con un rendimiento de fermentación especialmente bueno a 14, 18 y 22 °C (González et al., 2007). Los datos fisiológicos sugieren que los híbridos de *Saccharomyces* pudieron haber heredado la capacidad de crecer a altas temperaturas (30-37 °C) y la tolerancia al etanol de su parental *S. cerevisiae* y su capacidad para crecer a bajas temperaturas (10-16 °C) de su parental *S. bayanus* y *S. kudriavzevii*. Se han realizado estudios similares con

Introducción

híbridos entre *S. cerevisiae* y *S. uvarum*, indicando que tienen la capacidad criotolerante de *S. uvarum* y la tolerancia al etanol de *S. cerevisiae*.

El resto de las especies no están asociadas con ambientes fermentativos. *S. arboricola* se encontró asociado a la corteza de dos especies arbóreas de la familia Fagaceae en diferentes regiones de China (Wang y Bai, 2008), *S. cariocanus* se aisló de la mosca de la fruta (*Drosophila sp.*) en Brasil (Naumov et al., 2000), *S. mikatae* se aisló del suelo y hojas en descomposición en Japón (Naumov et al., 2000) y *S. eubayanus* se encontró en bosques de *Nothofagus* (Haya del sur) en la Patagonia (Libkind et al., 2011) y la especie recientemente descrita, *S. jurei* aislada de *Quercus robur* en Francia (Naseeb et al., 2017).

2.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de las levaduras en crecimiento por gemación se compone principalmente de tres tipos de células: haploides, con dos tipos de apareamiento isógamos (**a** y **α**) y diploides (**a/α**) (Herskowitz, 1988; Madhani, 2007). Los dos tipos de haploides a menudo se llaman de tipo sexual porque tienden a conjugarse (la conjugación se produce solo entre las células **a** y las células **α**. El cambio de tipo sexual es el proceso mediante el cual una célula haploide **a** puede convertirse en una célula haploide **α**, al cambiar su genotipo en el locus de tipo sexual (MAT) de MAT**a** a MAT**α** o viceversa. Los tres tipos de células pueden dividirse por mitosis dadas las condiciones ambientales favorables pero en *S. cerevisiae*, las células haploides de tipos sexuales opuestos conjugarán fácilmente si se encuentran (Merlini et al., 2013).

Las células haploides **a** expresan un receptor que detecta la feromona de apareamiento del factor **α** expresada por células haploides **α**. Recíprocamente, las células haploides **α** expresan un receptor que se une a la feromona **a** expresada por las células haploides **a**. La interacción entre una feromona y su receptor en cualquier tipo de célula haploide desencadena una cascada de señalización MAP-quinasa que da como resultado la detención de la proliferación mitótica en fase G1, la formación de una proyección de

apareamiento polarizada hacia la fuente de feromonas y finalmente el apareamiento celular y fusión nuclear para generar un cigoto diploide (Bardwell, 2005; Jones y Bennett, 2011; Merlini et al., 2013).

Los diploides son inducidos a meiosis y esporulación en condiciones limitantes de nutrientes en el ambiente (específicamente inanición de nitrógeno en presencia de una fuente de carbono no fermentable), lo que resulta en la formación de un asca. El asca normalmente contiene cuatro esporas haploides (dos a y dos α) que germinan al restablecer las condiciones favorables (Honigberg y Purnapatre, 2003; Piekarska et al., 2010; Neiman, 2011). Un resumen del ciclo de vida se muestra en la Figura I.2.

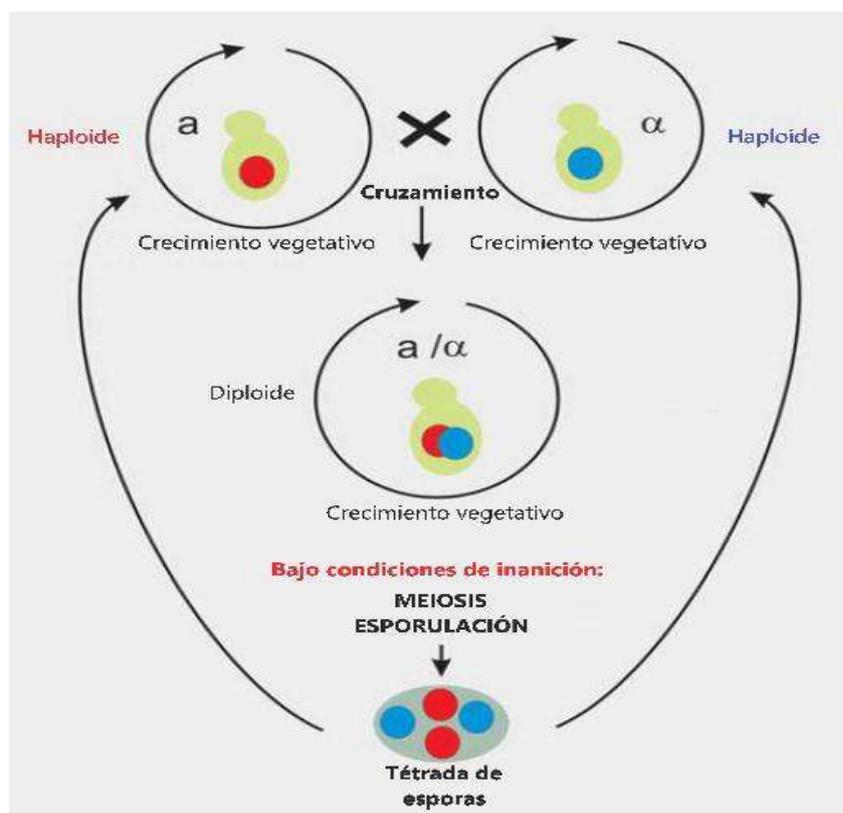


Figura I.2. Ciclo de vida de *Saccharomyces*. (Feldmann y Branduardi, 2012).

Las especies dentro del filo *Ascomycota* varían en cuanto a la preferencia a crecer por gemación como haploides (haplónicas) o como diploides (diplónicas) (Phaff et al., 1977). Mientras que los aislados naturales de *S. cerevisiae* son principalmente diploides, muchas otras especies de levadura son principalmente haploides, incluyendo *K. lactis*, *S. pombe* y las

Introducción

levaduras metilotróficas como *Ogataea (Hansenula) polymorpha* (Dujon, 2010). De acuerdo con estas preferencias de ploidía, *S. cerevisiae* se aparee espontáneamente (incluso en medios ricos) y utiliza una señal ambiental solo para la esporulación.

El locus MAT controla los procesos que dictan la identidad del tipo celular (Herskowitz, 1989; Johnson, 1995). Para las células haploides (tanto α como a), los procesos específicos del tipo celular incluyen la inducción de la competencia para aparearse y la represión de la esporulación, mientras que las células diploides requieren represión del apareamiento y la capacidad de iniciar la meiosis y la esporulación.

Las levaduras aisladas de ambientes naturales se pueden encontrar como células haploides o células diploides, con preferencia parcial o total por uno u otro estado, dependiendo de la especie. También se encuentran los aneuploides y distintos aislados pueden exhibir un grado significativo de polimorfismo en la longitud o el número de cromosomas dentro de las especies. Este polimorfismo refleja los mecanismos intrínsecos de la evolución, la dinámica del genoma y el modo preferido de reproducción de cada especie de levadura. Generalmente, se prefiere el crecimiento clonal en condiciones ambientales óptimas, asegurando la rápida expansión de las subpoblaciones, teniendo una combinación alélica dada para cada una, ya sea en el estado haploide o diploide. En las especies sexuales de levadura, la limitación de nutrientes induce la meiosis y la esporulación en clones diploides.

La levadura con ciclo sexual mejor caracterizada, ampliamente utilizada como modelo para la elucidación de los mecanismos moleculares implicados en el ciclo celular y la reproducción sexual, es nuevamente *S. cerevisiae*. Esta levadura prefiere ser diploide en poblaciones naturales o domesticadas. Su ciclo sexual requiere la acción de muchos genes implicados en la meiosis y la esporulación, cuya expresión es específica de diploides, y muchos otros genes implicados en el apareamiento y la formación de cigotos, cuya expresión es específicamente haploide. *S. cerevisiae*, al igual que otras especies de

levadura con ciclos sexuales de la misma familia (*Saccharomycetaceae*), es una especie isógama y heterotálica con un tipo de apareamiento bipolar (es decir, solo existen dos tipos de apareamiento determinados por un solo locus MAT con dos formas alélicas) (Knop, 2011). Existen situaciones más complejas en otras levaduras, con tipos de apareamiento tetrapolares o incluso multipolares (Butler, 2010; Heitman et al., 2007). En *S. cerevisiae*, dos células haploides de tipo de apareamiento opuesto se fusionan entre sí, después de una diferenciación específica, para formar un cigoto en el que la cariogamia se produce sin demora (excepto en mutantes específicos) y que inicia un nuevo clon diploide.

Sorprendentemente, *S. cerevisiae* tiende a limitar el grado de intercambio genético cuando se somete a ciclos sexuales a pesar de su sofisticada maquinaria molecular para la reproducción sexual (Knop, 2006; Zeyl, 2009). Varias causas contribuyen a esta limitación. (i) Generalmente opta por el acoplamiento intratetradas inmediatamente después de la meiosis (dos ascosporas de tipo sexual opuesto surgidas de la misma, conjugan entre sí antes de haber experimentado su primera mitosis haploide). Por lo tanto, en esta situación, la redistribución alélica está limitada al conjunto de alelos presentes en la célula parental diploide única. (ii) Si una ascospora germina, produciendo el inicio de un clon haploide, el cambio de tipo de apareamiento ocurrirá tan pronto como una célula experimente su segunda mitosis (es decir, cuando una célula madre produzca su segundo brote) y después en todas las mitosis posteriores.

Las dos células surgidas a partir de estas mitosis (madre e hija) expresan el tipo sexual opuesto a la célula antes de la mitosis. Como el cambio no ocurre en la primera mitosis de un brote (Cosma, 2004) y las divisiones celulares se vuelven asincrónicas rápidamente, el clon haploide completo surgido de una sola ascospora contiene 50% de células de cada tipo de apareamiento que pueden aparearse rápidamente con cada una, produciendo diploides homocigotos que llevan la combinación alélica de esa ascospora.

Introducción

En *S. cerevisiae* y especies de levadura relacionadas que portan en su genoma dos copias silenciosas del locus MAT (designadas cassette HML y HMR), el cambio de tipo sexual está determinada por una endonucleasa específica codificada por el gen HO que reconoce y escinde dentro de una secuencia específica del locus MAT, lo que desencadena un proceso de conversión de genes con uno de los dos casetes silenciosos que sirve como donador de información para reparar la rotura de doble cadena. (Dujon, 2005; Stoddard, 2006; Poulter et al., 2007). La razón de tal mecanismo no se entiende del todo, pero el cambio de tipo de apareamiento se ha seleccionado varias veces de forma independiente durante la evolución de levaduras, lo que sugiere un papel positivo. Si se juzga a partir de las filogenias de la especie que lo tienen, el gen HO parece haber ingresado en el genoma de una levadura ancestral de *Saccharomycetaceae*, posiblemente por transferencia horizontal, introgresión o reclutamiento interno de una inteína, después de la triplicación de los cassettes de apareamiento (Butler et al., 2004; Fabre et al., 2005). En resumen, una célula de *S. cerevisiae* haploide tiene una oportunidad de aparearse con otra célula haploide de un linaje distinto solo si ha escapado del apareamiento con sus hermanas de la misma tétrada meiótica y del apareamiento con sus hermanas isogénicas surgidas desde la misma ascospora. A partir del análisis comparativo de genomas de varias cepas de *S. cerevisiae*, se ha estimado que esta levadura experimenta un cruce con una frecuencia tan baja como 10^{-5} en relación con el número total de generaciones (Ruderfer et al., 2006). Se obtuvo una cifra similar para *S. paradoxus*, la especie silvestre más cercanamente relacionada con *S. cerevisiae* (Tsai et al., 2008).

3. Estructura celular

Las levaduras muestran gran diversidad con respecto al tamaño, forma y color de la célula. Incluso de forma individual, en las células de una cepa pura se puede observar una morfología heterogénea. Además, es posible inducir grandes alteraciones en la morfología celular individual al cambiar las condiciones físicas o químicas durante el crecimiento. El tamaño de una célula

de levadura varía ampliamente: algunas levaduras pueden tener solo de 2 a 3 μm de longitud, mientras que otras especies pueden alcanzar longitudes de 20 a 50 μm . El ancho de la célula es menos variable, aproximadamente de 1 a 10 μm . Bajo el microscopio, las células de *S. cerevisiae* se observan como estructuras ovoides o elipsoidales y se aprecia que se encuentran rodeadas por una pared celular bastante gruesa (Figura I.3). Los valores medios para el rango del diámetro grande son entre 5 y 10 μm , y para el diámetro pequeño son entre 1 y 7 μm . El tamaño de las células en las cepas industriales es generalmente más grande que en cepas de laboratorio. El tamaño celular promedio de *S. cerevisiae* también aumenta con la edad. Con respecto a la forma de la célula, muchas especies de levadura son elipsoidales u ovoides. Algunas, como *Schizosaccharomyces*, son cilíndricas con extremos semiesféricos. *C. albicans* y *Yarrowia lipolytica*, por ejemplo, son principalmente filamentosas (pseudohifas). También hay levaduras esféricas (como especies de *Debaryomyces*) o con formas alargadas (como muchas levaduras dependiendo de las condiciones de crecimiento).

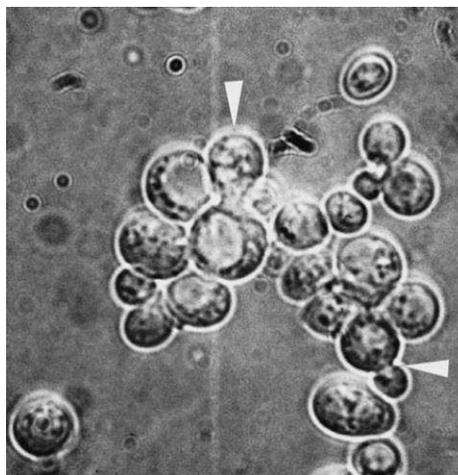


Figura I.3. Células de *S. cerevisiae* bajo el microscopio. Las flechas indican células en gemación (Feldmann y Branduardi, 2012).

En una célula de *S. cerevisiae*, excepto por una pared celular rígida, encontraremos todas las estructuras orgánulares de organismos eucariotas multicelulares (Figura I.4). Gracias a este hecho, *S. cerevisiae* se convirtió en el

Introducción

sistema modelo preferido en muchas áreas de investigación básica de biología molecular.

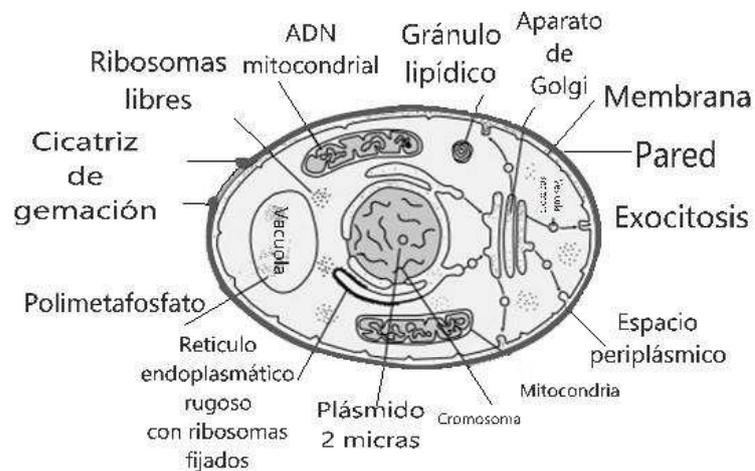


Figura I.4. Esquema de una célula de levadura. Adaptado de (Ribéreau-Gayon et al., 2017).

3.1 Pared celular y membrana plasmática

Tanto la pared celular como la membrana plasmática son de gran interés en la adaptación de las levaduras industriales a los diferentes estreses, tales como estrés por etanol o temperatura de fermentación.

La pared celular es una estructura rígida de aproximadamente 100-200 nm de espesor y constituye alrededor del 25% de la masa seca total de la célula. La pared celular (Figura I.5) está compuesta de cuatro clases de macromoléculas: glicoproteínas altamente glicosiladas ("manoproteínas"), $\beta(1,6)$ -glucano, $\beta(1,3)$ -glucano y quitina. Sin embargo, la composición de la pared celular está sujeta a una considerable variación según la composición del medio y las condiciones ambientales (Ruiz-Herrera et al., 2006).

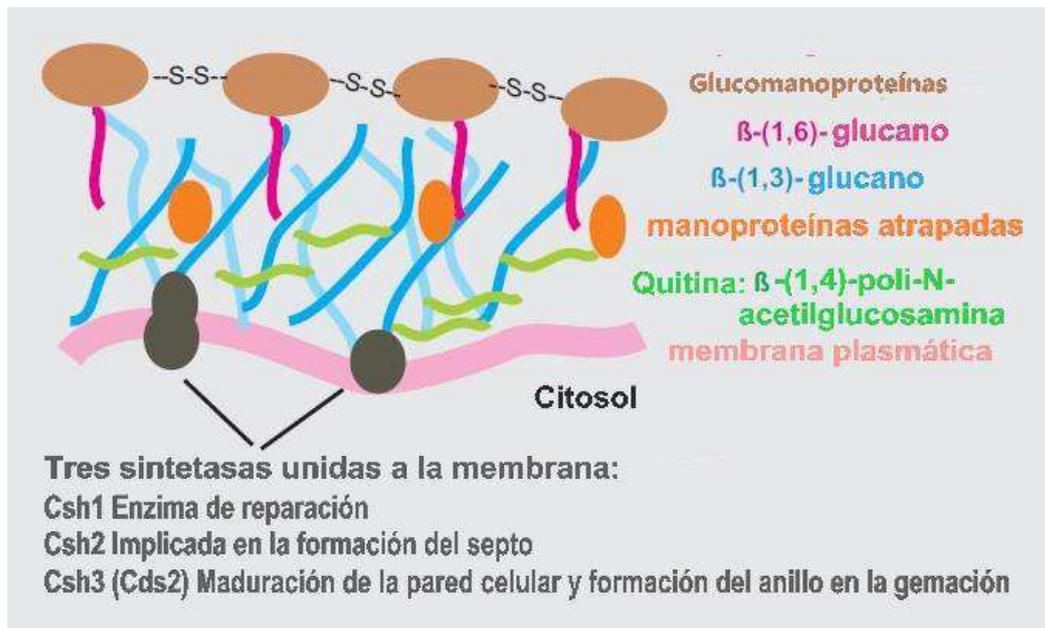


Figura I.5. Representación esquemática de la pared celular de una levadura (Feldmann y Branduardi, 2012).

La pared celular protege contra daños mecánicos y el ingreso de material no deseado, por lo que es altamente importante para asegurar la existencia de la célula. Por otro lado, la pared celular no es una jaula inflexible, sino que debe adaptarse al cambio de forma de la célula durante el crecimiento y la propagación de manera controlada. En la Tabla I.1 se muestran las principales diferencias en la composición de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, que como se mencionó anteriormente, los valores pueden cambiar dependiendo de la composición del medio y las condiciones ambientales.

Por otra parte, el modelo representado en la Figura I.5 no puede ser aceptado o refutado directamente, ya que ningún otro hongo ha tenido tanta profundidad en los análisis bioquímicos, genéticos y genómicos que han tenido las paredes celulares de *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Xie y Lipke, 2010).

Introducción

Tabla I.1. Composición de la pared celular de *S. cerevisiae* y *C. albicans* creciendo en forma de levadura (Ruiz-Herrera et al., 2006).

<i>Peso seco de la pared celular</i>		
<i>(%)</i>		
Macromolécula	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
Manoproteínas	50	35 – 40
$\beta(1,6)$ -Glucano	5	20
$\beta(1,3)$ -Glucano	40	40
Quitina	1–3	1–2

La membrana plasmática se puede describir como una bicapa lipídica, que posee muchas e importantes obligaciones estructurales y funcionales. Alberga proteínas que sirven como anclaje al citoesqueleto, enzimas para la síntesis de la pared celular, receptores para la comunicación con el medio, incluyendo el control osmótico y los transportadores selectivos de compuestos que entran o salen de la célula. La membrana plasmática de *S. cerevisiae* tiene un grosor de aproximadamente 7.5 nm, con invaginaciones ocasionales que sobresalen en el citoplasma. Los componentes lipídicos comprenden principalmente fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y proporciones menores de fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol) así como esteroides (principalmente ergosterol y zimosterol). Al igual que la pared celular, la membrana plasmática cambia tanto estructural como funcionalmente según las condiciones de crecimiento. Estos cambios en la composición de la membrana plasmática pueden ocurrir como una respuesta de adaptación a las

condiciones del medio. (Novo et al., 2003) analizaron los cambios en el contenido de ácidos grasos en la membrana de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* a bajas temperaturas y observaron que la fluidez óptima de la membrana a bajas temperaturas fue regulada por los cambios en el grado de insaturación de la membrana en *S. cerevisiae*, mientras que en *S. bayanus* no se observó ningún cambio en el porcentaje de ácidos grasos insaturados a distintas temperaturas de crecimiento, pero se observó que la concentración de ácidos grasos de cadena media fue superior a bajas temperaturas de fermentación. Sin embargo, en un estudio realizado por Tronchoni et al., (2012), tratando de explicar la mejor adaptación de *S. kudriavzevii* a crecer a bajas temperaturas, analizaron la composición de tres cepas de *S. kudriavzevii* a diferentes temperaturas de crecimiento y las compararon con cepas comerciales de *S. cerevisiae* y dos híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* y observaron un incremento general en los ácidos grasos de cadena media, triacilglicéridos, ésteres, esterol y escualeno y una disminución en la longitud de cadena de los ácidos grasos, ácido fosfatídico y en la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina a bajas temperaturas. Por otra parte, también se han descrito cambios en la composición de la membrana plasmática relacionada con la tolerancia al etanol, así existe una correlación entre la resistencia al etanol y el grado de insaturación de ácidos grasos (AG) de membrana en *S. cerevisiae* (Thomas et al., 1978; Alexandre et al., 1994; Ding et al., 2009) para atenuar el efecto de fluidificación de membrana (Alexandre et al., 1994; You et al., 2003). Arroyo-López et al., (2010) analizaron la composición celular de ácidos grasos (AG) y esterol de tres cepas pertenecientes a diferentes especies de *Saccharomyces* y encontraron que la diferencia más importante fue la relación de ácidos grasos insaturados-ácidos grasos, siendo mayor para las cepas de la especie más tolerante al etanol como es *S. cerevisiae*, seguida de cepas de *S. bayanus* y *S. kudriavzevii*. Además, Navarro-Tapia et al., (2018) confirmaron los cambios en la composición de la membrana plasmática al estudiar la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en levaduras sometidas a estrés por etanol.

Introducción

4. Características metabólicas: fermentación alcohólica

En los procesos de elaboración de bebidas fermentadas tales como el vino o la cerveza, la capacidad para degradar carbohidratos, generalmente moléculas de seis carbonos (C6) como la glucosa a compuestos de dos carbonos (C2) como el etanol, sin oxidarlos completamente a CO₂ es la característica fisiológica de mayor importancia en las levaduras utilizadas. Incluso en presencia de oxígeno, tal conversión se realiza por medio de la fermentación alcohólica, cuya reacción se simplifica:



En la fermentación alcohólica, entre el 90-95 % de los azúcares se convierte en etanol y dióxido de carbono y tan solo un 1-2 % en material celular y un 4-9 % en metabolitos secundarios como glicerol, ácido acético, alcoholes superiores y ésteres (Boulton et al., 1996).

Los azúcares pueden ser degradados por las levaduras utilizando dos rutas metabólicas: fermentativa y oxidativa. En la glicolisis, común en ambos procesos, los azúcares se metabolizan a piruvato. En la ruta fermentativa, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y este es reducido a etanol, pero no en la ruta respiratoria, en la cual el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa en presencia de la coenzima A dentro de la mitocondria. La respiración puede realizarse en bajas concentraciones de azúcar y en presencia de oxígeno. Sin embargo, incluso en presencia de oxígeno y para grandes concentraciones de azúcar, las levaduras metabolizan los azúcares por la ruta fermentativa. Este fenómeno se conoce como efecto Crabtree (Ribéreau-Gayon, 1975). Las levaduras denominadas Crabtree-positivas son capaces de acumular etanol incluso en presencia de oxígeno, como *S. cerevisiae* y *S. pombe*, mientras que las denominadas Crabtree-negativas degradan azúcares a CO₂, como *K. lactis* y *C. albicans* (Pronk et al., 1996). Mientras se lleva a cabo la producción de etanol, la energía necesaria para el crecimiento se consigue de la glicolisis y

las rutas fermentativas, más que por respiración oxidativa (Figura I.6). Cuando la glucosa se agota y se acumula el etanol, cambia el metabolismo de las levaduras Crabtree-positivas y el etanol se convierte en sustrato, el cual se degrada en presencia de oxígeno.

Gracias a la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh), la levadura es capaz de reciclar en NADH en la conversión de acetaldehído a etanol durante la fermentación (aeróbica o anaeróbica), y puede hacerlo en ambas direcciones (acetaldehído a etanol y etanol a acetaldehído), aunque con distintas eficiencias catalíticas. En *S. cerevisiae*, la actividad Adh está codificada por dos genes que surgieron por un evento de duplicación génica, *ADH1* se expresa constitutivamente, mientras que *ADH2* se expresa solamente cuando la concentración de azúcar es muy baja. Esta capacidad de *S. cerevisiae* y de sus parientes más cercanos para fermentar la glucosa y acumular etanol incluso en presencia de oxígeno forjaron las bases de la estrategia de producción de etanol “producir-acumular-consumir”, que proporcionó al antepasado de la levadura *Saccharomyces*, la superioridad sobre sus competidores, ya que el etanol es tóxico para la mayoría de los microorganismos. *Saccharomyces* podrá imponerse a sus competidores al matarlos por medio de la producción de etanol, y posteriormente, podrá consumir ese etanol cuando las exigencias nutricionales lo requieran (Piskur et al., 2006).

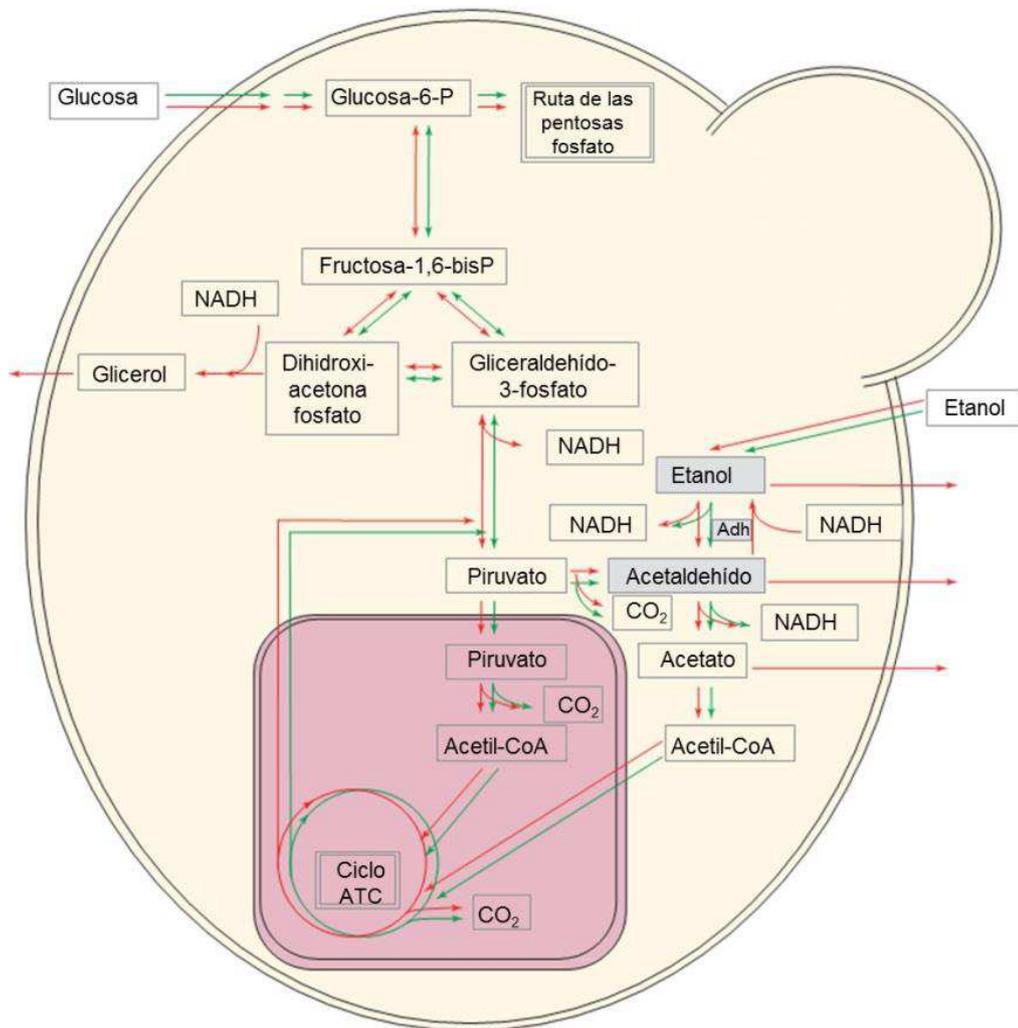


Figura I.6. Esquema de las rutas principales del metabolismo del carbono. Rutas envueltas en la asimilación de glucosa y etanol bajo condiciones aeróbicas resaltando las diferencias entre una levadura Crabtree-positiva, *Saccharomyces cerevisiae* (flechas rojas), la cual acumula etanol, y una levadura Crabtree-negativa, *Kluyveromyces lactis* (flechas verdes), la cual degrada hexosas directamente hasta CO₂. La conversión entre acetaldehído y etanol, catalizada por un enzima alcohol deshidrogenasa, Adh, está marcada en gris. Abreviaturas: ciclo ATC, ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Adaptado de Piskur et al., 2006.

5. Características de las levaduras industriales

5.1 Condiciones de crecimiento

Las cepas industriales de levadura comparten la capacidad general de crecer en diferentes estreses, como un pH bajo, poca disponibilidad de nutrientes, altas concentraciones de etanol y fluctuaciones en la temperatura. En comparación, los aislados no industriales, como las cepas de laboratorio, se han seleccionado para un crecimiento rápido y constante en medios de

laboratorio ricos en nutrientes, lo que produce resultados fenotípicos marcadamente diferentes en comparación con sus parientes industriales (Weisman et al., 1987). Como ejemplo, la cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* S288, no puede crecer a pH bajo y alta osmolaridad y, por lo tanto, no puede utilizarse para hacer vino. Esta es una clara diferencia entre las cepas industriales y no industriales de *S. cerevisiae*, sin embargo, existen numerosas diferencias sutiles no solo entre las cepas industriales, sino también entre las cepas utilizadas en la misma industria (Lambrechts y Pretorius, 2000), destacando la diversidad genética general encontrada en esta especie.

6. Diversidad genética en *Saccharomyces cerevisiae*

El alcance de la biodiversidad genética en las cepas de *S. cerevisiae* ha sido objeto de estudio en los últimos años. Las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fuentes ecológicas y geográficamente diversas, generalmente demuestran divergencia genética asociada con el tipo de hábitat, más que con el origen geográfico (Fay y Benavides, 2005; Legras et al., 2007; Liti et al., 2009; Novo et al., 2009; Schacherer et al., 2009). Las cepas de *S. cerevisiae* asociadas a los viñedos y la producción de vino denominadas cepas "vínicas", a menudo forman un grupo genéticamente diferenciado separado de las cepas "silvestres" aisladas de hábitats de suelo y roble y las cepas de otras fermentaciones, como la del vino de palma y el sake (Fay y Benavides, 2005; Legras et al., 2007; Liti et al., 2009; Peter et al., 2018; Schacherer et al., 2009). La divergencia genética entre las cepas no-vínicas y vínicas, estas últimas forman un grupo muy homogéneo teniendo en cuenta la variabilidad genética y se ha sugerido que las cepas vínicas tienen como origen cepas de *S. cerevisiae* silvestre (Fay y Benavides, 2005) y más concretamente de cepas silvestres de bosques del mediterráneo (Almeida et al., 2015).

Legras et al., (2007) analizaron la diversidad genética de 651 cepas de 56 orígenes geográficos diferentes distribuidos por todo el mundo. Los datos agruparon las levaduras según su fuente de origen observando grupos claros que incluían las levaduras aisladas de pan, cerveza, vino y sake. Casi el 95%

Introducción

de las cepas de levaduras vínicas se encontraban en un subgrupo que incluía cepas de sidra.

Estos resultados sugieren que existe una asociación entre el hombre y la levadura vínica a través de los siglos y que la levadura siguió las migraciones del hombre y de la vid como un miembro común de la flora de la vid. En otro gran estudio, (Liti et al., 2009), secuenciaron el genoma de más 70 aislados de *S. cerevisiae* y su especie más cercana, *S. paradoxus*. Las cepas aisladas de *S. cerevisiae* mostraron menos diferencias y fueron comparables a una sola población de *S. paradoxus*. En este estudio también se demostró que la estructura poblacional de *S. cerevisiae* consiste de unos pocos linajes bien definidos y geográficamente aislados, y muchos mosaicos diferentes de estos linajes (Figura I.7), siendo el linaje más claro el formado por los aislados vínicos.

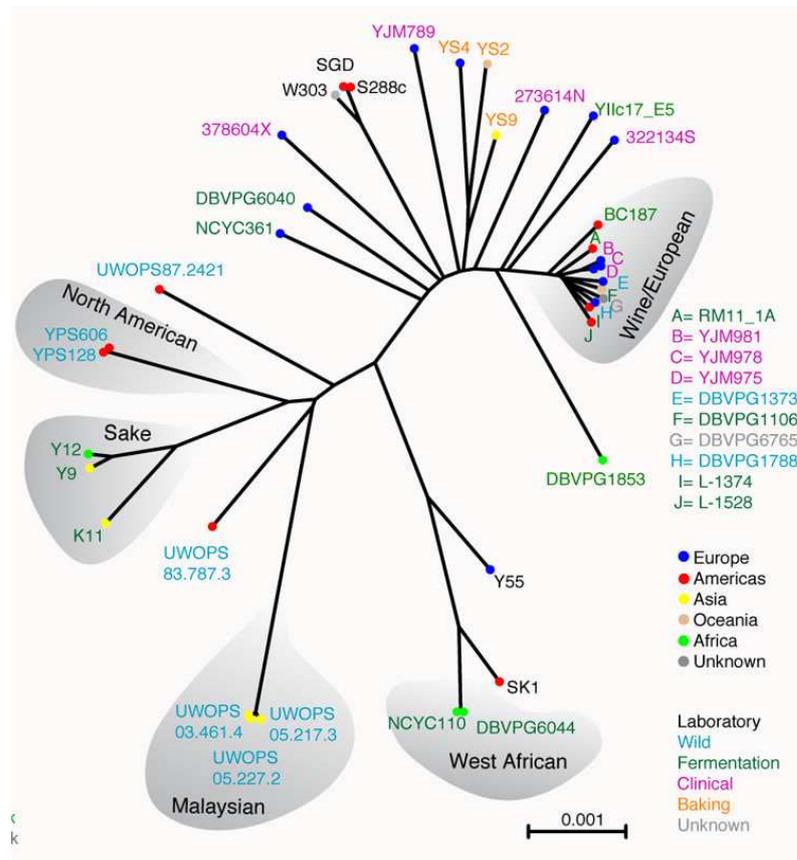


Figura I.7. Cepas de *S. cerevisiae*. Cepas de *S. cerevisiae* con linajes limpios sombreados en color gris, con color que indica la fuente (nombre) y el origen geográfico (puntos) (Liti et al., 2009).

Schacherer et al., (2009) reportaron un estudio de una colección diversa de 63 cepas de *S. cerevisiae* obtenidas de diferentes nichos ecológicos (cerveza, pan, viñedos, individuos inmunocomprometidos, diversas fermentaciones y aislados ambientales). Los análisis mostraron al menos tres subgrupos distintos basados en la fuente de la cual se aislaron las cepas (Figura I.8). Una vez más, en este trabajo, la mayoría de las cepas vínicas aparecieron como miembros de una única subpoblación bien definida. Las cepas vínicas mostraron el nivel más bajo de polimorfismo entre los grupos. En esta subpoblación también se agruparon cepas de destilería, ambientes naturales (suelo, granos de cacao, etc.), así como aislados clínicos.

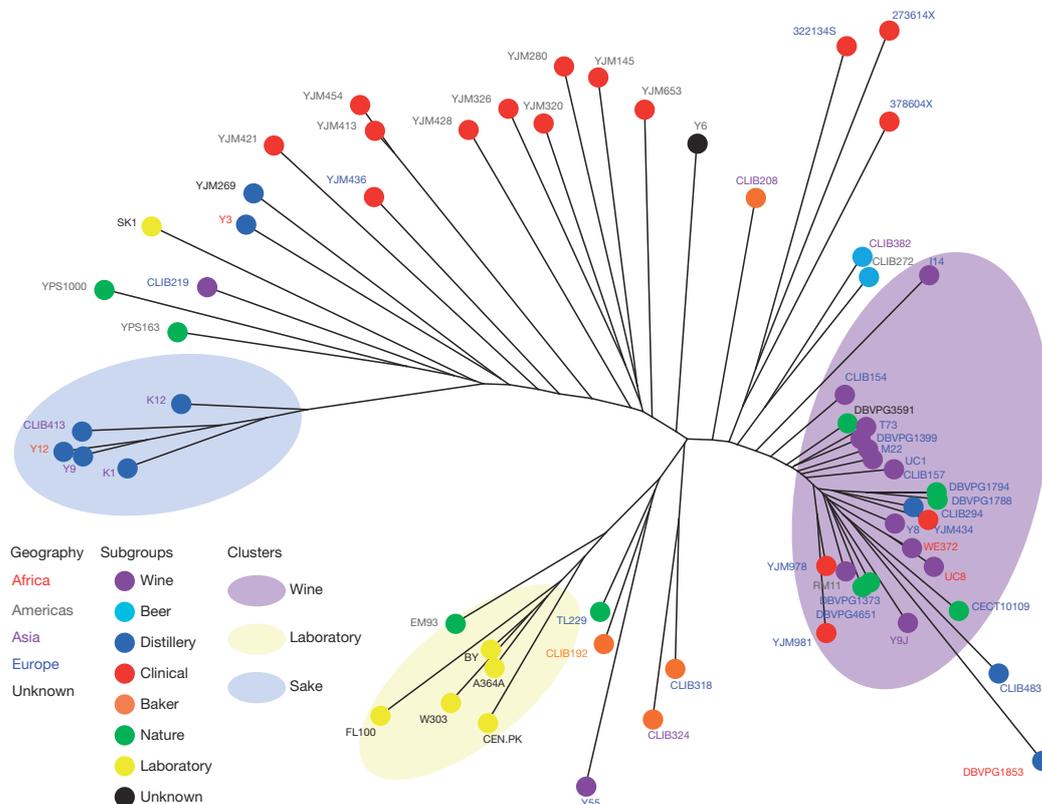


Figura I.8. Árbol Neighbor-Joining de 63 cepas *S. cerevisiae*. El color de la fuente del nombre de la cepa indica el origen geográfico y el color del círculo indica el nicho ecológico tal como se indica en la figura (Schacherer et al., 2009).

En otro estudio, donde se incluían aislados de Asia, se ha observado que la mitad de las cepas de *S. cerevisiae* secuenciadas se ubican en varios linajes distintos (Wang et al., 2012). Aunque aún no se encuentra disponible la información completa del genoma para los aislamientos chinos de *S. cerevisiae*, parecen exhibir una estructura de población fuerte, con una

Introducción

cantidad combinada de la variación genética doblemente identificada en los aislados de *S. cerevisiae* obtenidos del resto del mundo (Wang et al., 2012).

Recientemente, Peter et al., 2018 realizaron la secuenciación del genoma completo de 1.011 aislados de *S. cerevisiae* lo que ha permitido tener una visión más global de la estructura poblacional de esta especie (Figura I.9).

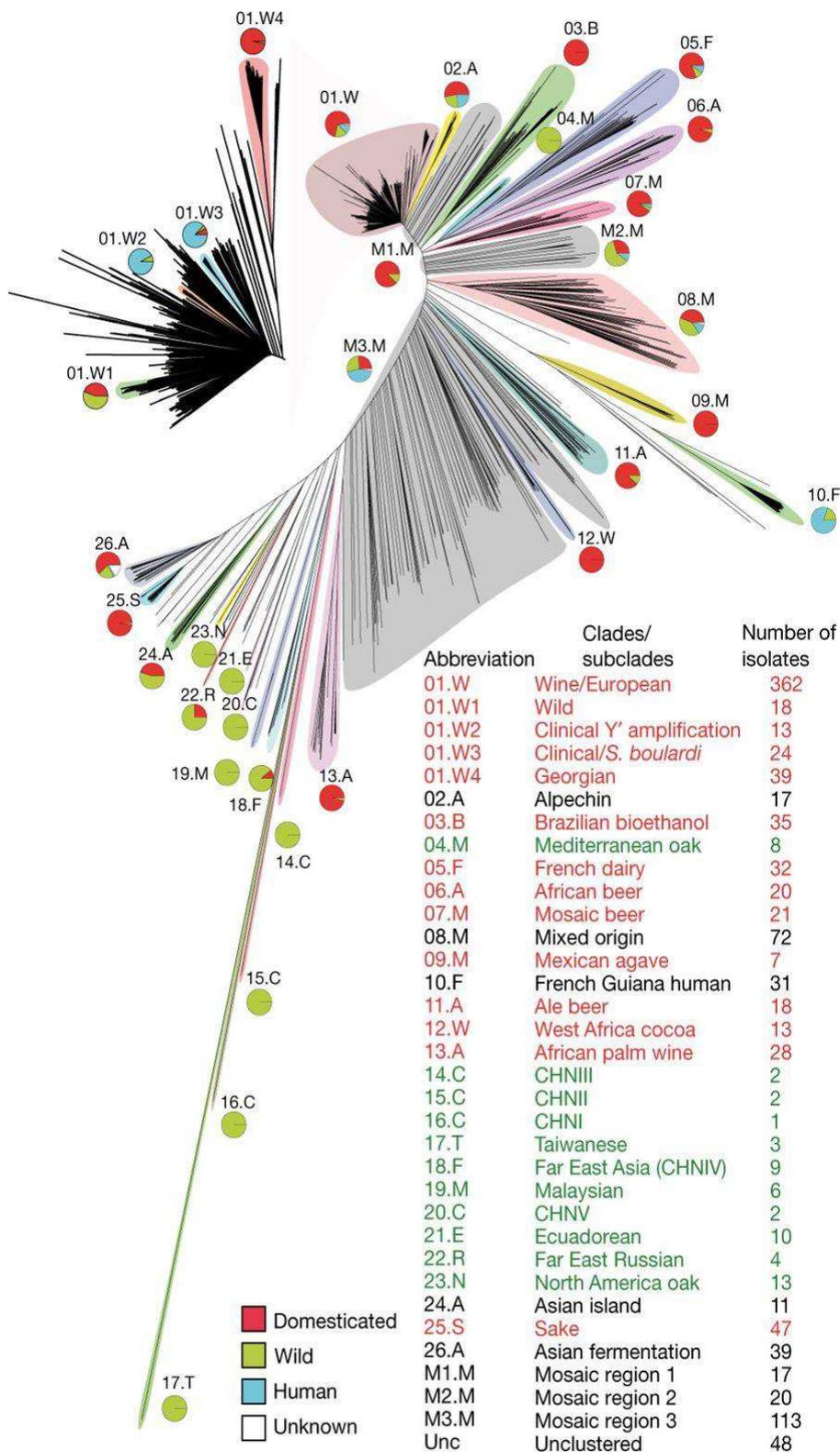


Figura I.9. Árbol filogenético Neighbor-Joining de 1011 cepas de *S. cerevisiae*. Este análisis, junto a un análisis poblacional, permitió a Peter et al. (2018) definir 26 linajes puros y 3 grupos mosaico. Los gráficos circulares representan el origen ecológico de las cepas de cada linaje.

7. Mecanismos de duplicación de genes y sus consecuencias evolutivas

Tal y como hemos comentado anteriormente, *S. cerevisiae* es la principal especie encontrada entre las levaduras fermentativas. Sin embargo, el hecho de que otras especies del género *Saccharomyces*, como *S. bayanus*, *S. uvarum* o *S. paradoxus* también hayan sido aisladas de fermentaciones hace pensar que el proceso de “domesticación” o adaptación a las condiciones encontradas en los procesos fermentativos, ocurrió varias veces (Fay y Benavides, 2005; Legras et al., 2007). Diferentes mecanismos moleculares se han descrito relacionados con la domesticación de las levaduras industriales (Querol et al., 2003a, 2003b; Barrio et al., 2006). En los siguientes apartados se analizan los más relevantes.

7.1 Renovación genómica

En 1994, Robert Mortimer propuso la "Hipótesis de Renovación del Genoma" para explicar los patrones de variación genética observados en *Saccharomyces cerevisiae* (Mortimer, 2000; Mortimer et al., 1994).

Mortimer y sus colaboradores observaron que la mayoría de las cepas de levadura aisladas de viñedos eran diploides y heterocigotas en uno o más loci. La gran mayoría también fueron homotáticas, lo que significa que las células haploides producidas a partir de estas cepas eran capaces de someterse a un cambio de tipo sexual seguido de un apareamiento entre madre e hija. Este proceso, conocido como autodiploidización, produce células diploides que son homocigóticas, excepto en el locus del tipo de apareamiento. También propusieron una correlación negativa entre el número de heterocigosidades detectables en levaduras aisladas de viñedos y el porcentaje de esporas viables producidas; los aislados de levaduras homocigotas tenían casi un 100% de viabilidad de esporas, mientras que los aislados heterocigotos mostraban una clara evidencia de alelos perjudiciales o a veces letales. Finalmente, se dedujo que los aislados que eran homocigotos derivaban de ancestros heterocigotos a través de una autodiploidización.

Dichos autores propusieron que estas observaciones podrían explicarse por un escenario evolutivo que implica largos períodos de reproducción por clonación en el que las cepas diploides acumulan alelos recesivos, principalmente perjudiciales en un estado heterocigótico. Postularon que los ciclos sexuales raros que involucran la meiosis seguidos por el cambio de tipo de apareamiento y la autodiploidización facilitan la pérdida de alelos perjudiciales y fijarían los beneficiosos, produciendo con ello la "Renovación del Genoma".

La hipótesis de la "Renovación del Genoma" se basa en la suposición de que el 'estado fundamental' es la homocigosidad genómica y, por lo tanto, el número de loci heterocigotos que se acumulan entre los períodos de autopolinización debería ser bajo. Sin embargo, con los datos recientes obtenidos con las secuencias de genomas completos de un gran número de cepas de ambientes diferentes, incluyendo el vínico (ver apartado "Diversidad genética en *Saccharomyces cerevisiae*"), este concepto no queda tan claro.

7.2 Duplicaciones

La duplicación de genes es la fuente más importante de nuevos genes en eucariotas. Las duplicaciones génicas pueden ser producidas por diferentes mecanismos que puede suponer la duplicación de un solo gen o grupo de genes adyacentes (Koszul et al., 2006), la duplicación de cromosomas (aneuploidías) (Hughes et al., 2000), o la duplicación de todo el genoma, llamado poliploidía (Wolfe y Shields, 1997).

7.2.1 Duplicaciones de un gen o de segmentos génicos

La duplicación génica se puede dar en un gen, o en un grupo de genes adyacentes, lo que se llama una duplicación segmental. En el genoma de *S. cerevisiae* se han identificado 265 familias multigénicas o grupos de genes idénticos o semejantes. Incluso se ha detectado una familia con 108 miembros (Llorente et al., 2000), lo que indica que se han producido una serie de duplicaciones génicas sucesivas.

Introducción

La redundancia de genes se mantiene si proporciona una ventaja evolutiva, tal como un incremento en la dosis génica, o si uno de los genes duplicados mantiene su función y el otro adquiere mutaciones que generan una función ventajosa (neo-funcionalización) (Force et al., 1999; Lynch y Force, 2000). Sin embargo, esto es muy poco probable (Wagner, 1998), pues al acumular mutaciones, lo más probable es que se dé una pérdida de función, convirtiéndose en un pseudogen (pseudogenización o no-funcionalización).

Para que los dos miembros de un par complementario de genes se mantengan, se propuso un proceso alternativo, la subfuncionalización (Force et al., 1999). Este proceso implica que los dos miembros de cada uno de los duplicados adquieran mutaciones degenerativas, de pérdida de función, que sean complementarias. Así, los dos duplicados se deben mantener para realizar la función que presentaba un solo gen ancestral.

La mayoría de las duplicaciones de un gen y las familias multigénicas corresponden a duplicaciones de repeticiones directas en tándem; en general, las familias multigénicas están localizadas en regiones subteloméricas, pero hay algunas dispersas en el genoma. Como ejemplo de este tipo de familias multigénicas son los genes involucrados en la asimilación y utilización de azúcares: *MEL*, *SUC*, *MGL* y *MAL*.

La mayoría de las familias multigénicas están involucradas en el metabolismo secundario, por lo que los genes no son esenciales pero tienen un papel importante en la adaptación a nuevos ambientes (Llorente et al., 2000)

7.2.2 Duplicaciones cromosómicas: aneuploidias.

Otro mecanismo que puede generar nuevos genes es la duplicación cromosómica, que da lugar a aneuploidías. Este mecanismo proporciona una fuente potencial de nuevos genes, pero su consecuencia más importante e inmediata es el aumento de la dosis génica. Si bien la mayoría de las células eucariotas son diploides, es decir, todos sus cromosomas tienen el mismo número de copias, las aneuploidías se encuentran en la naturaleza, así como

en condiciones creadas por el hombre. En células aneuploides, el número de copias de uno o más cromosomas difiere del resto del genoma. La existencia de células de aneuploides estables implica que la variación del número de copias del cromosoma contribuye a la diversidad genética y fisiológica dentro de especies eucariotas y dentro de organismos en eucariotas multicelulares.

Las aneuploidías se producen por una segregación cromosómica errónea durante la meiosis o la mitosis y generan un incremento en el número de genes. Se ha postulado que las aneuploidías podrían conferir ventajas en la adaptación a ambientes externos variables, debido a un aumento de copias de genes beneficiosos o a la acción protectora de ese “exceso” de copias frente a mutaciones deletéreas (Bakalinsky y Snow, 1990; Guijo et al., 1997; Salmon, 1997). En general las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son aneuploides, con dos, tres y en menor frecuencia cuatro copias de cromosomas (disomías, trisomías y tetrasomías) (Bakalinsky y Snow, 1990).

La variación del número de copias del cromosoma también es un fenómeno importante en cepas industriales de cepas de levaduras *Saccharomyces* y cuya historia a menudo implica la domesticación prolongada y/o el mejoramiento industrial de las cepas.

Se ha postulado que las aneuploidías podrían conferir ventajas en la adaptación a ambientes externos variables, debido a un aumento de copias de genes beneficiosos o a la acción protectora de ese “exceso” de copias frente a mutaciones deletéreas (Bakalinsky y Snow, 1990; Guijo et al., 1997; Salmon, 1997). En general las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son aneuploides, con dos, tres y en menor frecuencia cuatro copias de cromosomas (disomías, trisomías y tetrasomías) (Bakalinsky y Snow, 1990).

7.2.3 Poliploidía o duplicación del genoma completo

El suceso más importante en la evolución del linaje de *Saccharomyces* fue la duplicación genómica que aconteció en uno de sus ancestros (Wolfe y Shields, 1997). La duplicación genómica generó un incremento del flujo glicolítico, causante del efecto Crabtree, debido en general a la duplicación de los genes de las enzimas de la glicólisis, y particularmente los de los transportadores de hexosas cuyo efecto es el más importante (Conant y Wolfe, 2007). La mayor capacidad de consumo de hexosas y producción en condiciones aeróbicas de etanol, tóxico para muchos microorganismos, debió suponer una gran ventaja competitiva para el ancestro de *Saccharomyces*, como lo sigue siendo en la actualidad.

Esta hipótesis permite explicar la ventaja inicial que pudo suponer la repentina duplicación del genoma en el ancestro de *Saccharomyces* que permitió un subsiguiente reajuste de los niveles de expresión y la consecuente aparición de sistemas más eficientes de respuesta y regulación del metabolismo respiro-fermentativo (Wolfe, 2004).

En el genoma de *S. cerevisiae* se ha observado la presencia de 376 pares de genes distribuidos en 55 regiones duplicadas, por lo que se ha sugerido que un suceso de duplicación genómica o poliploidización tuvo lugar en un ancestro de *S. cerevisiae* (Wolfe y Shields, 1997). Esta duplicación del genoma ocasionó la adquisición rápida de una copia extra de cada gen, pero el 88% de los genes adquiridos se perdieron por el proceso de pseudogenización. Cerca de 460 pares de genes se mantienen en el genoma de *S. cerevisiae*, pero, aproximadamente 60 pares de genes presentan signos de conversión génica, poco más de 100 pares de genes muestran neo-funcionalización, y el resto, probablemente, se mantuvieron por subfuncionalización (Kellis et al., 2004).

La poliploidización proporcionó las bases evolutivas para que las levaduras obtuvieran genes con nuevas funciones al competir por colonizar los substratos ricos en azúcares proporcionados por las plantas que producen

frutos. Un metabolismo fermentativo incluso en presencia de oxígeno (efecto “Crabtree”), con un crecimiento rápido y la producción de un compuesto tóxico, el etanol, dio ventajas competitivas al ancestro de *S. cerevisiae* (Conant y Wolfe, 2007).

7.3 Reordenamientos cromosómicos

Se producen debido a la recombinación entre pequeñas secuencias (regiones de microhomología) que se encuentran presentes en genes no homólogos. Este proceso puede generar nuevos genes quiméricos con una función diferente o puede cambiar el patrón de expresión de estos genes. Las reordenaciones cromosómicas pueden estar implicadas en los mecanismos de adaptación de las levaduras a condiciones industriales, sobre todo, en el caso de que genes importantes para el proceso industrial que la levadura lleve a cabo se “sitúen”, tras la reordenación cromosómica, bajo el efecto de promotores más fuertes que el que tenían.

Uno de los primeros ejemplos del papel de las reordenaciones en la adaptación a la fermentación vínica fue descrito por Pérez-Ortín et al., (2002). En las cepas vínicas, existe un aumento de la expresión del gen *SSU1*, transportador del anhídrido sulfuroso (antiséptico ampliamente utilizado en enología desde tiempo inmemorial) del interior celular al exterior. Este fenómeno se debe a una translocación entre los cromosomas VIII y XVI que ha situado la región codificante de *SSU1* bajo el control del promotor fuerte del gen *ECM34*, lo que lleva a un incremento de su expresión y, por tanto, confiere una mayor resistencia al anhídrido sulfuroso a las levaduras portadoras de esa translocación (Pérez-Ortín et al., 2002). Esta translocación es muy frecuente, tanto en homocigosis como en heterocigosis entre las levaduras vínicas, pero está ausente en otros tipos de levaduras, tanto panaderas, como cerveceras o de laboratorio, debido a que la utilización de anhídrido sulfuroso como antiséptico sólo se da en la producción de vinos. La importancia de este mecanismo queda demostrada posteriormente por (Zimmer et al., 2014),

Introducción

quienes observaron otra reordenación entre el cromosoma XV y XVI que también se relaciona con una mayor tolerancia al sulfito.

7.4 Formación de híbridos

Varios estudios han demostrado que las especies del género *Saccharomyces* son propensas a la hibridación interespecífica, fenómeno descrito en levaduras responsables de la fermentación, tanto de cervezas como de vinos (González et al., 2008, 2006; Arroyo-López et al., 2009; Belloch et al., 2009, 2008,; Lopes et al., 2010; Peris et al., 2012a, 2012b). Sin embargo, la presencia de híbridos interespecíficos de *Saccharomyces* no es exclusiva de ambientes de fermentación alcohólica. Peris et al., (2012a) describieron dos híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* aislados de un ambiente hospitalario y de un suplemento dietético.

El aislamiento e identificación de dobles y triples híbridos entre especies del género *Saccharomyces*, tales como *S. cerevisiae*, *S. eubayanus*, *S. kudriavzevii* y *S. uvarum* en bebidas alcohólicas, principalmente vino, cerveza y sidra ha dado lugar a diversos estudios sobre las condiciones ambientales y los mecanismos que permiten a estas especies la posibilidad de formar híbridos (Masneuf et al., 1998; Groth et al., 1999; Naumova et al., 2005; González et al., 2006; Lopandic et al., 2007; Dunn y Sherlock, 2008; Peris et al., 2012). De hecho, los híbridos interespecíficos de *Saccharomyces* se consideran un modelo ideal para el estudio de los mecanismos evolutivos y la adaptación del genoma de la levadura a condiciones de estrés (Antunovics et al., 2005; Belloch et al., 2008; Dunn y Sherlock, 2008; Peris et al., 2012).

Un interesante trabajo mostró una alta incidencia de híbridos en los viñedos junto a sus especies parentales (Le Jeune et al., 2007). Estos eventos de hibridación son recientes ya que estos híbridos aún no producen esporas viables, son asexuales y sin embargo, prevalecen por divisiones mitóticas (Le Jeune et al., 2007). Otros reportes enfatizan la gran capacidad fermentativa de híbridos naturales entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (González et al., 2006; Gangl et al., 2009). González et al., (2006) caracterizaron enológicamente los

híbridos aislados en Suiza y encontraron un excelente comportamiento a bajas y medianas temperaturas. Además, encontraron mayor producción de glicerol y menor producción de ácido acético en comparación con las especies parentales. Así mismo, reportaron que estos híbridos habían producido mayor cantidad de alcoholes superiores y mayores concentraciones de componentes aromáticos.

Se ha descrito que los híbridos comparten propiedades fisiológicas de las especies parentales, que los ayudan a sobrevivir y a desarrollarse adecuadamente bajo diferentes condiciones de estrés (Belloch et al., 2008). Tales características pueden aprovecharse en la obtención de cepas híbridas mejor adaptadas a diferentes procesos industriales o con nuevas propiedades de interés para la industria (para una revisión ver Pérez-Torrado et al., 2017, 2015).

Pérez-Través et al., (2012) han evaluado distintos procedimientos genéticos para la generación de híbridos artificiales dentro del género *Saccharomyces* para utilizarlos en procesos de fabricación de vinos, generando cepas híbridas entre especies del género *Saccharomyces*. Aunque la frecuencia en el cambio de tipo sexual y subsecuentes cruces es generalmente muy baja (Gunge y Nakatomi, 1972; Hammond, 2003), la técnica conocida como “rare-mating” ha sido la técnica propuesta por Pérez-Través et al., (2012) y ha sido utilizada para generar híbridos de interés industrial que se describirán en el apartado 10.2.2.

8. Producción de bebidas alcohólicas

Las bebidas alcohólicas son producidas por fermentación alcohólica de los azúcares contenidos en jugos de fruta o maltas. Los azúcares fermentables por las levaduras están presentes o se generan por la hidrólisis de almidones y dextrinas produciendo azúcares simples. Las bebidas fermentadas de mayor importancia son el vino y la cerveza. Sin embargo, existen muchas bebidas alcohólicas alrededor del mundo. En los próximos apartados nos centraremos en el proceso de elaboración del vino, ya que el objetivo global de este trabajo

Introducción

es la caracterización de híbridos naturales y la generación de híbridos artificiales de interés en enología.

8.1 Vino

El vino es el producto de la fermentación alcohólica del mosto de uva por medio de las levaduras. Aunque algunas veces los jugos fermentados de muchas otras frutas son llamados vinos, no tienen la misma popularidad o prestigio que tienen los vinos de uva.

La fermentación completa de un mosto por *S. cerevisiae* conduce a la producción de 8 a 15% (v/v) de etanol, y otros co-productos fermentativos tales como el glicerol (6-8 g L⁻¹), ácidos orgánicos como el acetato, el succinato y el piruvato en cantidades menores, y alcoholes superiores y ésteres (Barre et al., 1998).

8.1.1 Composición del mosto de uva

El mosto de uva es un medio en el cual todos los nutrientes se encuentran presentes desde un principio, y su concentración disminuye conforme son consumidos por la levadura, lo que puede provocar que el crecimiento pueda estar condicionado por la concentración de uno o varios nutrientes. Además de esto, la composición de los mostos, además de ser crucial para las características del producto final, condiciona la evolución del crecimiento de las levaduras.

En la Tabla 1.2 se muestran las concentraciones promedio de los principales componentes del mosto de uva, en el que podemos encontrar las siguientes sustancias o grupos de sustancias en orden de mayor a menor abundancia: agua, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, minerales, polifenoles, vitaminas y compuestos aromáticos.

Carbohidratos

El mosto de uva contiene cantidades equimolares de glucosa y fructosa (Ough, 1991) y su concentración total generalmente es de entre 170 y 220 g L⁻¹ (Ribéreau-Gayon, 2006). Esta concentración es suficiente para que se lleve a cabo una fermentación normal. Sin embargo, en mostos con más de 200 g L⁻¹ se observa una ralentización y por encima de los 250 g L⁻¹ se puede inhibir el crecimiento (Nishino et al., 1985).

Ácidos orgánicos

Es el segundo grupo de compuestos en abundancia tras los azúcares, estando su concentración comprendida entre los 9 y los 27 g L⁻¹ (Ough, 1991). Los ácidos L-tartárico y L-málico son los principales ácidos en el mosto, suponiendo el 90% de la acidez fija, mientras que el cítrico y el ascórbico se encuentran en menor cantidad.

Compuestos nitrogenados

El mosto de uva contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de la levadura durante la fermentación del vino. La principal fuente de carbono, y la energía para el crecimiento, es proporcionada por los azúcares de la uva, generalmente presentes en gran exceso (a menudo superior al 20% p/v) respecto a la necesaria para un máximo crecimiento.

Por el contrario, el contenido total de nitrógeno (N) del jugo de uva varía 40 veces, de 60 a 2400 mg L⁻¹ (Ough y Amerine, 1988) y por lo tanto, puede haber crecimiento limitado. Además, el nitrógeno está presente como una gama compleja de compuestos. Cantidades de compuestos de nitrógeno como vitaminas, nucleótidos (Amerine et al., 1980) y nitratos (Ough y Crowell, 1980) están presentes. Varias aminas también pueden estar presentes, algunas como resultado de la actividad microbiana (Daudt y Ough, 1980). Aminoácidos, amonio, péptidos y proteínas son los compuestos de nitrógeno más importantes cuantitativamente.

Introducción

Compuestos aromáticos

Dos tipos de compuestos aromáticos confieren aroma al mosto donde las levaduras pueden tener un papel: compuestos derivados de la uva (terpenos, carotenoides y pirazinas) y compuestos que surgen durante la extracción de sabor y pretratamientos fermentativos (alcoholes y ésteres principalmente).

Tabla I.2. Composición cuantitativa promedio del mosto mostrada por grupos de compuestos (Moreno and Peinado 2012).

Constituyente	g L ⁻¹
Agua	780 - 850
Azúcares	150 – 250
Ácidos orgánicos	14 – 17
Compuestos nitrogenados	4 – 7
Polisacáridos	3 – 5
Minerales	0.8 – 2.8
Polifenoles	0.5
Vitaminas	0.25 – 0.8
Compuestos aromáticos	<0.5

8.1.2 Demandas en el sector enológico

Toda levadura comercial debe poseer una buena capacidad fermentativa y producir vinos con cierta calidad organoléptica. En la industria, cada vez más, se buscan aquellas levaduras que posean, además de estas, nuevas características de interés para el sector, que mejoren u otorguen características

diferenciales al producto, o que resuelvan algunos de los problemas tecnológicos que tiene el sector.

Una de las principales demandas del sector vitivinícola está asociada a resolver los problemas planteados con el cambio climático, que tiene como consecuencia la obtención de vinos con mayor contenido alcohólico. Por otro lado, en los últimos años hay una tendencia a fermentar a bajas temperaturas, cuya finalidad es producir vinos altamente aromáticos.

Reducción del grado alcohólico e incremento de la concentración de glicerol.

El alcohol más abundante en el vino es el etanol, este juega un papel importante en la estabilidad y envejecimiento del vino, así como en formar parte de las características sensoriales del mismo. El etanol actúa como disolvente de taninos y pigmentos, y puede influir en la concentración de ciertos antioxidantes (flavonoides) extraídos durante el proceso de vinificación (Soleas et al., 1997). Pese a este papel beneficioso, las altas concentraciones de etanol pueden afectar negativamente a las propiedades sensoriales del vino (Pretorius y Høj, 2005).

En los últimos 15 años, el contenido en etanol de los vinos españoles, franceses e italianos ha aumentado cerca del 3% (del 11-12% v/v al 13-14% de etanol); este aumento se debe, principalmente, al calentamiento global, al cultivo de variedades de uva más dulces y a la recogida tardía de las uvas. De forma opuesta, los consumidores demandan, cada vez más, vinos con un menor contenido en etanol.

Aunque la recogida temprana de la uva o el cultivo en regiones de clima frío pueden limitar el contenido en etanol del vino se han desarrollado varias técnicas para disminuir el contenido de este (Michnick et al., 1997; Pickering, 2000; de Barros Lopes et al., 2002; Malherbe et al., 2003), adaptando el vino a las exigencias del mercado. Estas se pueden dividir en tres tendencias:

Introducción

reducción del etanol, reducción de los azúcares fermentables y utilización de cepas con un menor rendimiento en etanol.

La reducción del contenido en etanol de los vinos se ha abordado con diferentes técnicas, como son la destilación, la evaporación, los procesos a través de membrana (diálisis, ósmosis reversa y contactores de membrana) (Bui et al., 1986; Plaza et al., 1999; Takács et al., 2007; Massot et al., 2008; Gómez-Labanda et al., 2009; Varavuth et al., 2009; Catarino y Mendes, 2011; Diban et al., 2013, 2008), la adsorción en resinas o geles y la extracción mediante solventes orgánicos o dióxido de carbono supercrítico (Pickering, 2000; Ruiz-Rodríguez et al., 2010). De todas estas técnicas, la ósmosis inversa (Bui et al., 1986; Massot et al., 2008; Varavuth et al., 2009) y la destilación en vacío mediante columna de cono giratorio (destilación SCC) (Diban et al., 2008), son las más utilizadas. Pese a su utilización, son técnicas difíciles de llevar a cabo, son económicamente costosas, además desde un punto de vista aromático son muy pobres, y no gusta a los consumidores.

La segunda de las alternativas trata de eliminar parte de los azúcares fermentables presentes en el mosto utilizando enzimas exógenas como la glucosa oxidasa (GOX). El uso de esta enzima fue introducido por Heresztyn, 1987 y Villettaz, 1987, 1986). Esta enzima metaboliza la glucosa en ácido glucónico (Pickering, 2000), liberando peróxido de hidrógeno, el cual tiene un efecto antimicrobiano (Malherbe et al., 2003), confiriendo mayores beneficios al uso de esta enzima. El uso de GOX ha sido ampliamente estudiado (Malherbe et al., 2003) y actualmente se presentan dos alternativas a su utilización, la adición del enzima a los mostos o su expresión, mediante ingeniería genética, en levaduras vínicas. También se pueden eliminar parte de los azúcares fermentables mediante la nanofiltración de los vinos (García-Martín et al., 2010). A pesar de todo, tiene problemas su uso, ya que, por una parte se libera H_2O_2 , se requiere aireación, lo que tiene un impacto en la oxidación de los vinos, en el crecimiento de algunos microorganismos, afectando más claramente a la bacteria responsable de la fermentación maloláctica (*Oenococcus oeni*) y a los aromas del vino (Röcker et al., 2016).

Por último, la otra tendencia existente para reducir el contenido en etanol de los vinos se basa en la utilización de cepas de levaduras con un menor rendimiento en etanol. Estas cepas pueden ser tanto cepas naturales que producen, por sí mismas, poca cantidad de etanol, como modificadas con técnicas de ingeniería genética para tal fin (Pickering, 2000). La modificación genética de estas cepas ha llevado dos vías, desviar la síntesis de etanol hacia la producción de glicerol sobreexpresando genes como *GPD1* (Michnick et al., 1997; Nevoigt y Stahl, 1997; Remize et al., 1999; Nevoigt, 2008), o convertir el piruvato en etanol y lactato, simultáneamente, al expresar el gen de la lactato deshidrogenasa en estas levaduras (Dequin y Barre, 1994; Remize et al., 1999).

Las cepas naturales que producen menor rendimiento en etanol suelen producir mayor cantidad de glicerol, y son seleccionadas atendiendo a ambas propiedades. En alguno de los casos, este bajo rendimiento en la producción de etanol puede deberse a que se trate de levaduras glicolíticamente deficientes (Loira et al., 2012). Recientemente, y siguiendo esta línea, se ha propuesto la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* que reducirían los niveles de este alcohol mediante su respiración (Gonzalez et al., 2013; Quirós et al., 2014). Por ejemplo, cepas de la especie *Metschnikowia pulcherrima* y dos especies del género *Kluyveromyces* mostraron buenos resultados, mientras que cepas pertenecientes al género *Saccharomyces*, utilizadas de este modo, producían elevados niveles de ácido acético (Quirós et al., 2014). El uso secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* ha dado buenos resultados en la producción de vinos Chardonnay y Shiraz (Contreras et al., 2014).

En este sentido, en los últimos años, nuestro grupo de trabajo ha propuesto la utilización de otras especies del género *Saccharomyces* tales como *S. uvarum* y *S. kudriavzevii*. Estas especies, tal y como hemos comentado en el apartado 2.1, se caracterizan por producir más glicerol y por tanto producen menos etanol que *S. cerevisiae*. A pesar de su interés por las propiedades enológicas (también producen más aromas secundarios), estas

Introducción

especies tienen problemas de implantación en algunas condiciones de fermentación, en fermentaciones con temperaturas superiores a 22°C, pero a bajas temperaturas esta especie puede desplazar a cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Alonso-del-Real et al., 2017b). A nivel de aplicación, se ha trabajado en determinar las condiciones de implantación a nivel industrial de estas especies mediante la coinoculación, aumentando la proporción de estas especies en la inoculación o mediante microoxigenación (Alonso-del-Real et al., 2017a) o incluso mediante el desarrollo de modelos matemáticos que puedan predecir las condiciones de fermentación óptimas para que se reduzca el etanol (Henriques et al., 2018).

En una fermentación vínica, detrás del etanol y el dióxido de carbono, el glicerol es, cuantitativamente, el producto más importante de la fermentación, además como ya se ha comentado anteriormente, una mayor síntesis de glicerol supone un menor rendimiento en etanol. Debido a que no es una sustancia volátil, no contribuye al aroma del vino, pero sí que contribuye, de forma indirecta a su calidad sensorial. Su sobreproducción da lugar a vinos con una mayor suavidad en boca y una mayor complejidad. Debido al efecto favorable del glicerol en la calidad del vino, se ha enfatizado en los beneficios de un incremento en la producción de glicerol a la hora de mejorar las características sensoriales de vinos que carecen de cuerpo (Pretorius y van der Westhuizen, 1991; Barre et al., 1993; Degre, 1993).

La ruta de síntesis del glicerol implica un desvío del flujo glicolítico, que acabaría en la producción de etanol, hacia la producción de glicerol. Su síntesis implica la actuación secuencial de dos enzimas, llamadas GPD1p y GPD2p, y la conversión del exceso de NADH en NAD⁺; este proceso no produce ATP. El glicerol generado no es consumido, ya que los enzimas implicados en su asimilación están reprimidos en condiciones anaeróbicas (Pavlik et al., 1993; Rønnow y Kielland-Brandt, 1993). Como consecuencia de la sobreproducción de glicerol, la formación de etanol disminuye y aumenta la formación de otros metabolitos, como el acetato, el piruvato y la acetoína, alguno de ellos no deseado en el vino (Michnick et al., 1997; Pretorius, 2000).

El contenido en glicerol de un vino se ve afectado tanto por parámetros que afecten al crecimiento de las levaduras como por factores ambientales, entre otros cabe destacar la influencia de la cepa, el nivel de inoculación, las concentraciones de sulfito, azúcar y nitrógeno, el pH, la aireación, la temperatura y la variedad de uva (Carrasco et al., 2001; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

En los últimos años hay una demanda creciente de vinos con una mayor cantidad de glicerol, debido tanto a los efectos positivos de este sobre las propiedades sensoriales del vino o a reducir la sensación astringente en boca producida por los polifenoles, pero como se ha comentado anteriormente, la producción de este metabolito está ligada a una reducción de la producción de etanol. Para este propósito, se han seguido tres estrategias distintas. La primera de ellas consiste en la modificación de las condiciones de fermentación, como la aireación, la temperatura, el pH, la concentración de azúcar y el contenido en sulfitos (Gardner et al., 1993; Remize et al., 2000; Yalcin y Yesim Ozbas, 2008). La segunda estrategia ha tratado de mejorar las cepas vínicas mediante técnicas clásicas de cruce y que no suponen problemas legales en su aplicación a nivel industrial (Rep et al., 1999), así como seleccionar las cepas que produzcan mayor cantidad de glicerol. La caracterización enológica de varias cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, aisladas de fermentaciones vínicas, ha abierto nuevas alternativas, ya que poseen características interesantes que se aproximan a las nuevas tendencias en enología (González et al., 2007); de hecho, la especie *S. kudriavzevii* produce mayor concentración de glicerol y menor de etanol que las cepas de la especie *S. cerevisiae* (Arroyo-López et al., 2010). La especie *S. uvarum*, que es la responsable de la fermentación de algunos vinos, también produce más glicerol y menos etanol (Gamero et al., 2013). Esto hace interesante la búsqueda y selección de nuevas cepas, tanto pertenecientes a *S. bayanus* como híbridas entre *S. cerevisiae* y alguna de estas dos especies. Incluso se ha utilizado la evolución adaptativa como estrategia para desarrollar levaduras que produzcan mayores cantidades de glicerol (Kutyna et al., 2012; Tilloy et al., 2014). La tercera aproximación ha sido

la manipulación molecular de las levaduras, desviando la ruta de producción de etanol, como se ha comentado antes (Michnick et al., 1997; Remize et al., 2003, 2001, 2000, 1999).

9. Fermentaciones a bajas temperaturas

La temperatura es uno de los parámetros más importantes para el desarrollo de la fermentación alcohólica. Esta puede afectar tanto a la cinética del proceso (duración, tasa y ecología de la fermentación) (Sharf y Margalith, 1983; Torija et al., 2003), como a la calidad final del vino (producción de metabolitos secundarios (Beltran et al., 2002; Novo et al., 2003; Torija et al., 2003; Gamero et al., 2013).

Actualmente existe un interés creciente en fermentar a bajas temperaturas (10-15°C); principalmente en la producción de vinos blancos y rosados, sobre todo, en aquellos de gran potencial aromático, ya que estas temperaturas permiten que se retenga gran parte de los aromas primarios y secundarios, los cuales, al ser volátiles a temperatura ambiente, se escapan con facilidad durante la fermentación alcohólica a mayores temperaturas.

A pesar de las ventajas de este tipo de fermentación, las bajas temperaturas dificultan la realización de la fermentación alcohólica; sus efectos sobre esta son (Beltran et al., 2007):

- Retraso de varios días en el inicio de la fermentación (fase de latencia prolongada).
- Disminución de la velocidad de consumo de azúcares (fermentaciones más prolongadas).
- Mayor riesgo de paradas de fermentación.
- Modificación de las poblaciones de microorganismos (a esas bajas temperaturas *K. apiculata* domina la fermentación durante más tiempo, lo que dificulta la imposición de *S. cerevisiae*); esto

podría llevar a la producción de sustancias volátiles indeseables por parte de las levaduras no-*Saccharomyces* (Herraiz et al., 1990).

- Cambios en la actividad metabólica de los microorganismos (lo que implica una modificación en la producción de metabolitos secundarios, debido a las necesidades adaptativas).

En los últimos años, se ha reconocido la capacidad criotolerante de algunas especies de levadura y sus híbridos interespecíficos, este es el caso de *S. uvarum* y *S. kudriavzevii* y sus híbridos con *S. cerevisiae* por el potencial que tienen para resolver los problemas que se presentan en la industria vinícola y como se ha comentado en el apartado 2.1. Gracias a la capacidad de formar híbridos entre las especies del género *Saccharomyces*, ha sido posible el aislamiento de algunos híbridos naturales *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* x *S. bayanus* de las regiones vinícolas de Europa con climas oceánicos y continentales (González et al., 2006; Masneuf et al., 1998; Peris et al., 2012a), lo que indica una clara adaptación a fermentar a bajas temperaturas. González et al., (2007) analizaron la influencia de nuevas levaduras híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* aisladas de vinos, realizando fermentaciones en mostos naturales a diferentes temperaturas (14, 18, 22 y 32°C) para estudiar la producción de compuestos, asimilación de azúcares y otras características que influyen en las propiedades enológicas originadas por el impacto de las levaduras y encontraron que las levaduras híbridas se comportan particularmente mejor a bajas temperaturas y producen vinos con menor cantidad de etanol y mayor cantidad de glicerol, lo cual puede ser útil para mejorar el perfil aromático de los vinos.

Es interesante destacar que estas especies, además de fermentar mejor a bajas temperaturas, por sí solas también pueden incrementar la síntesis de aromas de los vinos, objetivo por el cual se realizan fermentaciones a bajas temperaturas. Gamero et al., (2013) estudiaron la producción de aromas de cepas de las especies *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. kudriavzevii* y sus híbridos y

Introducción

observaron que las cepas de *S. uvarum* fueron las más destacadas en la producción de aromas en vinos junto con algunos híbridos. Por otra parte, Stribny et al., (2015) observaron que las cepas de *S. uvarum* se caracterizan por producir más ésteres y las cepas de *S. kudriavzevii* por producir más alcoholes superiores respecto a las cepas de *S. cerevisiae* ensayadas.

10. Construcción de cepas mejoradas genéticamente

Las levaduras se han utilizado durante miles de años para hacer alimentos fermentados y bebidas, como cerveza, vino, sake y pan. Debido a la situación mundial y particularmente el cambio climático, los requerimientos de las fermentaciones industriales se han vuelto cada vez más selectivos y específicos. Es por ello que ha sido necesario aumentar artificialmente la diversidad de las levaduras existentes y generar variantes que rindan mejor que las cepas actualmente utilizadas. En los siguientes apartados nos centraremos en las técnicas más usadas en la actualidad para mejorar genéticamente levaduras vínicas.

10.1 Evolución adaptativa

La evolución adaptativa (también llamada evolución dirigida, evolución experimental o ingeniería evolutiva) se refiere a métodos de selección entre una población celular de aquellos individuos que contienen mutaciones genéticas beneficiosas para un rasgo particular; esto se lleva a cabo creciendo la población celular durante largos periodos de tiempo bajo condiciones que favorecen la mutación beneficiosa. Durante este proceso se puede obtener una nueva población que consiste principalmente en células con las mutaciones beneficiosas.

En este tipo de experimentos, la selección no es un proceso de un solo paso, sino que se producen cientos de generaciones. Las estrategias empleadas en evolución adaptativa incluyen transferencias en serie de cultivos por lote, métodos de cultivo continuo, selección en placa y otros métodos. Chambers et al., (2009), proporcionan ejemplos detallados y descripciones de

varios tipos y técnicas de adaptación evolutiva de levaduras usadas en la industria de alimentos y bebidas, mientras que Fisher y Lang (2016) describen métodos y resultados de algunos estudios de evolución experimental en modelos de sistemas fúngicos incluyendo *Saccharomyces*.

Esta técnica se ha utilizado con éxito para mejorar microorganismos de interés industrial, incluidas cepas vínicas de *S. cerevisiae*. Así por ejemplo, al usar gluconato como única fuente de carbono, se obtuvieron levaduras que mejoraban el perfil aromático del vino (Cadière et al., 2012; Mouret et al., 2014). La evolución dirigida también ha demostrado ser útil para obtener cepas que incrementan hasta un 41% la síntesis de glicerol respecto a su cepa parental (Kutyna et al., 2012). López-Malo et al., (2015) también mejoraron mediante ingeniería evolutiva la capacidad de una cepa de *S. cerevisiae* para crecer a bajas temperaturas.

10.2 Hibridación

A la hora de obtener híbridos se han utilizado diferentes aproximaciones, como la conjugación de esporas, el “rare-mating” o la fusión de protoplastos.

10.2.1 Conjugación de esporas

Este apareamiento directo puede realizarse usando un micromanipulador para colocar dos esporas individuales de las cepas a hibridar muy cerca una de otra en una superficie de agar, controlando el evento de hibridación por microscopía y aislando los cigotos desarrollados (que pueden formarse si las esporas son del tipo de apareamiento opuesto).

Esta técnica es usada cuando las cepas parentales a hibridar son homotáticas o cuando su eficacia de hibridación (cruzamiento) es baja y/o cuando no hay disponibilidad de marcadores adecuados de selección de los híbridos resultantes. Sin embargo, la principal desventaja del cruce espóra-espóra en comparación con el apareamiento célula-célula es que las esporas utilizadas en el experimento no pueden caracterizarse antes del apareamiento

Introducción

y por lo tanto pueden no mostrar el fenotipo deseado de la cepa parental, debido a la segregación de alelos causales (Attfield y Bell, 2003).

Aunque el acoplamiento directo, que consume mucho tiempo, ha demostrado ser una forma efectiva de obtener híbridos (Sipiczki, 2008); el apareamiento espóra-espóra y célula-espóra se aplica regularmente para crear híbridos novedosos, principalmente interespecíficos para la industria de la fermentación. Se ha utilizado con éxito para generar levaduras vínicas con criotolerancia mejorada, cruzando *S. cerevisiae* con especies criotolerantes tales como *S. kudriavzevii* o *S. uvarum* (Pérez-Través et al., 2012), o para introducir la floculación en una cepa de levadura para la producción de vinos espumosos (Coloretti et al., 2006).

10.2.2 “Rare mating”

Muchas levaduras naturales e industriales tienen baja eficiencia de esporulación y/o baja viabilidad de esporas, dificultando su uso en experimentos de cruzamiento directo. En estos casos, el “rare mating” ofrece una vía para obtener híbridos y se basa en el raro evento en el que algunas células en una población diploide pueden llegar a ser homocigotas para el tipo sexual (resultando en una célula a/a o α/α) y subsecuentemente puede ser “forzada a cruzarse” con una célula de tipo de cruzamiento opuesto (Gunge y Nakatomi, 1972).

El método se basa en mezclar densas suspensiones celulares de las cepas parentales y subsecuentemente ocurre el cruce, por lo que los híbridos se pueden aislar posteriormente. Es necesario usar cepas parentales con alguna auxotrofia o resistencia a antibióticos para hacer los híbridos fáciles de seleccionar usando en medios de cultivo adecuados.

El “rare-mating” es posible tanto dentro de especie como entre las especies del género *Saccharomyces*; la frecuencia de estos cruces, aunque siempre es baja, depende del tipo sexual y de la ploidía de las células parentales (de Barros Lopes et al., 2002). La ventaja de este método con

respecto al cruce de esporas se encuentra en que no es necesario esporular los cultivos, de modo que se elimina el problema de la pérdida de características interesantes y de la baja viabilidad.

Esta técnica se ha utilizado para mejorar levaduras de interés industrial (Tubb et al., 1981). Se ha utilizado en la obtención de cepas vínicas que mejoren la liberación de manoproteínas (Pérez-Través et al., 2015) o híbridos que mejoren la capacidad de fermentar a bajas temperaturas (Origone et al., 2018).

OBJETIVOS

En pleno siglo XXI, la industria enológica debe dar respuesta a los retos planteados tanto por las nuevas demandas del consumidor como por la modificación de las propiedades de la materia prima, el mosto de uva, debidas al cambio climático, lo que tiene importante repercusión en la calidad y aceptación del producto final, el vino. Para ello se exigen cambios en las prácticas enológicas entre las que tiene un papel muy relevante el desarrollo de cultivos iniciadores de levaduras adaptadas a las nuevas condiciones de fermentación como son las bajas temperaturas para obtener vinos más aromáticos o el desarrollo de levaduras que produzcan más aromas, mayor concentración de glicerol y menos etanol, estas dos últimas demandas asociadas al cambio climático.

S. cerevisiae se ha descrito como la especie predominante en la fermentación alcohólica; sin embargo, otras especies del género *Saccharomyces* también pueden tener un papel importante en procesos de fermentación. Trabajos previos del grupo, han estudiado las características fisiológicas de interés enológico que presentan las especies *S. uvarum* y *S. kudriavzevii* respecto a cepas de *S. cerevisiae*. así como de los híbridos de estas especies. La caracterización enológica de varias de estas cepas vínicas híbridas muestra que han adquirido la tolerancia al alcohol y la alta capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* y la capacidad de crecimiento a bajas temperaturas de *S. kudriavzevii*. Donde se ha realizado un gran esfuerzo ha sido la caracterización genética de estos híbridos naturales, pero la caracterización enológica y fisiológica de estas cepas has sido limitada a unos pocos híbridos. En el objetivo 1 nos centraremos en estudiar las diferencias en la capacidad de crecer a bajas temperaturas de la mayoría de los híbridos descritos y su correlación con la expresión de algunos genes relacionados con la adaptación a crecer a bajas temperaturas en *S. kudriavzevii* como son *NSR1*, *GPD1* and *GUT2*. En el objetivo 2 nos centramos en la caracterización enológica de dichos híbridos.

Una aplicación que se deriva del estudio de los híbridos naturales presentes en fermentaciones es la obtención de nuevos híbridos artificiales a partir de cepas comerciales de *S. cerevisiae* y cepas de *S. kudriavzevii*. De

Objetivos

este modo se pueden obtener cepas con nuevas propiedades enológicas que permitan resolver algunas de las exigencias actuales de las bodegas, sin necesidad de recurrir a organismos modificados genéticamente. Resultados previos comparando diferentes métodos de obtención de híbridos nos indicaron que la técnica del 'rare-mating' entre células diploides de cada parental era la óptima. Esta técnica supone un proceso de estabilización importante, ya que se alcanza con una dotación genómica próxima a la alodiploidía, con una copia del genoma de cada parental, mientras que los híbridos naturales estudiados son alotriploides o alotetraploides y se han descrito gran número de reordenaciones cromosómicas, con genomas híbridos entre las dos especies. Por lo tanto, los fenómenos de estabilización son de gran importancia en la obtención de levaduras que posteriormente se vayan a usar con fines comerciales. En el objetivo 4 estudiaremos la estabilización tras el proceso de obtención de estos híbridos y en el objetivo 4 la caracterización fisiológica y molecular de los híbridos obtenidos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos:

1. Caracterización fisiológica y molecular de híbridos naturales entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (Capítulo 1).
2. Caracterización enológica de híbridos naturales entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (Capítulo 2).
3. Estudio de estabilización de híbridos artificiales entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* sometidos a diferentes estreses, etanol y bajas temperaturas (Capítulo 3).
4. Caracterización fisiológica y molecular del proceso de estabilización de híbridos artificiales entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* sometidos a diferentes estreses (Capítulo 3).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas de levaduras.

La lista de cepas utilizadas en la presente tesis se muestra en la Tabla M.1. El nombre de las cepas, el país de origen y la fuente de aislamiento. Las levaduras han sido proporcionadas por Ksenija Lopandic (Centro Austríaco de Recursos Biológicos y Micología Aplicada, Instituto de Microbiología Aplicada, Universidad de Recursos Naturales y Ciencias de la Vida Aplicadas, Viena, Austria); Anchor Vino Yeasts; Lallemand Bio y; Jürg Gafner (Estación Federal Suiza de Investigación para la Fruticultura, Viticultura y Horticultura, Wädenswil, Suiza); José Manuel Álvarez Pérez (Instituto de Investigación de la Vid y el Vino, Universidad de León, Ponferrada, España); de nuestro laboratorio; CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), tal y como se indica en la Tabla M.1.

S. cerevisiae T73 es un diploide natural y fue aislada de vino tinto Mourvedre (también conocido como Monastrell) hecho en Alicante, España, en 1987. *S. cerevisiae* T73 tiene bajos requerimientos de nitrógeno, gran tolerancia al alcohol y producción de acidez volátil (ácido acético principalmente), por lo cual se considera ideal para la fermentación de uvas cultivadas en climas cálidos.

S. kudriavzevii CR85 fue aislada de muestras de roble de Ciudad Real (Lopes et al., 2010), España; una región con un clima mediterráneo, donde la temperatura en verano supera los 30°C, pero en inviernos se alcanzan temperaturas muy bajas.

Material y Métodos

Tabla M.1. Lista de cepas usada en este estudio. Origen geográfico y fuentes de aislamiento de los híbridos naturales *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii*.

Cepa	Especie	País de origen	Fuente de aislamiento
HA 1835	Sc x Sk	Austria	Vino
HA 1837	Sc x Sk	Austria	Vino
HA 1841	Sc x Sk	Austria	Vino
HA 1842	Sc x Sk	Austria	Vino
VIN7	Sc x Sk	Sudáfrica	Vino
W27	Sc x Sk	Suiza	Vino
W46	Sc x Sk	Suiza	Vino
SPG 14-91	Sc x Sk	Suiza	Vino
SPG 16-91	Sc x Sk	Suiza	Vino
SPG 126	Sc x Sk	Suiza	Vino
SPG 172	Sc x Sk	Suiza	Vino
SPG 319	Sc x Sk	Suiza	Vino
SPG 441	Sc x Sk.	Suiza	Vino
AMH	Sc x Sk	Alemania	Vino
PB7	Sc x Sk	España	Vino
CECT 1388	Sc x Sk	Inglaterra	Cerveza
CECT 1990	Sc x Sk	Alemania	Cerveza
CECT 11002	Sc x Sk	Bélgica	Cerveza
CECT 11003	Sc x Sk	Bélgica	Cerveza
CECT 11004	Sc x Sk	Bélgica	Cerveza
CECT 11011	Sc x Sk	Nueva Zelanda	Cerveza
MR25	Sc x Sk	España	Tracto Respiratorio
IF6	Sc x Sk	España	Suplemento Dietético
T73	Sc	España	Vino
CR85	Sk	España	Corteza de roble

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sk: *Saccharomyces kudriavzevii*.

2. Medios de cultivo

Todos los medios se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121,5 °C y una presión de 15 libras/pulgada² durante 20 minutos a menos que se especifique lo contrario.

2.1 Composición del GPY (Extracto de Levadura Glucosa Peptona).

Fue el medio de cultivo más utilizado en este estudio, en estado líquido y sólido y/o adicionado con etanol.

Composición del GPY (Extracto de Levadura Glucosa Peptona)

Glucosa	20 g
Peptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Agar europeo	20 g
Agua destilada	1000 mL

Una vez el GPY líquido disminuía su temperatura a 70°C, podía verterse en condiciones estériles directamente en placas Petri, alcanzando 1/3 de su capacidad.

En el caso de GPY adicionado con antibióticos G418 o higromicina o ambos, se requirió que el medio disminuyera su temperatura a 55°C para añadir una alícuota de antibióticos con la cantidad necesaria para alcanzar una concentración final de 200 µg mL⁻¹ en las placas.

En el caso de GPY adicionado con 10% de etanol, se requirió que el medio disminuyera su temperatura lo suficiente para permanecer líquido y que a la vez no causara una evaporación del etanol.

2.2 Mosto sintético.

El mosto sintético reproduce la composición de mosto natural estándar. Este medio es muy útil para realizar microvinificaciones de una manera reproducible. Este medio se adaptó de Bely et al., (2003).

Material y Métodos

Composición del mosto sintético

Azúcares

Glucosa 100 g

Fructosa 100 g

Ácidos orgánicos 5 g

Ácido málico 5 g

Ácido cítrico 0,5 g

Minerales

KH_2PO_4 0,75 g

K_2SO_4 0,5 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,155 g

NaCl 0,2 g

NH_4Cl 0,46 g

Las sustancias se pesaron y se añadió la cantidad de agua destilada necesaria para completar 1 L. Posteriormente se esterilizó con calor húmedo por medio de un autoclave a 121,5°C a 15 libras/pulgada² durante 15 min.

A la solución previamente preparada se adiciona una solución compuesta de:

Cantidades de soluciones stock

necesarias para 1L de Mosto Sintético

Aminoácidos	13,09 mL
Oligoelementos	1 mL
Vitaminas	10 mL

El pH de la solución se ajustó a 3,3 con pellets de NaOH y se filtró el volumen total usando un filtro de 0,22 μm .

2.2.1 Solución stock de aminoácidos.

A continuación, se indica la cantidad necesaria en gramos para preparar 1 L de solución.

Composición de la solución Stock de Aminoácidos en g L⁻¹

Aminoácido	Cantidad	Aminoácido	Cantidad
Tirosina	1,5 g	Ácido glutámico	9,2 g
Triptófano	13,4 g	Arginina	28,3 g
Isoleucina	2,5 g	Leucina	3,7 g
Ácido aspártico	3,4 g	Treonina	5,8 g
Glicina	1,4 g	Glutamina	38,4 g
Alanina	11,2 g	Valina	3,4 g
Valina	3,4	Metionina	2,4 g
Fenilalanina	2,9 g	Serina	6 g
Histidina	2,6 g	Lisina	1,3 g
Cisteína	1,5 g	Prolina	46,1 g

La solución Stock de aminoácidos se almacenó a -20°C.

2.2.2 Solución stock de vitaminas.

A continuación, se indica la cantidad necesaria en gramos para preparar 1 L de solución stock de vitaminas.

Material y Métodos

Composición de la solución Stock de vitaminas en g L⁻¹

Myo-inositol	12 g
Pantotenato de calcio	15 g
Hidrocloruro de tiamina	0,025 g
Ácido nicotínico	0,2 g
Piridoxina	0,025 g
Biotina (Solución stock de biotina 100 mg mL ⁻¹)	3 mL

Una vez preparada, la solución stock de vitaminas se mantiene a -20°C.

2.2.3 Solución stock de oligoelementos.

A continuación, se indica la cantidad necesaria en gramos para preparar 1 L de solución stock de oligoelementos.

Composición de la solución Stock de Oligoelementos en g L⁻¹

MnSO ₄ .H ₂ O	4 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 g
KI	1 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,4 g
H ₃ BO ₃	1 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1 g

Una vez preparada, la solución stock de oligoelementos se mantiene a -20°C.

3. Cebadores.

Para los experimentos del primer capítulo, se diseñaron los cebadores de PCR utilizados para estudiar la expresión relativa de los genes diana *NSR1*,

GUT2 y *GPD1* en cepas híbridas naturales (VIN7, CECT11011, AMH, W46, CECT1990, SPG14-91 y SPG441) y especies parentales cercanas (T73 y CR85). El diseño de los cebadores se realizó utilizando la secuencia genómica disponible de la cepa S288c de *S. cerevisiae* (base de datos del genoma de *Saccharomyces*, <http://www.yeastgenome.org/>) y de la cepa CR85 de *S. kudriavzevii* (C. Toft, comunicación personal). Se diseñaron dos pares de cebadores para amplificar los genes parentales de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, uno para el alelo *S. cerevisiae* y otro para el alelo *S. kudriavzevii*, excepto para *NSR1* ya que el cebador forward fue útil para ambas especies. Se utilizó como control la expresión del gen de la *ACT1*. Se diseñaron cebadores para obtener amplicones de 100 y 200 pb en tamaño para asegurar la máxima eficiencia de PCR y la precisión de la cuantificación.

En la Tabla M.2 se muestran todos los cebadores usados en el presente trabajo.

Tabla M.2. Regiones génicas bajo análisis de restricción y cebadores usados para la amplificación por PCR.

Cromosoma	Gen	Cebador	Secuencia
I	<i>BUD14</i>	Forward	5'-TGAATTGTTGGAAAAATGARAAYATG
		Reverse	5'-CGAATAATTTTCATCCAAYTGYYTCAT
I	<i>CYC3</i>	Forward	5'-CTACAAAAAATGGGTTGGTTTTGGGC
		Reverse	5'-GGGAACAGTAGGCCGCACARRTGCATCCA
II	<i>APM3</i>	Forward	5'-
		Reverse	5'-CCTGTGGCAGTTGCTTTATCAAARATCCAYTG
II	<i>OPY1</i>	Forward	5'-CCGCGGACAACAGACCAYCATTAYTGGTGYGT
		Reverse	5'-CTCTTGAAATTTATTATCCARTCCACCATRRCYTG
II	<i>PKC1</i>	Forward	5'-GATTTCTGTGGCATGTCCATGGARATGG
		Reverse	5'-ACAGAAAGTCTTTGGTTTTGAACRTGCCACAT
III	<i>KIN82</i>	Forward	5'-GCCCTGAAAGTTTTGAGTAAACAYGARATGAT
		Reverse	5'-TCGTCATCATTTGCAACTTTCTCRCARAACAT
III	<i>MRC1</i>	Forward	5'-AAACGAAAGTTTTCAAGTTGGARGAYA
		Reverse	5'-TTGTTTATCATTTTGACATCCATYTCYTT
IV	<i>EUG1</i>	Forward	5'-CTTGTCTGAATTYTTYGTCYCCATGG
		Reverse	5'-GTGGTAAACCATATTTTCAGATRRTRATCAT
IV	<i>RPN4</i>	Forward	5'-GAAGATAATTATAATCCGAARATGCARTGG
		Reverse	5'-ACCACATGGTTCATTAGTGATRAGRTTCAT

Material y Métodos

Cromosoma	Gen	Cebador	Secuencia
IV	<i>UGA3</i>	Forward	5'-
		Reverse	5'-TGCTCGCTGATGCCGTCAGCTTCRTTYTGCCA
V	<i>MET6</i>	Forward	5'-CTAGACCTGTCCTATTGGGTCCAGTTTCTTACTT
		Reverse	5'-TTAGCTTCTAGGGCAGCAGCAACRTCTTGACC
		K	5'-GCGTTAGCTTCTAGAGCAGCAGTGACATTGC
V	<i>NPR2</i>	Forward	5'-CACTAGACTGGGCAAAATGTTYAARGT
		Reverse	5'-AACAGGAGGTTTGTGAYTGYCTCCARTC
VI	<i>GSY1</i>	Forward	5'-ATTGGAAAAGAATTTTCGAGCAYACRATGAG
		Reverse	5'-AATTTCTTGCCACCGGCAAGGGTATTCATATT
VI	<i>EPL1</i>	Forward	5'-GAGGATTGTTGTGGTACCAACTAYAAYATGGA
		Reverse	5'-CGTCTTCAATTTTCCGYTTYTCCATYTT
VII	<i>KEL2</i>	Forward	5'-TATCTTTTCAATATTAATTCTTAYAARTGGAC
		Reverse	5'-GCAGTTTCAAGTTCYTTYTG YTG
VII	<i>MNT2</i>	Forward	5'-ATACAGATCTATCTTTTTGGGARAAYTGG
		Reverse	5'-AGTCTCTGGCTATGCTCATARTCRTAYTCCCA
VIII	<i>CBP2</i>	Forward	5'-GACTTCAAGCCATCTTTYGARTGGCARCA
		Reverse	5'-CATGGACTCGGTCTTGATAYTYTTCCA
VIII	<i>MNL1</i>	Forward	5'-TCGTTGAAAATAARTGTAAAAAYGAYTGG
		Reverse	5'-ATCTCACCTCTTGGGRCAACCACAT
IX	<i>DAL1</i>	Forward	5'-CAGGGCCAAATGTGGTGYGAYGT
		Reverse	5'-CTGCTTGGAAAGTATTTTCRCARCACCA
IX	<i>UBP7</i>	Forward	5'-CCTCTTAGGTGGGTATGAAAAATGGAARAARAC
		Reverse	5'-CCATTAACAATTACGTTTTTRTCAAACCARTG
X	<i>CYR1</i>	Forward	5'-CTACGAAGGAAAGTGCCTCTTTRGTTTCGTGG
		Reverse	5'-CCGTGTGTAGAATTTAGTGTAGAATTGACRGC
X	<i>DAL5</i>	Forward	5'-CTACGTTGGAAGATCGATTAYTYATGTT
		Reverse	5'-GCCCAGCTCAACTTATAYTTCCARAA
X	<i>PEX2</i>	Forward	5'-GATAAAGAAGTGTATGGACARTTYTGG
		Reverse	5'-GCCTTTACAACGCACACATARCARTARTT
XI	<i>BAS1</i>	Forward	5'-
		Reverse	5'-
XI	<i>CBT1</i>	Forward	5'-TACAACACCTTCGTGCTTTAYGAYTGG
		Reverse	5'-TTCCAGTAGTTCAARTTGCGRTACAT
XII	<i>MAG2</i>	Forward	5'-ATGGTAGAACCGGATATGCAGAARAARGC
		Reverse	5'-AGCTCCAAGGAATTAGATACACCRCAYTTCAT
XII	<i>PPR1</i>	Forward	5'-CGGGTGTGGTAYACYATGGG
		Reverse	5'-TAAAGATAAGTCATACCTGTCATRAACAT
XIII	<i>CAT8</i>	Forward	5'-
		Reverse	5'-CTACTTGGCRTTTTGCCAYTGRAA

Cromosoma	Gen	Cebador	Secuencia
XIII	<i>ORC1</i>	Forward	5'-GGCTCTCACCTATTTGAGATGGTTYGAR
		Reverse	5'-GCTCTAGCGACATTTTTTTTTTGTRAAATT
XIV	<i>BRE5</i>	Forward	5'-TGATTATAGCCACGGGTGARATGTTYTGG
		Reverse	5'-TTCATTCATCAACTTTGAGGCCCATGTCAT
XIV	<i>EGT2</i>	Forward	5'-GTACGGACCCAGAYCAYTGGTT
		Reverse	5'-CATTGGTAAATCAACRGTRAACCA
XV	<i>ATF1</i>	Forward	5'-
		Reverse	5'-CCAATGAAAATGCYTGRTGCCA
XV	<i>RRI2</i>	Forward	5'-
		Reverse	5'-AATATCTCTCTCCCGAAGTTTCCCCATYTCYTC
XVI	<i>GAL4</i>	Forward	5'-TGTGCCAAGTGTCTGAAGAAYAAYTGGGA
		Reverse	5'-GCGATTTCAATCTGATTATRTACARCATCAT
XVI	<i>JIP5</i>	Forward	5'-GGCGTGAAACACTTTGGAAGACYAARAG
		Reverse	5'-TATAGATGTTACCATTGGARCAACCRACCA
VII	<i>NSR1c/k</i>	Forward	CAAGAAGGAAGTTAAGGCTTCCAA
	<i>NSR1c</i>	Reverse	GAAGATGAAGATTCAGATTCAGACTCA
	<i>NSR1k</i>	Reverse	TCGGAGGAAGAAGAGGTGCTT
IV	<i>GPD1c</i>	Forward	CAATTGAAAGGTCATGTTGATTCA
		Reverse	TCAGTGATGTAAGAGGATAGCAATTG
IV	<i>GPD1k</i>	Forward	GAAAGGCCACGTTAACCCTC
		Reverse	GGATAGAGCACCCACATTGGATG
IX	<i>GUT2c</i>	Forward	GGGGACGCTGTACTGGATG
		Reverse	ATCAACACGTCGAATTGATGC
IX	<i>GUT2k</i>	Forward	GGATCCGTGTACTGGGCG
		Reverse	CAGCACATCGAATTGGTGC
VI	<i>ACT1</i>	Forward	TGGATTCCGGTGATGGTGTT
		Reverse	CGGCCAAATCGATTCTCAA

4. Plásmidos utilizados.

Se utilizaron dos plásmidos con resistencia a antibióticos para la transformación de las cepas de levadura. El plásmido pRS42H tenía un marcador de resistencia para Higromicina y el plásmido pGREG resistencia para Geneticina (G418). Ambos se utilizaron como marcadores de selección en la obtención de híbridos artificiales en el capítulo 2, tal y como se explica en el siguiente apartado de Material y Métodos.

Material y Métodos

5. Transformación de levaduras con marcadores de resistencia a antibióticos mediante el método del acetato de litio.

Para construir el híbrido *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, se utilizó el protocolo de transformación DNA/PEG LiAc/SS-carrier para introducir los plásmidos de resistencia a antibióticos G418 e Higromicina para *S. cerevisiae* T73 y *S. kudriavzevii* CR85, respectivamente.

En resumen, se recogieron las células por centrifugación a 3500 rpm durante 3 minutos tras medir la OD₆₀₀ y asegurar que habían completado por lo menos dos divisiones desde una OD₆₀₀ inicial de 0,2 y tenerlas por tanto en fase exponencial, permitiendo una mejor entrada del material genético al interior de las células.

Tras lavar con agua estéril, las células se resuspendieron en 1 mL de acetato de litio 0,1 M, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 0,5 mL de acetato de litio 0,1 M, transfiriéndose 50 µL de la muestra en un nuevo tubo con la mezcla de transformación, que contenía:

Polietilenglicol (PEG)	240 µL
Acetato de litio (LiAc)	36 µL
SS-carrier DNA	50 µL
Plásmido (0,5-1 µg) + agua	34 µL
Volumen total	360 µL

Tras resuspender la mezcla con la pipeta, se incubó la reacción de transformación durante 40 minutos a 42°C y tras este tiempo se procedió a centrifugar las células, se resuspendieron en 100 µL de agua destilada estéril y posteriormente se sembraron.

Las células se dejaron crecer en medio GPY durante unas 3 horas a 28°C para que se expresara la resistencia y posteriormente se inocularon las placas de GPY conteniendo el antibiótico correspondiente (G418 o Higromicina), dejando crecer las colonias durante 24-48 horas. Las colonias que fueron capaces de crecer se pasaron a nuevas placas con antibiótico para evitar falsos positivos.

La transformación de *S. kudriavzevii* por este método fue ligeramente modificada debido a una menor tolerancia térmica que *S. cerevisiae*. Tras añadir la mezcla de transformación se incubaron las muestras a 30°C durante 30 minutos y en seguida se realizó un choque térmico en un baño de agua a 42°C durante 20-25 minutos. Finalmente, las células se recuperaron por centrifugación y se sembraron en el medio correspondiente.

6. Construcción del híbrido *S. cerevisiae* T73 x *S. kudriavzevii* CR85.

6.1. “Rare-mating”.

Las cepas resistentes a antibióticos se cultivaron por separado en GPY líquido conteniendo 200 µg mL⁻¹ del antibiótico correspondiente de acuerdo con su resistencia. Se crecieron durante 48 h a 25°C. Después de obtener una alta densidad celular, las células resistentes a los antibióticos fueron recuperadas por centrifugación (3000 x g por 5 min a temperatura ambiente) y se lavaron con agua destilada estéril para remover residuos del medio de cultivo, recuperándose nuevamente por centrifugación.

Para la obtención del híbrido, se utilizó la técnica de rare-mating. Las células cosechadas se mezclaron en 20 mL de GPY líquido en tubos Corning de 50 mL y se incubaron a 25°C en una posición inclinada. Después de siete días de incubación, se sembraron alícuotas del medio en GPY sólido suplementado con 200 µg/ml de higromicina y 200 µg/ml de G418 y las placas se incubaron a 25°C. Un total de 64 colonias de híbridos fueron seleccionadas por su habilidad para crecer en la presencia de ambos antibióticos. Las colonias fueron resembradas en GPY sólido adicionado con ambos antibióticos para confirmar la resistencia y posteriormente se conservaron en glicerol al 15% a 80°C.

7. Evolución experimental del híbrido artificial.

Una cepa híbrida confirmada por PCR-RFLPs se sembró sembrada por estría en una placa con GPY sólido. La Figura M.1 muestra un esquema del proceso de estabilización del híbrido bajo las distintas condiciones de estrés.

Material y Métodos

Una colonia aislada de la placa fue inoculada en 1 mL de GPY líquido para usarse como cultivo iniciador.

La estabilización genómica fue iniciada en tres tubos eppendorf® para cada condición de estabilización (GPY a 25 °C, GPY a 12 °C y GPY suplementado con 10% de etanol a 25°C) con 1 ml del medio correspondiente inoculado con 2×10^6 células/mL. Después de siete días de incubación en agitación a la temperatura correspondiente, una alícuota de cada tubo era sembrada en GPY sólido por extensión en superficie y las placas eran incubadas a 25 °C o 12 °C de acuerdo a la condición de estabilización.

Las tres colonias más grandes de cada condición eran seleccionadas para iniciar la siguiente ronda de estabilización. Para las siguientes rondas en el proceso de estabilización, el volumen de cultivo incrementó a 5 mL y se inoculaba con una mezcla de las tres colonias previamente seleccionadas con la misma proporción de 2×10^6 células/ml. Se continuó con esta metodología hasta la estabilización del proceso en la novena ronda.

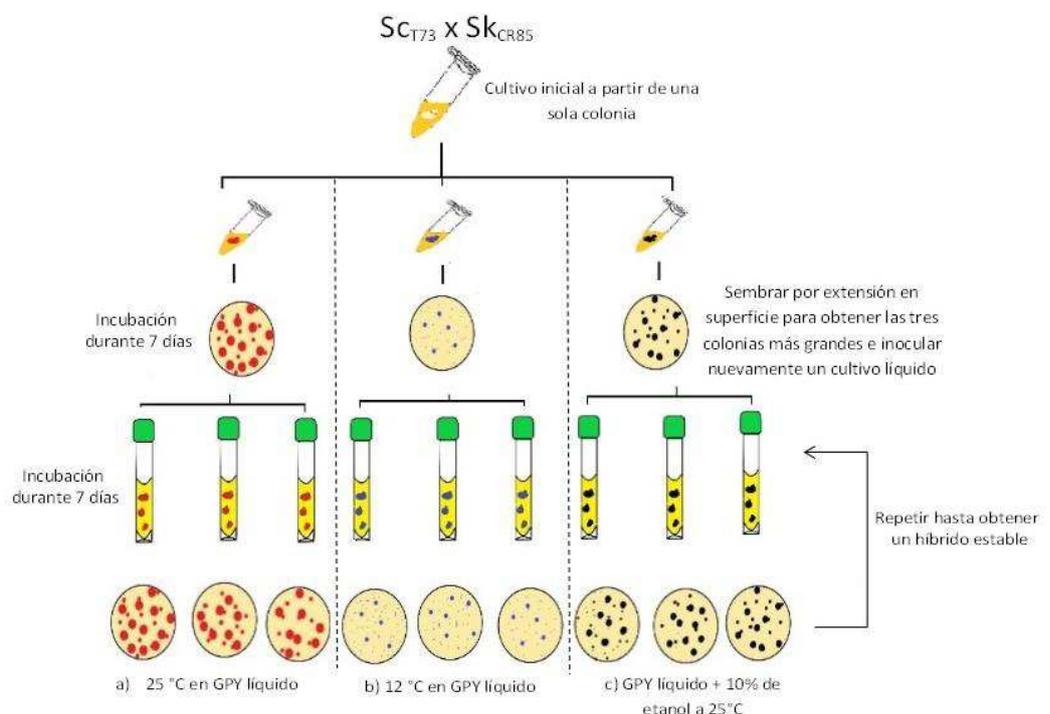


Figura M.1. Proceso de estabilización de un híbrido artificial sometido a distintas condiciones de estrés. Las cepas parentales fueron sometidas al mismo proceso, salvo que *S. kudriavzevii* no se sometió a condición de estrés por etanol.

Las células remanentes de cada ronda en el proceso de estabilización fueron conservadas en glicerol al 15% a 80°C para futuros análisis.

Inicialmente se midió el contenido de ADN por medio de la ploidía para las rondas 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y consideramos que las líneas híbridas eran genéticamente estables dado que la ploidía se había estabilizado.

8. Ensayos de goteo a diferentes temperaturas.

Todas las cepas se cultivaron durante la noche en medio rico líquido (GPY) y la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) se ajustó a 1,0. Las placas de agar con GPY se inocularon con 5 μ l de las diluciones en serie de 10^{-1} a 10^{-6} y se incubaron a 8, 12 y 24 °C. El crecimiento a estas temperaturas se documentó tomando fotografías cada 36 h, en los días 5 y 9. Se intentó la cuantificación visual mediante la evaluación del número y el tamaño de las colonias. Se informó un valor de intensidad de crecimiento global (%) relativo a la cepa de mejor rendimiento, indicada como 100% de crecimiento, a 8 °C.

9. Seguimiento del crecimiento de levaduras por densidad óptica a 600 nm (OD_{600}).

La densidad óptica es un métodos fácil, rápido y ampliamente utilizado para la estimación del número de células en un cultivo. Se define como el logaritmo base 10 de la proporción entre la luz incidente y la luz transmitida.

La OD se define como:

$$OD = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, e I es la intensidad de la luz transmitida. La densidad óptica de los cultivos celulares se determinó a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu mini-1240 con cuvetas semi-micro de 1,5 mL para longitudes de onda de 630 a 700 nm.

El dispositivo hacía pasar la luz a través de una suspensión celular, detectando la luz absorbida, siendo la densidad óptica proporcional al número

Material y Métodos

de células. El espectrofotómetro se calibró siempre con el mismo medio de fondo en el que crecieron las células para eliminar posibles desviaciones. En cultivos de alta densidad fue necesario hacer diluciones de la muestra hasta obtener rangos de absorbancia entre 0,1 y 0,7 con el fin de no perder la linealidad de las lecturas.

10. Análisis de crecimiento utilizando el SPECTROstar®.

Se realizaron análisis de crecimiento para los híbridos naturales, el híbrido *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, evolucionado bajo condiciones de estrés (GPY a 25°C, GPY a 12°C y GPY adicionado con 10% de etanol), así como las cepas parentales. Los análisis de crecimiento se realizaron en dos equipos distintos debido a las condiciones de temperatura requeridas para el estrés por baja temperatura. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Los análisis a 25°C en GPY líquido y GPY líquido adicionado con 10% de etanol, se realizaron en un espectrofotómetro SPECTROstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Alemania) de la siguiente manera: Los inóculos se prepararon introduciendo una colonia del cultivo puro a analizar en 5 mL de medio GPY en tubos de plástico de 15 mL (Falcon), dejándolo crecer en agitación toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se diluye en medio fresco hasta una OD₆₀₀ de 0,2 y se deja crecer hasta una OD₆₀₀ de 1 para garantizar que la célula haya llevado a cabo por lo menos dos divisiones.

En seguida, se inocularon 10 µL del precultivo en 0,25 mL del medio a estudiar en placas de poliestireno estériles de 96 pocillos de fondo plano (Sarstedt, Alemania) con el fin de que la lectura inicial del aparato se encuentre entre en una OD₆₀₀ de 0,15-0,2. La curva de densidad óptica se midió calculando la turbidez del medio cada 30 minutos a 600 nm y 25°C. El movimiento de la placa dentro del aparato fue constante y se realizó una agitación extra de 40 segundos a 400 rpm antes de cada ciclo de lectura.

El experimento se daba por finalizado una vez las células llegaban a la fase estacionaria de crecimiento. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en la placa y se utilizó un blanco para restar el ruido de fondo de

los resultados. Así mismo, en aquellos experimentos en los cuales el medio se modificó con etanol, se sellaba la placa con Parafilm M® con el fin de evitar al máximo la evaporación del etanol y se evitaba inocular aquellos pocillos más cercanos al borde superior y lado izquierdo ya que se ha comprobado que es donde mayor evaporación se da por el efecto del mecanismo de ventilación del aparato.

Para las curvas de crecimiento a 8 y 12°C, las microplacas se colocaron en una estufa refrigerada con agitación a 100 rpm, y se tomaron tres mediciones puntuales de OD₆₀₀ cada día para un experimento de crecimiento de 7 días hasta obtener lecturas aproximadamente constantes. Se utilizaron pocillos sin inocular para restar cualquier ruido del equipo o del medio de cultivo.

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento, se podía obtener la información sobre la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}), la fase estacionaria (λ) y el máximo crecimiento asintótico (A).

11. Caracterización fisiológica de las cepas evolucionadas.

Se realizaron análisis de crecimiento de los híbridos evolucionados en los tres diferentes medios de estrés en los que fueron evolucionados. Los híbridos caracterizados fisiológicamente fueron los correspondientes a la etapa 4, 9 y 16 del proceso de estabilización. La Figura M.2 facilita la comprensión del experimento:

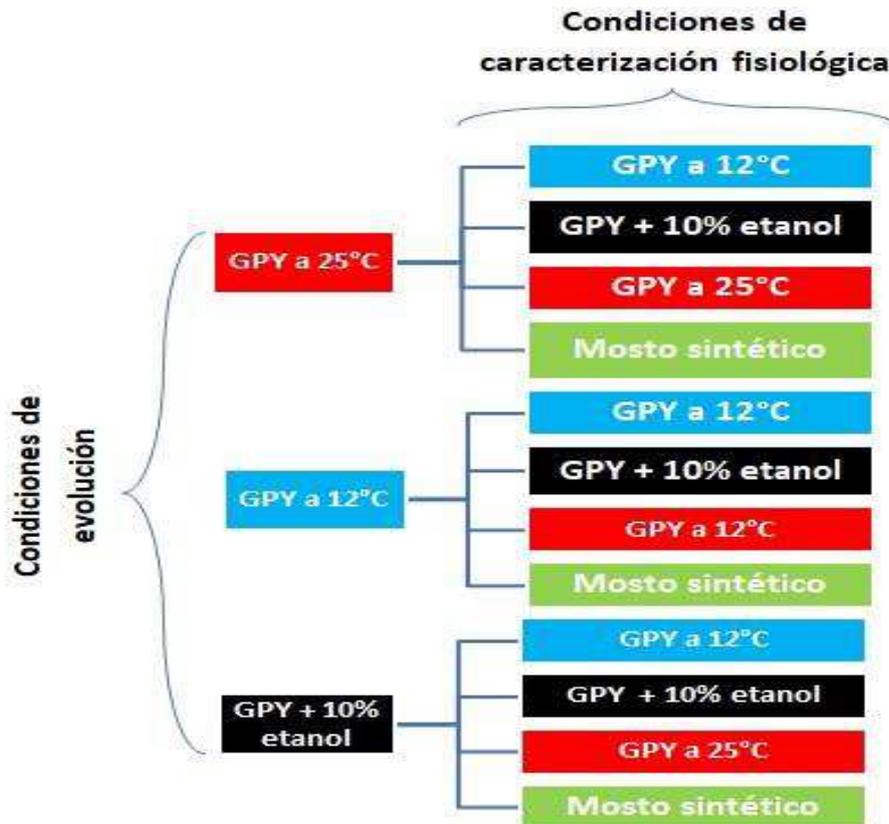


Figura M.2. Diagrama de las condiciones de evolución de los híbridos artificiales y las condiciones en las que estos híbridos evolucionados fueron caracterizados fisiológicamente. Los híbridos sometidos a la caracterización fisiológica fueron los correspondientes a las etapas 4, 9 y 6 del proceso de evolución.

Estos análisis se realizaron en las mismas condiciones de estrés en las que fueron estabilizados (GPY a 25 °C, GPY a 12 °C y GPY suplementado con 10% de etanol a 25 °C) y se adicionó una cuarta condición de estrés (Mosto sintético con una concentración de 200 g L⁻¹ de azúcares a 25°C).

12. Microvinificaciones.

12.1 Cinética de consumo de azúcares.

Para los ensayos de microvinificaciones se utilizó el mosto sintético con una concentración inicial de 200 g L⁻¹ de azúcares fermentables. Las microvinificaciones se realizaron en frascos de vidrio de 250 ml y con 175 ml de mosto. La inoculación de la cepa se realizó a 10⁶ células/ml. Las microvinificaciones se llevaron a cabo a 22 °C.

Los frascos se cerraron con tapones y cámaras de aire de dos piezas para liberar CO₂ y evitar la entrada de aire. Los cultivos fueron monitoreados continuamente para verificar si las válvulas funcionaban correctamente y los frascos se pesaron dos veces al día y se determinó la pérdida de peso. Además, la fermentación fue monitoreada por pérdida de masa hasta alcanzar una masa constante, que se considera el final de la fermentación. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. Las células de levadura se eliminaron por centrifugación y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C para un análisis posterior. Posibles contaminaciones fueron monitoreadas con un control negativo (mosto sintético sin células). La pérdida de masa monitoreada se corrigió al porcentaje de azúcar consumido, como en Pérez-Través et al., (2015):

$$C = \frac{m * (S - R)}{(mf * S)} * 100$$

donde C es el porcentaje de azúcar consumido en cada punto de tiempo, m es el valor de pérdida de masa en ese punto de muestreo (g), S es la concentración inicial de azúcar en el mosto (g L⁻¹), R es la concentración final de azúcar en el mosto fermentado (azúcar residual, g L⁻¹) y mf es el valor total de masa pérdida al final de la fermentación (g). Los valores residuales de azúcar se obtuvieron mediante el análisis por HPLC de las muestras de fermentación. El ajuste de la curva se llevó a cabo utilizando el modelo de Gompertz reparametrizado, ecuación propuesta por Zwietering et al., (1990):

$$y = D * \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{\mu_{\max} * e}{D} \right) * (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

donde y es el porcentaje de azúcar consumido, D es el valor máximo de consumo de azúcar (el máximo asintótico, %), μ_{\max} es la tasa máxima de consumo de azúcar (h⁻¹) y λ es la fase de adaptación (h) en que no se detectó consumo de azúcar. La ecuación de Gompertz se ajustó a los puntos de datos mediante el módulo de regresión no lineal del paquete de software STATISTICA 7.0 (Hilbe, 2007), minimizando la suma de los cuadrados de la diferencia entre datos experimentales y el modelo ajustado. Se calculó la

Material y Métodos

idoneidad del ajuste por la proporción de varianza explicada por el modelo (R²) en comparación con los datos experimentales.

Usamos botellas de vidrio de 250 ml con una cámara de aire de dos piezas (un pequeño dispositivo de plástico que se usa para hacer bebidas fermentadas que permite que el dióxido de carbono escape del fermentador sin dejar entrar aire nuevo, reduciendo la posible contaminación bacteriana) y una tapón de goma perforado. El mosto sintético se dosificó en las botellas de vidrio y se inoculó con las células de levadura necesarias para tener una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0,3 para comenzar la fermentación. Se registró el peso de las botellas y las botellas se incubaron a 12 °C en agitación continua.

13. Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Cromatografía de Gases.

Los azúcares residuales (glucosa y fructosa), glicerol y etanol en el punto final de las microvinificaciones fue determinado por HPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) usando un detector de índice de refracción y una columna HyperREZTM XP Carbohydrate H+ 8 µm (Thermo Fisher Scientific) equipada con protección HyperREZTM XP Carbohydrate (Thermo Fisher Scientific). Las muestras fueron diluidas 5 veces, filtradas a través de un filtro de nylon de 0,22 mm (Symta, Madrid, España) e inyectadas por duplicado. Las condiciones de análisis fueron: eluyente, 1,5 mM de H₂SO₄; flujo de 0,6 ml min⁻¹ y la temperatura de la estufa fue de 50 °C.

14. Cuantificación de compuestos volátiles

La extracción de compuestos volátiles y la cromatografía de gases fueron realizados siguiendo el protocolo de Rojas et al., (2001). Las concentraciones de alcoholes superiores y ésteres se determinaron al final de la fermentación. La extracción se realizó usando un muestreo de espacio de cabeza mediante microextracción en fase sólida (SPME) con fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) (Supelco, SigmaAldrich, Barcelona, España). Los compuestos aromáticos fueron separados por cromatografía de gases en un Cromatógrafo Thermo TRACE ULTRA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) con un detector de ionización de flama (FID), utilizando una columna capilar HP

INNOWAX 30 m x 0,25 mm recubierta con una capa de 0,25 μm de polietilenglicol reticulado (Agilent Technologies Inc.). Se utilizó helio como gas acarreador (flujo 1 ml min^{-1}). La temperatura programada del horno fue: 5 min a 60 $^{\circ}\text{C}$, 5 $^{\circ}\text{C}$ por min hasta 190 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta 250 $^{\circ}\text{C}$ y 2 min a 250 $^{\circ}\text{C}$. El detector de temperatura estaba a 280 $^{\circ}\text{C}$ y el inyector de temperatura a 220 $^{\circ}\text{C}$ bajo condiciones no divididas. Una señal de cromatografía fue registrada por un Detector HP Vectra QS/16S. El estándar interno era 2-heptanona (0,05% p / v). Los tiempos de retención de los picos eluidos fueron comparados con los de alcoholes superiores y ésteres comerciales estándar. Las concentraciones fueron cuantificadas en mg mL^{-1} mediante la calibración de los gráficos de los estándares (valor $R^2 > 0,99$).

15. Estimación de los parámetros de crecimiento mediante la OD a 600 nm

Los datos de crecimiento se exportaron del lector de microplacas SPECTROstar Omega para ser procesados en Excel (Microsoft Office 2010). Los parámetros de crecimiento fueron calculados de cada tratamiento mediante un ajuste directo de las mediciones de OD a 600nm vs tiempo para el modelo de Gompertz reparametrizado, propuesto por (Zwietering et al., (1990):

$$y = A * \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{\mu_{\max} * e}{A} \right) * (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Donde $y = \ln\left(\frac{OD_t}{OD_0}\right)$, OD_0 es la OD inicial y OD_t es la OD al tiempo t ; $A = \ln\left(\frac{OD_t}{OD_0}\right)$ es el máximo asintótico, μ_{\max} es la máxima tasa específica de crecimiento (h^{-1}), y λ es la fase de adaptación, también conocida como fase de adaptación o fase de latencia (h) (Aguilera et al., 2007).

16. Análisis moleculares.

16.1. ADN genómico de levaduras.

El ADN genómico total fue obtenido de acuerdo a procedimientos estándares (Querol et al., 1992). Las células de levadura se crecieron en 1 ml de GPY a 28 $^{\circ}\text{C}$ en agitación durante toda la noche y se recogieron por

Material y Métodos

centrifugación a 12000 rpm durante 3 min. El sedimento de células se resuspendió en 0,5 mL de solución 1 (1 M sorbitol, 0,1 M EDTA a pH 7,5).

A esta solución se le añadieron 30 μL de Zimoliasa 20T (Seikagaku Corporation, Tokio, Japón) a una concentración de 1 mg mL⁻¹ y se incubó a 37°C durante 40 minutos en agitación con el fin de obtener protoplastos, que se recogieron tras una centrifugación a 12000 rpm durante 3 minutos. Los protoplastos se resuspendieron en 0,5 mL de solución 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8 y 20 mM EDTA, pH 7,4) y se añadieron 13 μL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% para posteriormente incubarlos a 65°C durante 5 minutos con el fin de romper las células.

En seguida, se añadieron 0,2 mL de acetato potásico 5 M y las muestras se mantuvieron en hielo durante 10 minutos para precipitar las proteínas. Tras la incubación se llevó a cabo una centrifugación de 15 minutos a 4°C y el DNA contenido en el sobrenadante se precipitó mediante adición de 0,7 mL de isopropanol e incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente en el mismo isopropanol.

El DNA obtenido por centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos se lavó dos veces con 0,5 mL etanol al 70% (v/v). Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos y el etanol se eliminó mediante decantación, para secar las muestras mediante la utilización de vacío en un concentrador SpeedVac® Plus SC110A (Savant™). Una vez secas, las muestras se resuspendieron en 15 μL de agua milliQ estéril y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

La cantidad y calidad de los ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante NanoDrop™ 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware).

16.2. Análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).

La caracterización de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* obtenidos mediante la técnica de rare-mating fue realizada mediante la amplificación por PCR de los genes nucleares codificantes de proteínas *BRE5*

y *PPR1* y un subsecuente análisis por medio de un análisis de RFLP con las enzimas de restricción *Hae* III (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) siguiendo la metodología propuesta por González et al., (2008).

Se utilizó la enzima Taq polimerasa de Takara para aplicaciones estándar de PCR. En su caso, para una reacción general de 50 μ L se utilizó: 0,25 μ L de enzima, 5 μ L de tampón 5X, 4 μ L de dNTP's (concentración final de 2,5mM cada uno), <500 ng de DNA molde y 0,2-1 μ M de cada cebador. Las condiciones generales de reacción fueron: 1 ciclo de 5 min a 95°C, 30 ciclos compuestos de 30 s a 95°C, 1 min a la temperatura óptima de hibridación para cada par de nucleótidos, un tiempo variable (1 min por Kb) a 72°C para la extensión, y finalmente un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C.

Una reacción de digestión típica puede realizarse de la siguiente manera:

Enzima de restricción	1 μ L (10 unidades son suficientes)
DNA	1 μ g
Tampón 10X	5 μ L (1X)
BSA	100 μ g mL ⁻¹ (si es necesario)
Volumen total	50 μ L
Tiempo de incubación	1 hora
Temperatura de incubación	Depende del enzima

En el caso de digestiones con varios enzimas de restricción se deberá optar por el tampón óptimo para obtener la máxima actividad de cada enzima y evitar siempre una concentración de glicerol mayor al 5% del volumen de la reacción para evitar cortes inespecíficos en la muestra.

17. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles horizontales de agarosa a una concentración de 1,5 a 3% (p/v) según el tamaño de los fragmentos a separar, preparados en tampón TBE 0,5X (Tris-HCl 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1,25 mM), que también fue utilizado como tampón de la electroforesis.

Material y Métodos

Las muestras se disolvieron en tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilen cianol 0,25% (p/v), glicerol 30%) y las electroforesis se realizaron a voltaje constante entre 2-10 V/cm según la concentración de agarosa y la resolución requerida.

Para la detección del DNA se añadió al gel de agarosa 5µL de RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRION Biotech.) como alternativa no mutágena ni tóxica al bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se capturaron con una cámara CCD COHU Modelo 4912-5010 y se visualizaron y exportaron a través del programa Scion Image para Windows.

18. Medición de la expresión génica.

Durante la mitad de la fase exponencial a 12 °C, se aisló un ARN total de la suspensión de celular en medio GPY líquido. La muestra de levaduras se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 500 µl de tampón de lisis LETS (100 mM de LiCl, 10 mM de EDTA, 0,2% de SDS, 10 mM de Tris-HCl [pH 7,4]). Las células se rompieron mecánicamente con 500 µl de perlas de vidrio y 500 µl de fenol ácido (citrato saturado, pH 4,3).

Los contaminantes se eliminaron mediante varios pasos de extracción con fenol ácido, fenol-cloroformo (5: 1, pH 4,3) y cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). El ARN extraído se precipitó dos veces durante la noche a -20 °C. La primera precipitación se realizó añadiendo LiCl 5 M y la segunda añadiendo acetato de sodio 3 M y etanol al 100%. Después de la centrifugación a máxima velocidad durante 15 minutos, el ARN se lavó una vez con etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en agua libre de ARNasas.

La pureza y la concentración del ARN se determinaron espectrofotométricamente en un NanoDrop ND-1000 (Thermo-Scientific) y se verificó la integridad de todas las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa (1%). El análisis de expresión génica de los genes diana en levaduras híbridas naturales se realizó mediante el método de PCR cuantitativa en tiempo

real en dos pasos. La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de 400 ng de cada ARN aislado y se suspendió en 20 µl mediante el kit Reverse Transcriptase Core de EUROGENTEC, oligo d(T)15VN y nonamers aleatorios siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc sintetizado se diluyó 5 veces con agua libre de ARNasas. Las qPCR (PCR cuantitativas) subsiguientes se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 480 (96 pocillos, Roche Applied Science, Alemania) usando cebadores genéticos específicos (250 nM) en una reacción de 10 µl con el kit LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science).

Las condiciones optimizadas de PCR fueron 45 ciclos de 95 °C - 10 s, 59 °C - 10 s, y 72 °C - 15 s. La especificidad de los cebadores se probó usando como plantilla el ADN genómico de las dos cepas puras. Se incluyó un análisis de la curva de fusión al final de cada programa de amplificación para confirmar la presencia de un solo producto de PCR de todas las muestras sin primer-dimers. La herramienta de cuantificación relativa avanzada implementada en el software LightCycler 480 1.5.1 se utilizó para analizar los resultados y la eficacia de todos los pares de cebadores se determinó previamente y se incluyó en el análisis.

La normalización de los resultados de la expresión se realizó utilizando los niveles de expresión del gen ACT1, utilizado como el gen de referencia, que mostró una excelente uniformidad en los niveles de expresión en las condiciones de crecimiento estudiadas. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

19. Análisis de polimorfismos en la secuencia amplificada del ADN inter- δ .

Los cebadores delta 12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') y delta 21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'), así como los procedimientos propuestos por Legras y Karst (2003) fueron usados para amplificar el ADN genómico de las levaduras.

Material y Métodos

20. Análisis mitocondrial del ADN mediante polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (mtDNA-RFLP).

El análisis de restricción del ADN mitocondrial fue realizado por el método de Querol et al., (1992), usando la endonucleasa *Hinf* I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

21. Citometría de flujo.

El contenido total de ADN de cada una de las cepas parentales y de los híbridos seleccionados fue analizado por citometría de flujo siguiendo la metodología descrita por Lopes et al., (2010).

Las células se cultivaron en GPY a 28 ° C durante 24 h. Aproximadamente 1×10^6 células se recuperaron por centrifugación (3000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente) y se lavaron con 1 mL de tampón salino con fosfato 1x (PBS) (8 g L⁻¹ de NaCl, 0,2 g L⁻¹ de KCl, 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,24 g L⁻¹ de KH₂PO₄, pH 7,4). Las células se centrifugaron en las mismas condiciones y se fijaron con 1 mL de etanol al 70% frío. Las muestras se incubaron a -20 ° C durante 30 min. Las células se lavaron una vez con 1 mL de tampón PBS, se resuspendieron en 250 µl de PBS que contenía 0,1 mg mL⁻¹ de ARNasa A y se incubaron durante la noche a 37 ° C. Después de la centrifugación en las mismas condiciones, las células se suspendieron en 500 µL de tampón PBS y se sometieron a ultrasonidos para eliminar los agregados (dos veces durante 10 s). Para la tinción celular, se añadieron 5 µL de 50 µg mL⁻¹ de Sytox Green a cada muestra, que luego se incubaron a 37 ° C durante 10 min. El contenido de ADN de células de levadura se determinó usando un citómetro FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Palo Alto, California, Estados Unidos).

Los valores del contenido de ADN fueron registrados en base a la intensidad de su fluorescencia en comparación con la cepa haploide *S. cerevisiae* (S288c) y la cepa diploide (FY1679) usadas como referencia. El contenido del valor de ADN reportado para cada cepa es el resultado de dos

mediciones independientes. Los resultados fueron analizados por un ANOVA de una vía y una prueba de Tukey HSD ($\alpha=0,05$, $n=2$).

22. Análisis de los datos.

Para los análisis estadísticos realizados los tres capítulos de este trabajo, el ajuste de las curvas de crecimiento, las pruebas t-student las correlaciones, los análisis de varianza ANOVA de una vía, ANOVA factorial y pruebas de Tukey, se realizaron con el software STATISTICA 7.0. El Análisis de Componentes Principales (PCA) fue realizado en R, usando la función "prcomp". Las elipses se generaron usando la función "ellipse" con los mismos componentes usados en la gráfica con el 90% de significancia.

CAPÍTULO 1

1. Caracterización fisiológica y molecular de híbridos naturales entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*

Como se ha comentado en la introducción, frecuentemente se aíslan híbridos naturales entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* y siempre asociados a fermentaciones en áreas de clima frío (González et al., 2006; Lopandic et al., 2007; Erny et al., 2012; Peris et al., 2012a), condiciones predominantes en algunos países europeos. Estos híbridos son incluso levaduras dominantes durante las fermentaciones en esas regiones (Lopandic et al., 2007), debido a que están mejor adaptadas a fermentar a bajas temperaturas tal y como pudimos confirmar (Belloch et al., 2008). La capacidad de crecer y fermentar a bajas temperaturas en levaduras vínicas es una de las demandas del sector, ya que en la actualidad se están fermentando entre 12-18 °C los vinos jóvenes para mejorar los perfiles aromáticos (Torija et al., 2003).

La baja temperatura tiene efectos fisiológicos en la célula de levadura, como aumento de la fase de latencia, cambios en la fluidez de la membrana plasmática, afecta a la estabilidad de la estructura secundaria del RNA, modificación de la tasa de traducción y de plegamiento de proteínas (Torija et al., 2003). Se han descrito varios mecanismos de adaptación a bajas temperaturas por parte de *S. kudriavzevii*. En primer lugar, se ha observado un mecanismo claro asociado a la composición de la membrana, las cepas de *S. kudriavzevii* tienen porcentajes más altos de ácidos grasos de cadena media y de escualeno, así como menos contenido en ácidos grasos de cadena más cortas (Tronchoni et al., 2012). Otro posible mecanismo de adaptación a bajas temperaturas está relacionado con la mayor síntesis de glicerol producido por las cepas de *S. kudriavzevii* en fermentaciones a bajas temperatura en comparación con *S. cerevisiae* (González et al., 2007). Esta mayor producción de glicerol por parte de *S. kudriavzevii* fue confirmada por (Oliveira et al., 2014) y además los autores observaron una mayor expresión del gen *GPD1* en *S. kudriavzevii* en comparación con *S. cerevisiae* en condiciones de micro vinificación a baja temperatura. Por otro lado, (Tronchoni et al., 2014), observó un incremento en los niveles de expresión del gen marcador *NSR1*, que codifica una proteína

Capítulo 1

nuclear requerida para el procesamiento ARNr y que tiene como efecto en *S. kudriavzevii* un inicio más temprano de la traducción a bajas temperaturas, comparado con *S. cerevisiae*.

Finalmente se ha estudiado el papel de *GUT2* (una glycerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial) en el mantenimiento del fenotipo de crecimiento en frío en *S. kudriavzevii* (Paget et al., 2014). La disrupción del gen *GUT2* disminuyó la tolerancia criogénica de *S. kudriavzevii*, pero mejoró su desempeño a temperaturas cálidas, lo que sugiere el papel claro en la adaptación a frío por parte de *S. cerevisiae*.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, el objetivo de este estudio fue, en primer lugar, caracterizar la capacidad de crecer a bajas temperaturas de un gran número de cepas híbridas naturales, cepas que previamente se ha caracterizado su composición genómica mediante genómica comparada usando la técnica de GCH (“Comparative Genomic Hybridization”) (Belloch et al., 2008; Peris et al., 2012b). Por otra parte, determinar el impacto del genoma de *S. kudriavzevii* en los caracteres fenotípicos de estos híbridos y estudiar la influencia de los genes marcadores de frío descritos en *S. kudriavzevii*, como son *NSR1*, *GUT2* y *GPD1*. Los resultados obtenidos en este capítulo quedan recogidos en (Ortiz-Tovar et al., 2018).

1.1 Resultados

1.1.1 Capacidad de crecer a bajas temperaturas

Para estudiar la capacidad de crecer a diferentes temperaturas se realizaron dos aproximaciones diferentes; en primer lugar, se estudió el efecto de la baja temperatura sobre el crecimiento de la levadura en placas de agar (pruebas de goteo) y en segundo lugar se determinó la tasa de crecimiento específico (μ) y las fases de latencia (h^{-1}) mediante crecimiento en microplacas en un lector de placas (“Spectrostar”). Se estudiaron 23 híbridos entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, todos los híbridos son naturales y aislados de diferentes orígenes (ver Tabla M.1 de Material y Métodos), además

se utilizaron como control de la especie *S. kudriavzevii* la cepa CR85 y de *S. cerevisiae*, la cepa T73. Los crecimientos se realizaron a 8, 12 y 24°C.

1.1.2 Ensayos de goteo en placa

Las placas que contenían las diluciones seriadas de los 23 híbridos naturales y las dos cepas control se incubaron a las 3 temperaturas indicadas previamente siguiendo la metodología descrita en el apartado 8 de Material y Métodos. La Figura 1.1 muestra los resultados de crecimiento, las diluciones seriadas van de izquierda a derecha de manera que en la columna de la izquierda aparece la menor dilución y hacia la derecha aumenta la dilución. Las cepas se ordenaron de acuerdo con la susceptibilidad al frío respecto a 8 °C, temperatura donde se observa la mayor diferencia. Las cepas que aparecen en la parte superior de la Figura 1.1 son las que presentan mejor capacidad de crecer a bajas temperaturas, y en la parte inferior los híbridos que crecen peor a bajas temperaturas.

Los resultados se analizaron visualmente teniendo en cuenta la dilución máxima donde los híbridos dejaron de crecer, pero también el número y el tamaño de las colonias. A 24 °C no se observan grandes diferencias entre los híbridos y con las cepas de referencia, creciendo todos a diluciones bajas, lo que indica que no es una condición de estrés. Donde se observan diferencias es en el crecimiento a 12 °C, destacando en esta que el control de *S. cerevisiae* fue la cepa que peor creció a esta temperatura seguida de los híbridos cerveceros CECT 1990 y 11011. Sin embargo, las diferencias más relevantes se dieron a 8 °C. Teniendo en cuenta los datos a 8 °C, podemos dividir los híbridos en 2 grupos. El grupo A, donde se encuentran todos los híbridos vínicos excepto 2 cepas asiladas de Austria (HA 1835 y HA 1841), y que se caracterizan por crecer bien a esta temperatura, al igual que el representante de *S. kudriavzevii* (CR85).

Capítulo 1

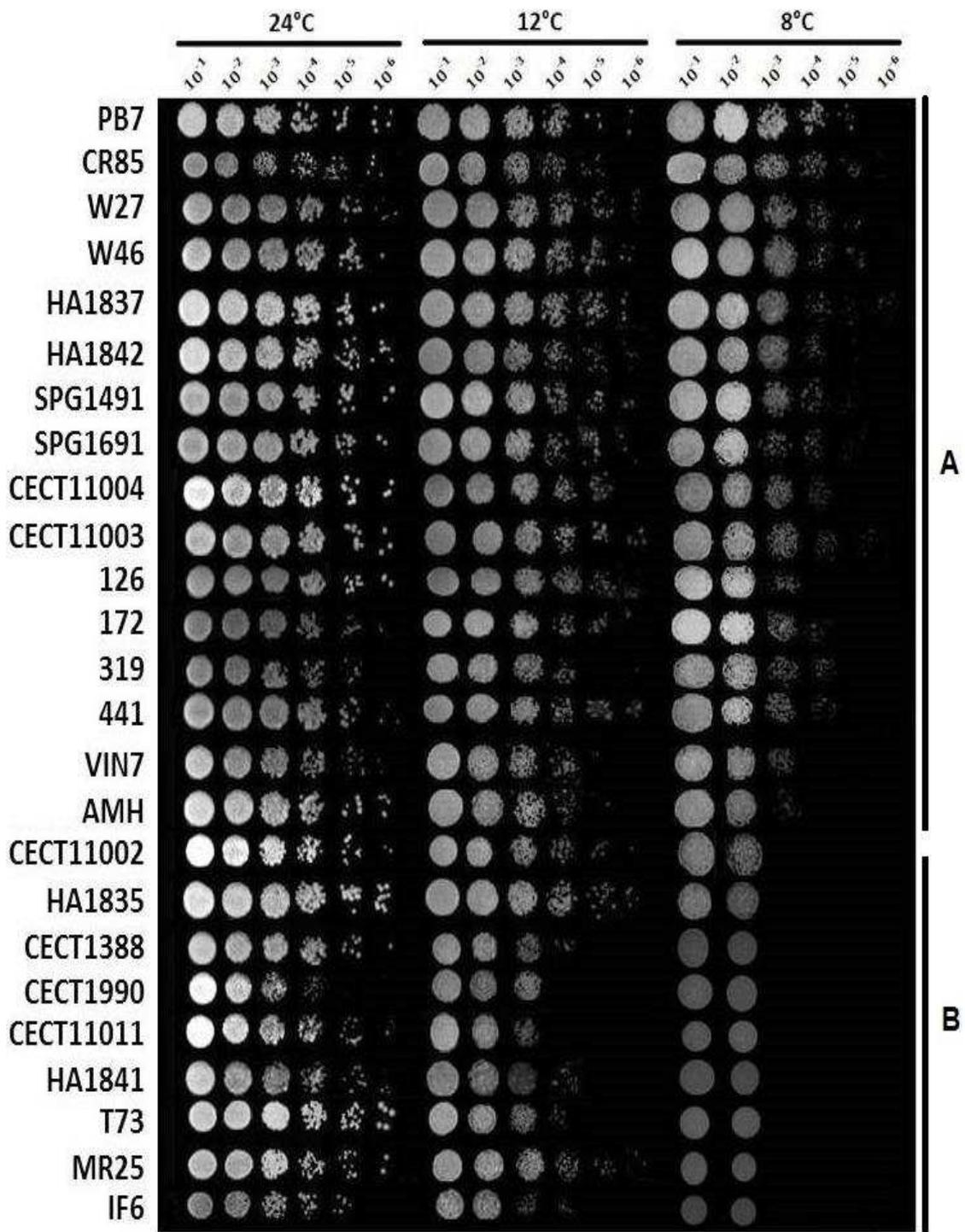


Figura 1.1. Ensayos de goteo en placa a 24, 12 and 8 °C. Las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, incluyendo una *S. cerevisiae* (T73) y *S. kudriavzevii* (CR85) representativas están ordenadas de forma descendente respecto a la capacidad de crecer a 8°C. Las cepas con mejor crecimiento están en la parte superior (A) y aquellas que peor crecieron están en la parte inferior (B). Los grupos se realizaron de acuerdo a la presencia de crecimiento en la dilución 10⁻³ a 8 °C.

El grupo B, donde se incluyen los híbridos con mayor problema para crecer a 8°C, al igual que la cepa T73, control de *S. cerevisiae* agrupa a la

mayoría de los híbridos no aislados de vinos (cerveza, aislado clínico y de suplemento dietético).

Cabe destacar que el híbrido PB7 era el híbrido que mostraba el mejor crecimiento en goteo en placa a esta temperatura, pero también fue uno de los que mejor crecían a 12 °C y 24 °C al igual que el control de *S. kudriavzevii* (CR85). Sin embargo, a 24 °C, su crecimiento se vio visiblemente afectado en comparación con otras cepas, como el control de *S. cerevisiae* (T73), que creció muy bien a esta temperatura.

1.1.3 Tasa de crecimiento y fase de latencia de los híbridos crecidos a bajas temperaturas

Para caracterizar mejor la capacidad de crecer a bajas temperaturas los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, se analizó la tasa de crecimiento y la fase de latencia a bajas temperaturas. Los híbridos se crecieron en microplacas en un lector de placas y se incubaron a 8, 12 y 24°C. Los resultados se muestran en la Figura 1.2, indicando en verde las cepas consideradas con buena capacidad a crecer a cada temperatura en función de la tasa de crecimiento (μ) y en rojo las que mostraron una μ baja. De las tres temperaturas de incubación, donde se observaron diferencias más significativas fue en la tasa de crecimiento a 8 °C (Figura 1.2a). En dicha figura, se observa que la cepa control de *S. kudriavzevii* (CR85) es la que presenta mayor μ (0,048 h⁻¹) a 8°C. Las cepas con menor μ son los híbridos naturales VIN7 e IF6, que presentaron alrededor del 16% del valor obtenido para CR85. En el mismo gráfico, observamos que los híbridos SPG14-91 y CECT1990 mostraron el mayor valor de μ a esta temperatura.

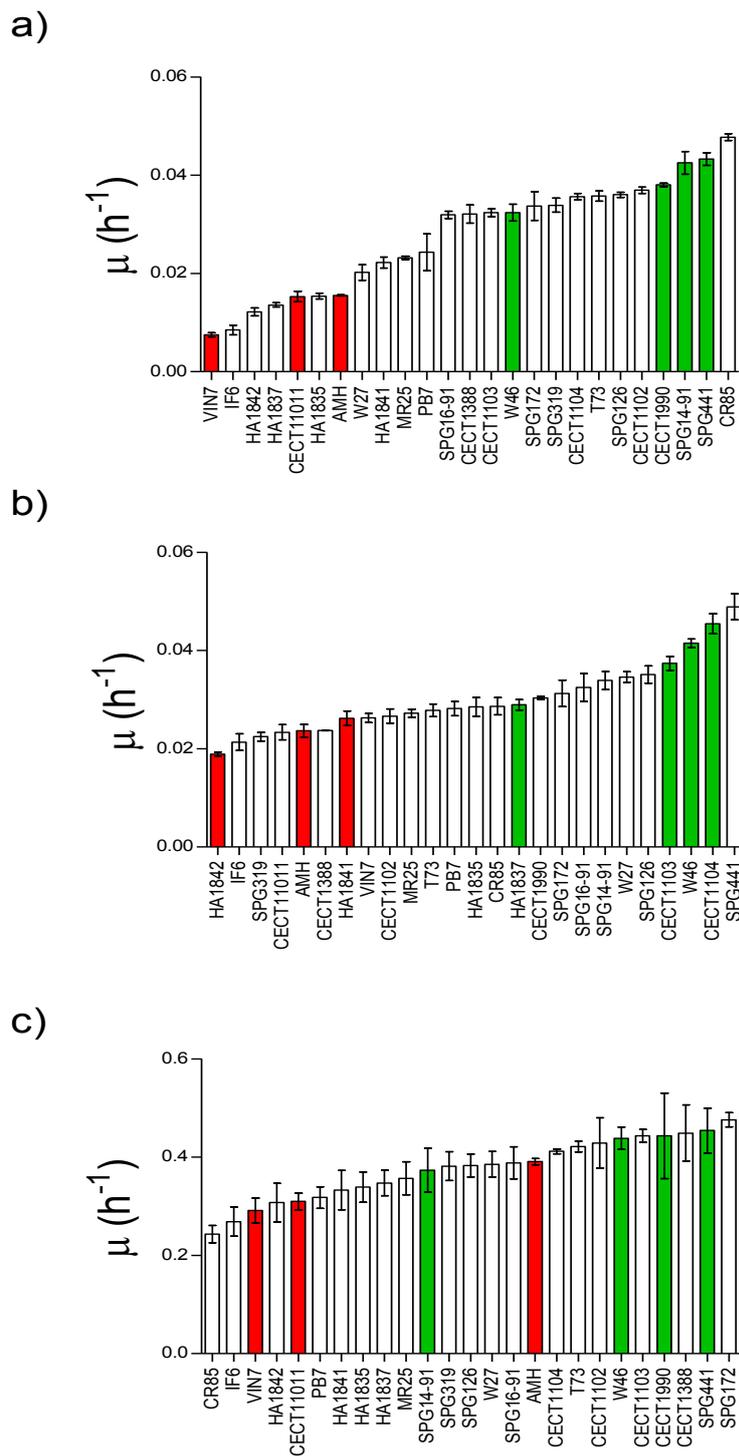
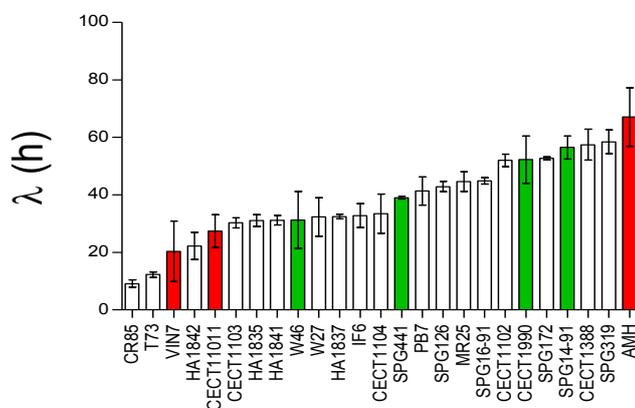


Figura 1.2. Tasa de crecimiento (h^{-1}) de híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, incluyendo las cepas representativas *S. cerevisiae* (T73) y *S. kudriavzevii* (CR85), a 8 °C (a), 12 °C (b) y 24 °C (c). Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Las cepas cuyo comportamiento bajo estrés por frío fue bueno se indican en color verde, mientras que las cepas malas se muestran en color rojo.

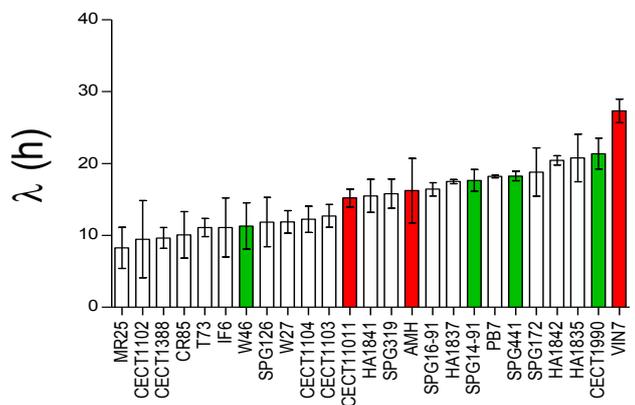
Los resultados obtenidos a 12 °C y 24 °C se muestran en la Figura 1.2b y 1.2c, respectivamente. La Figura 1.2b muestra, que la cepa SPG441 es la cepa con la mayor μ a 12 °C y con un valor de 0,048 h⁻¹. La cepa que mostró una menor μ fue el híbrido vínico HA1842, que también se encontraba entre las cepas con peor crecimiento en el estudio por goteos. Solo el 8% de las cepas alcanzaron valores superiores al 80% del valor máximo, y fueron los híbridos W46 y CECT11004. Analizando los resultados a 24°C, cabe destacar que las tasas de crecimiento alcanzadas (entre 0,24 a 0,47 h⁻¹) fueron 10 veces mayores que las obtenidas al crecer los híbridos a 8°C. A 24 °C, la cepa SPG172 mostró la mayor tasa de crecimiento e IF6 la menor μ .

Con los datos obtenidos del experimento anterior, además de calcular la μ para cada cepa y a cada temperatura, también se calculó la fase de latencia (λ). En la Figura 1.3 se muestran los datos para las tres temperaturas estudiadas. La Figura 1.3a muestra los valores de λ a 8°C. En primer lugar, cabe destacar una λ muy baja, tanto para la cepa control de *S. cerevisiae* como de *S. kudriavzevii*, comparando con los valores obtenidos para los híbridos, datos que sorprenden, ya que esperábamos que los híbridos tuvieran una λ más corta que *S. cerevisiae*. A 8 °C, el híbrido vínico AMH (es uno de los híbridos con menor genoma de *S. kudriavzevii*, como se muestra en el siguiente apartado, y tardó más tiempo en crecer que el resto de los híbridos, indicando la peor adaptación a crecer a 8°C, tardó aproximadamente 67 h (Figura 1.3a). Entre los híbridos que mostraron un valor de λ más corto, también está la cepa comercial VIN7 y HA1842, Sorprendentemente, según los datos obtenidos, una λ más corta no quiere decir mejor crecimiento, ya que la cepa HA1842 se encontraba entre las cepas que no crecían bien a 8°C en el experimento de goteo.

a)



b)



c)

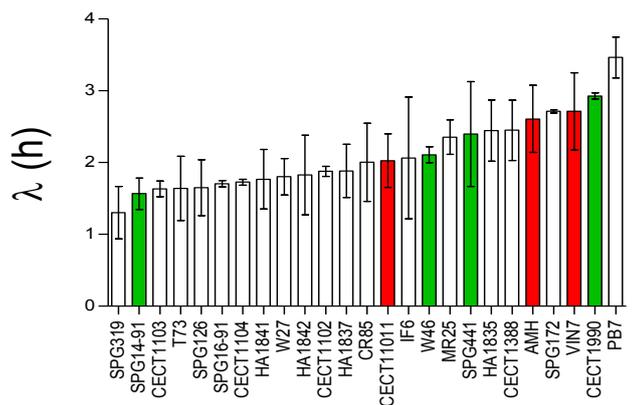


Figura 1.3. La fase de latencia (h) de los híbridos naturales *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, incluyendo a las cepas representativas *S. cerevisiae* (T73) y *S. kudriavzevii* (CR85), a 8°C (a), 12°C (b) y 24°C (c). Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Las cepas seleccionadas como buenas se muestran en color verde y las cepas seleccionadas como malas se muestran en color rojo.

En la Figura 1.3b y 1.3c se muestran los valores de λ obtenidos para el crecimiento a 12 y 24 °C respectivamente. Las diferencias en valor de λ entre las cepas analizadas tienden a disminuir a medida que aumenta la temperatura. A las temperaturas más bajas 8 y 12 °C, los valores mínimos de λ fueron de aproximadamente 9 h y el máximo estimado de λ fue 67 h para 8 °C y 32 h para 12 °C. A 24 °C, VIN7 también fue una de las cepas con la λ más larga, mientras que la cepa que mostró la λ más corta fue CR85. Respecto a los híbridos con menor λ están las cepas SPG319, SPG14-91, CECT1103; incluso con un valor λ más bajo que la cepa *S. cerevisiae* T73. Cabe destacar que las cepas que mostraron menor λ a 24°C, presentan la λ más larga a 8°C (SPG319 y SPG14-91).

1.1.4 Contribuye el genoma de *S. kudriavzevii* en la adaptación de los híbridos a bajas temperaturas

Como se ha descrito en la introducción, una de las ventajas de los híbridos es la capacidad de crecer a bajas temperaturas. Esta característica se ha asociado al parental *S. kudriavzevii*, especie que está muy bien adaptada a crecer a bajas temperaturas. Por esto nos pareció interesante saber si el genoma de *S. kudriavzevii* realmente tenía un papel importante en esta característica.

1.1.5 Correlación entre el contenido de genoma de los híbridos y la adaptación a crecer a bajas temperaturas.

Para determinar si el contenido del genoma de *S. kudriavzevii* en los híbridos tiene influencia en su adaptación a crecer a bajas temperaturas, se estudió la correlación entre el porcentaje de contenido de *S. kudriavzevii* en los híbridos y tres de los parámetros obtenidos en el apartado anterior, tasa máxima de crecimiento, fase de latencia y resistencia al frío, este último dato corresponde al crecimiento de la prueba de goteo. Estos análisis de correlación se realizaron mediante el test de Spearman y utilizando un intervalo de confianza del 95% utilizando el programa GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software San Diego, California, EUA). El porcentaje del contenido de genoma de

Capítulo 1

cada especie se muestra en la Tabla 1.1, datos obtenidos a partir de publicaciones previas (Belloch et al., 2008; Erny et al., 2012; Peris et al., 2012a).

De todas estas comparaciones, observamos solo una correlación significativa ($r = -0,5770$, $p = 0,0049$) entre el porcentaje de contenido de *S. kudriavzevii* y la fase de latencia a 8 °C (Figura 1.4), lo que confirma la importante contribución del genoma de *S. kudriavzevii* para el carácter criofílico de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*.

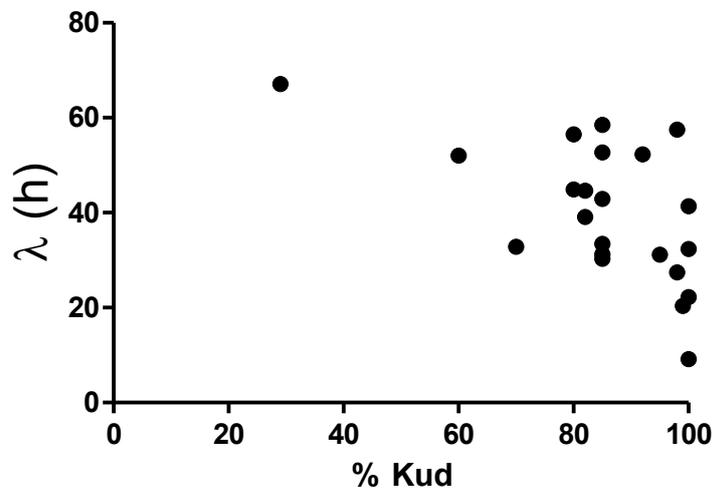


Figura 1.4. Correlación entre el porcentaje de *S. kudriavzevii* y la fase de adaptación de los híbridos a 8°C.

Por otro lado, y teniendo en cuenta los datos de un estudio previo (Peris et al., 2018, 2012b), los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se agrupan en seis grupos de acuerdo a su origen genético, estos grupos se indican en la Tabla 1. En este apartado, también quisimos estudiar si hay algún tipo de correlación entre estos grupos genéticos y la capacidad de adaptarse a crecer a bajas temperaturas. Para probar esto, realizamos un análisis de componentes principales (PCA) con la tasa de crecimiento y los datos de fase de latencia a 8, 12 y 24 °C. Los resultados se muestran en la Figura 1.5 indicando los grupos A, B, C, D, E y F de los híbridos. Tal y como se observa en dicha figura, no se observó ninguna correlación entre estos grupos y la capacidad de crecer en frío, excepto para el grupo A. El análisis PCA mostró que las cepas genéticamente incluidas en el Grupo A, las cuales fueron aisladas de las regiones de clima frío (Suiza y

Bélgica) y caracterizadas por nosotros como las mejor adaptadas al estrés por frío, también se agrupan en el presente análisis a la derecha del gráfico (ver Figura 1.5).

Los datos del contenido de genoma de la especie *S. kudriavzevii* en los híbridos se obtuvieron de datos previos del grupo obtenidos mediante análisis de GCH para *S. kudriavzevii* (Peris et al., 2018, 2012b). En la Tabla 1.1 se incluye el porcentaje de genoma correspondiente a la especie *S. kudriavzevii* de cada híbrido.

Capítulo 1

Tabla 1.1 Porcentaje de genoma correspondiente a la especie *S. kudriavzevii* de cada híbrido.

Cepa	Especie	Grupo	
		% de <i>S. kudriavzevii</i> (a)	de Origen (b)
HA 1835	Sc x Sk	nd	B
HA 1837	Sc x Sk	nd	B
HA 1841	Sc x Sk	95	B
HA 1842	Sc x Sk	100	B
VIN7	Sc x Sk	99	B
W27	Sc x Sk	100	A
W46	Sc x Sk	85	A
SPG 14-91	Sc x Sk	80	A
SPG 16-91	Sc x Sk	80	A
SPG 126	Sc x Sk	85	A
SPG 172	Sc x Sk	85	A
SPG 319	Sc x Sk	85	A
SPG 441	Sc x Sk.	82	A
AMH	Sc x Sk	29	F
PB7	Sc x Sk	100	E
CECT 1388	Sc x Sk	98	C
CECT 1990	Sc x Sk	92	C
CECT 11002	Sc x Sk	60	C
CECT 11003	Sc x Sk	85	A
CECT 11004	Sc x Sk	85	A
CECT 11011	Sc x Sk	98	C
MR25	Sc x Sk	82	C
IF6	Sc x Sk	70	D

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sk: *Saccharomyces kudriavzevii*; nd: No determinado; -: no aplica. ^a Composición genómica obtenida por análisis de RFLP (Peris et al., 2012a) e Hibridación Genómica Comparativa (CGH arrays) (Belloch et al., 2008; Erny et al., 2012; Peris et al., 2012c). Los porcentajes fueron calculados usando la fórmula $(S. kudriavzevii_{\text{hybrid}}/S. kudriavzevii) * 100$ relacionada con la longitud del tratamiento. 100% significa que el híbrido incluye al menos una copia del genoma completo de *S. kudriavzevii* y 50 %, por ejemplo, significa que el híbrido ha perdido la mitad del genoma *S. kudriavzevii*, reemplazado por alelos *S. cerevisiae*. ^b Clasificación asignada basada en el origen (Peris et al., 2012b).

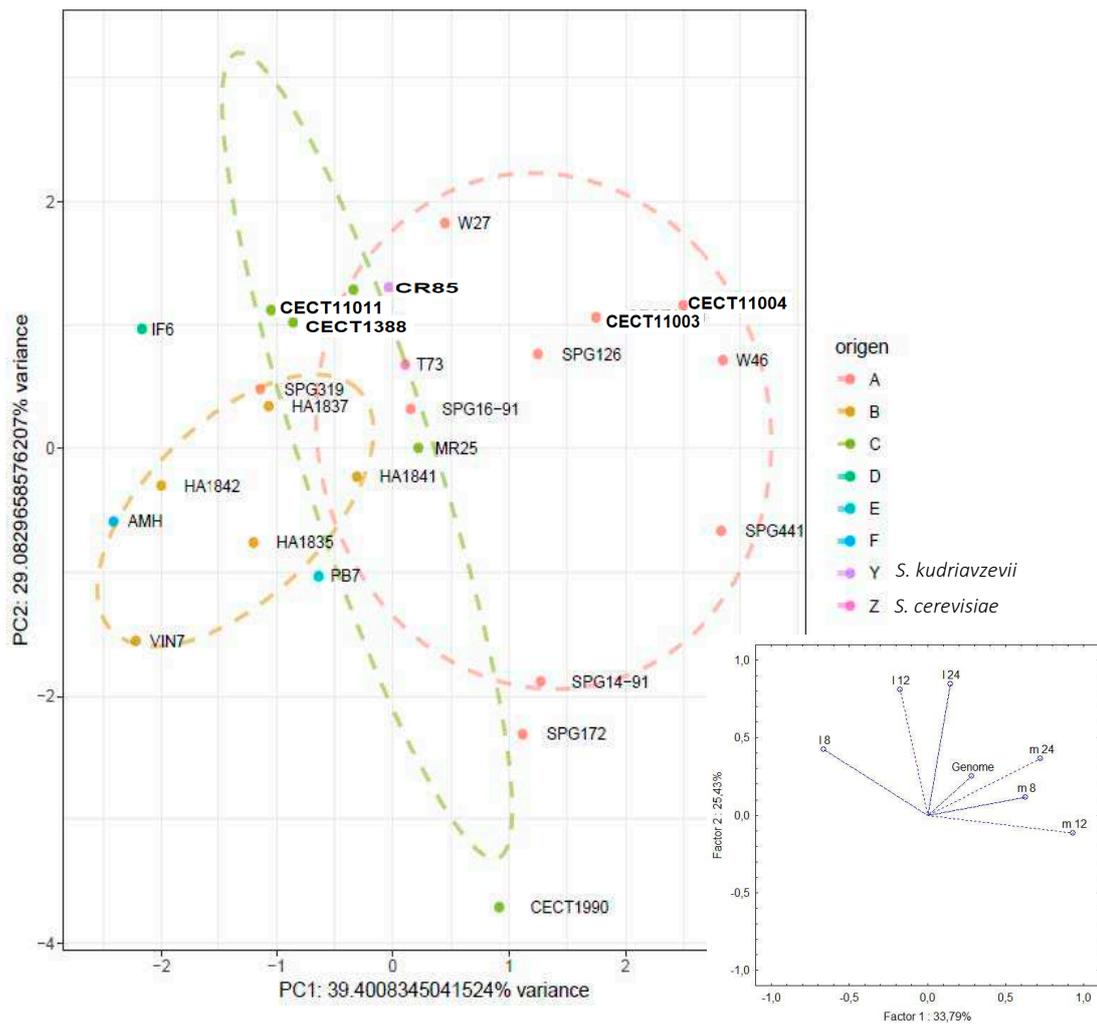


Figura 1.5 Análisis de componentes principales (PCA) de cepas híbridas de acuerdo a los datos fisiológicos que se muestran en pequeño al margen izquierdo de la figura. Los datos de tasa de crecimiento y la fase lag de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, incluyendo las cepas representativas *S. cerevisiae* (T73) y *S. kudriavzevii* (CR85). Además, se incluyó el porcentaje del genoma de *S. kudriavzevii* (Tabla 1.1). El grupo de cepas con el mismo origen (Grupos A a C) (Peris et al., 2012b) fueron encerrados por una línea elipsoide discontinua (90% de significación).

Los parámetros que agruparon a estas levaduras es el valor de μ al crecer las levaduras a 8 °C (Figura 1.5). Sin embargo, las cepas en los grupos B, D, E y F se encuentran a la izquierda del gráfico, influenciadas por su fase de latencia a 8 °C (ver Figura1.5).

También es interesante observar que la cepa de referencia de la especie *S. kudriavzevii* CR85, se encuentra junto al Grupo A de híbridos y la cepa T73, representante de *S. cerevisiae* se encuentra en el Grupo C.

Capítulo 1

1.1.6 Expresión relativa de los genes *NSR1*, *GPD1* y *GUT2* a baja temperatura

Como se ha comentado previamente, se han descrito 3 genes (*NSR1*, *GPD1* y *GUT2*) en la especie de *S. kudriavzevii* relacionados con la capacidad de crecer a bajas temperaturas. Para evaluar el impacto de los diferentes alelos de *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* en los híbridos sobre la capacidad de crecer a bajas temperaturas, se ha estudiado la expresión del alelo *S. cerevisiae* y el alelo de *S. kudriavzevii* en los híbridos durante el crecimiento a 12°C, en una selección de híbridos, que incluía tanto cepas que crecían bien a bajas temperaturas marcadas con verde (W46, CECT1990, SPG14-91 y SPG441), y las que presentaban peor crecimiento en rojo (VIN7, CECT11011, AMH) y como control de *S. cerevisiae* la cepa T73 y de *S. kudriavzevii*, la cepa CR85. En primer lugar, se diseñaron cebadores específicos para dichos genes y para cada especie (ver Material y Métodos, apartado 3), de manera que mediante análisis por qPCR se pueda detectar si en dichas condiciones se expresa el alelo de la especie *S. cerevisiae* o *S. kudriavzevii*.

En la Figura 1.6 se muestra la expresión relativa del alelo de *S. kudriavzevii* respecto a la expresión del alelo de *S. cerevisiae* para los genes *NSR1*, *GPD1* y *GUT2*. Los resultados mostraron en general que las cepas con una μ alta a 8 °C tenían una relación *Sk/Sc* significativamente mayor que las cepas con una baja μ para todos los marcadores del gen de estrés por frío ($p < 0,05$, t-student).

Para *NSR1*, observamos que la relación *Sk/Sc* fue mayor para la mayoría de las cepas consideradas buenas (verde). Dicha relación fue aproximadamente el doble para las cepas que presentaban mejor tasa de crecimiento (μ) tales como SPG14-91, W46 y SPG441.

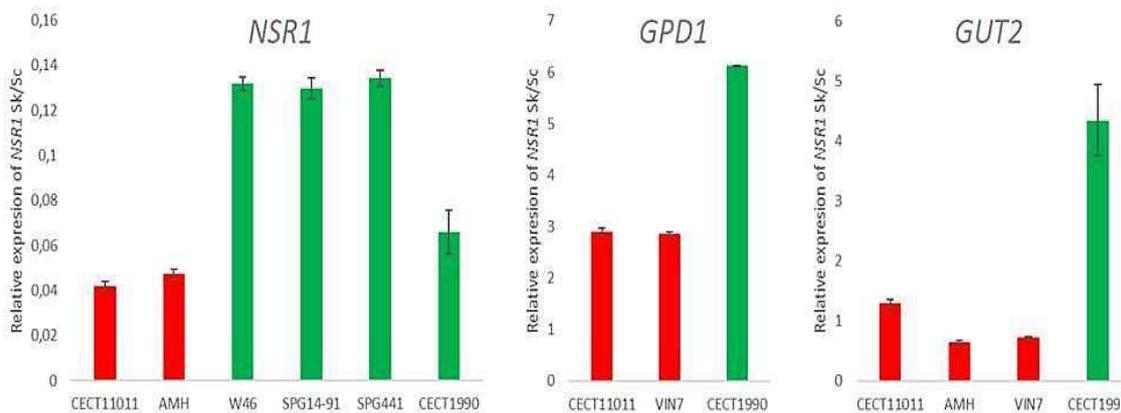


Figura 1.6. Expresión relativa del alelo *S. kudriavzevii* de los genes *NSR1*, *GUT2* y *GPD1* relacionados al alelo *S. cerevisiae* en una levadura híbrida natural a 8°C. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Los datos de las cepas seleccionadas como buenas fueron coloreados en verde y los datos de las cepas seleccionadas como malas fueron coloreados en rojo.

El resultado para la cepa VIN7 no se incluyó en la Figura 1.6 porque el alelo *S. kudriavzevii* no estaba presente en esta cepa híbrida. Las proporciones de la expresión del gen *GPD1* entre los alelos *S. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* obtenida en híbridos naturales también se muestran en la Figura 1.6. Para este gen, se observa una relación *Sk/Sc* de 6,12 para el híbrido CECT1990, y mayor que para las cepas VIN7 y CECT11011 (2,85 y 2,90 respectivamente), estas dos últimas cepas presentan menor (μ) a bajas temperaturas. No fue posible calcular la relación para las otras cepas debido a la ausencia de cualquiera de los alelos. La relación de la expresión relativa *Sk/Sc* de *GUT2* indicó que las cepas con una menor μ a 8 °C (AMH, VIN7 y CECT11011) tenían valores de 0,65, 0,72 y 1,30, respectivamente e inferiores a CECT1990, que tiene una relación *Sk/Sc* de 4,34, más de tres veces el valor obtenido para CECT11011. Para las cepas que no se muestra el valor, al igual que pasaba en los casos anteriores, es porque el alelo para algún híbrido no estaba presente.

1.2 Conclusiones

En este capítulo estudiamos la capacidad de los híbridos naturales *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* para crecer a baja temperatura. Los resultados mostraron diferencias significativas en la adaptación a bajas temperaturas. Teniendo en cuenta los datos obtenidos mediante el crecimiento por goteo, las

Capítulo 1

diferencias más significativas se observaron en el crecimiento a 8°C, y los híbridos se distribuyen en dos grupos. El grupo A, donde se encuentran todos los híbridos vínicos excepto 2 cepas asiladas de Austria (HA 1835 y HA 1841), donde además se incluye el control de la especie criotolerante de *S. kudriavzevii* (CR85). En el grupo B, donde se localiza la cepa T73 que corresponde al control de *S. cerevisiae*, se incluyen los híbridos con mayor problema para crecer a esta temperatura y agrupa a la mayoría de los híbridos no aislados de vinos (cerveza, aislado clínico y de suplemento dietético).

Respecto a los valores de μ y λ , al igual que pasa con goteos, los valores que diferencian mejor a los híbridos son los de crecimiento a 8°C. La cepa control de *S. kudriavzevii* (CR85) es la que presenta mayor μ (0,048 h⁻¹) a 8°C y las cepas con menor μ son los híbridos naturales VIN7 e IF6, mientras que los híbridos SPG14-91 y CECT1990 mostraron el mayor valor de μ a esta temperatura. Las diferencias en el valor de λ entre las cepas analizadas tienden a disminuir a medida que aumenta la temperatura. A las temperaturas más bajas 8 y 12 °C. La cepa que mostró la λ más corta fue CR85, a pesar de que presentó una mayor μ , es decir la adaptación a crecer a bajas temperaturas en esta especie es debida a que presenta una menor fase de latencia. Los híbridos que mostraron menor λ están son SPG319, SPG14-91, CECT1103.

Respecto a la relación de la adaptación a crecer a bajas temperaturas de estos híbridos y la composición del genoma, se ha observado una correlación significativa entre el porcentaje de contenido de *S. kudriavzevii* y la fase de latencia a 8 °C, lo que confirma la importante contribución del genoma de *S. kudriavzevii* para el carácter criofílico de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. Por otro lado, los resultados mostraron en general, que las cepas con una μ alta a 8 °C tenían una relación de expresión de los alelos de *S. kudriavzevii* respecto a *S. cerevisiae* para los genes *NSR1*, *GPD1* y *GUT2*, genes relacionados con la adaptación a crecer en frío de la especie *S. kudriavzevii*, significativamente mayor que las cepas con una baja μ para todos los marcadores del gen de estrés por frío.

CAPÍTULO 2

2. Microvinificaciones a baja temperatura usando híbridos interespecíficos naturales *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*

Es bien sabido que las fermentaciones para producir bebidas alcohólicas como el vino, la cerveza y la sidra se llevan a cabo principalmente por *S. cerevisiae*. Sin embargo, en las últimas dos décadas, un intenso desarrollo de las técnicas de biología molecular y las tecnologías de secuenciación de última generación han mejorado significativamente nuestra comprensión de las levaduras *Saccharomyces*. Hoy en día sabemos que muchas de las cepas de levadura que se han usado durante siglos han resultado ser híbridos interespecíficos (Peris et al., 2012; Krogerus et al., 2017; Pérez-Torrado et al., 2017).

La combinación de dos genomas con diferentes características genéticas puede ser ventajosa para la supervivencia en condiciones desfavorables o para la colonización de nuevos nichos ambientales (Belloch et al., 2008) mejorando la flexibilidad genética y promoviendo el cambio adaptativo (Greig, 2002). En el caso del género *Saccharomyces*, uno de los mecanismos más interesantes observados en su adaptación a los procesos industriales es la formación de híbridos interespecíficos (de Barros Lopes et al., 2002).

Como hemos descrito en la introducción y en el capítulo anterior, se han encontrado híbridos naturales de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* asociados a procesos de fermentación de zonas templadas de Europa, regiones de clima oceánico y continental como Inglaterra, Bélgica, Alemania, Bretaña francesa y Alsacia en Francia, Suiza y Austria (González et al., 2008). Los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* exhiben buenas capacidades fermentativas a bajas temperaturas y producen vinos con menores cantidades de alcohol y mayores cantidades de glicerol, que pueden ser muy útiles para resolver desafíos en la industria vinícola, como la necesidad de mejorar el perfil del aroma (Tronchoni et al., 2017). En el objetivo 1 nos hemos centrado en estudiar las diferencias en la capacidad de crecer a bajas temperaturas de la mayoría de los híbridos descritos y su correlación con la expresión de algunos genes

Capítulo 2

relacionados con la adaptación a crecer a bajas temperaturas en *S. kudriavzevii* como son *NSR1*, *GPD1* and *GUT2* y en este objetivo hemos caracterizado enológicoamente estos híbridos, incluyendo además un análisis de metabolitos típicos, como azúcares residuales, glicerol y etanol y los aromas producidos. Como se ha comentado anteriormente, nuestro grupo ha caracterizado genéticamente estos híbridos (Belloch et al., 2009; Peris et al., 2018, 2012). Por otro lado, y teniendo en cuenta los datos de un estudio previo, los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se agrupan en seis subgrupos de acuerdo a su origen genético, estos grupos se indican en la Tabla 1.1 del primer capítulo. En el capítulo 1 hemos estudiado y observado una correlación entre la fase λ y estos grupos genéticos, así como la capacidad de adaptarse a crecer a bajas temperaturas, este agrupamiento ha sido claro para los híbridos vínicos. En este capítulo hemos realizado el mismo estudio, pero con las características enológicas de estos híbridos.

2.1 Resultados

Se evaluó la capacidad de fermentación de los híbridos naturales aislados de diferentes ambientes y regiones geográficas. La evaluación se realizó en condiciones que simulaban la fermentación vínica, en mosto sintético a baja temperatura (12°C) y agitación controlada. *S. cerevisiae* T73 y *S. kudriavzevii* CR85 fueron utilizadas como cepas de control. En la Tabla 2.1 se muestran los valores obtenidos para los parámetros más relevantes al final de la fermentación, incluyendo azúcares reductores, alcohol, glicerol y ácidos orgánicos.

Tabla 2.1. Parámetros relativos a la curva de consumo de azúcares de los híbridos naturales.

Cepa	Parámetro			
	m (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Fase de adaptación (horas)	t95 (horas)	t50 (horas)
CR85	0,35±0,00 ^{a-d}	84,57±6,51 ^{c-e}	498,96±12,42 ^{e-h}	85,07±6,51 ^{d,e}
T73	0,31±0,01 ^{a,b}	64,69±32,57 ^{a-d}	573,35±6,75 ^h	65,2±2,57 ^{b-e}
SPG126	0,52±0,15 ^{a-e}	39,58±0,82 ^{a-d}	350,4±76,92 ^{a-e}	40,09±0,82 ^{a-c}
AMH	0,31±0,00 ^{a,b}	75,87±17,78 ^{b-d}	558,92±16,38 ^{g,h}	76,37±17,8 ^{c-e}
CECT1102	0,41±0,00 ^{a-e}	49,07±1,22 ^{a-d}	360,60±0,39 ^{a-e}	49,55±1,21 ^{a-d}
IF6	0,56±0,00 ^{a-e}	60,71±4,20 ^{a-d}	303,05±2,08 ^{a-c}	61,2±4,2 ^{a-e}
SPG14-91	0,56±0,21 ^{b-e}	29,79±4,10 ^{a,b}	296,45±76,31 ^{a-c}	30,29±4,11 ^{a,b}
SPG16-91	0,47±0,02 ^{a-e}	76,72±8,34 ^{b-d}	387,67±1,33 ^{a-f}	77,22±8,35 ^{c-e}
SPG441	0,44±0,00 ^{a-e}	21,68±0,73 ^a	332,32±2,63 ^{a-d}	22,17±0,73 ^a
MR25	0,36±0,02 ^{a-e}	51,98±0,82 ^{a-d}	435,18±6,91 ^{c-h}	52,47±0,81 ^{a-e}
CECT11003	0,46±0,11 ^{a-e}	38,09±1,44 ^{a-c}	382,35±72,77 ^{a-e}	38,6±1,11 ^{a-c}
CECT1104	0,37±0,02 ^{a-e}	63,04±16,11 ^{a-d}	472,00±30,41 ^{d-h}	63,54±16,1 ^{a-e}
W46	0,56±0,05 ^{a-e}	30,32±3,65 ^{a,b}	287,38±11,06 ^{a-c}	30,82±3,66 ^{a,b}
SPG172	0,61±0,10 ^{d,e}	31,24±7,30 ^{a,b}	284,51±34,55 ^{a-c}	31,75±7,3 ^{a,b}
SPG319	0,50±0,06 ^{a-e}	44,64±5,08 ^{a-d}	340,62±31,62 ^{a-d}	45,14±5,08 ^{a-d}
CECT1990	0,43±0,01 ^{a-e}	58,72±4,10 ^{a-d}	365,93±13,25 ^{a-e}	59,21±4,1 ^{a-e}
HA1841	0,63±0,01 ^e	43,51±2,90 ^{a-d}	266,02±4,73 ^a	44,01±2,89 ^{a-d}
CECT1388	0,28±0,01 ^a	53,04±5,62 ^{a-d}	571,78±17,55 ^h	53,54±5,62 ^{a-e}
CECT11011	0,38±0,00 ^{a-e}	30,91±1,41 ^{a,b}	382,58±6,99 ^{a-e}	31,41±1,41 ^{a,b}
VIN7	0,53±0,01 ^{a-e}	130,94±21,67 ^e	420,56±48,94 ^{b-g}	131,45±21,67 ^f
HA1842	0,48±0,04 ^{a-e}	50,29±8,19 ^{a-d}	352,55±24,30 ^{a-e}	50,79±8,19 ^{a-e}
W27	0,60±0,01 ^{c-e}	36,95±2,18 ^{a-c}	276,13±0,06 ^{a,b}	37,45±2,18 ^{a-c}
PB7	0,32±0,00 ^{a-c}	70,08±16,78 ^{a-d}	534,97±12,08 ^{f-h}	70,58±16,8 ^{b-e}
HA1835	0,52±0,06 ^{a-e}	92,17±0,13 ^{d,e}	390,53±27,17 ^{a-f}	92,68±0,13 ^{e-f}
HA1837	0,45±0,02 ^{a-e}	53,53±2,38 ^{a-d}	383,96±29,02 ^{a-e}	54,03±2,38 ^{a-e}

Las letras en superíndice indican el grupo homogéneo significativo obtenido por análisis ANOVA de una vía (Prueba de Tukey, n=2, p-valor<0,05).

2.1.1 Consumo de azúcares totales

Tal y como se puede observar en la Tabla 2.1, todas las cepas, a excepción de *S. cerevisiae* T73, consumieron el 100% de los azúcares presentes en el mosto sintético.

Capítulo 2

Tabla 2.2 Concentraciones de los principales metabolitos al final de la fermentación.

Cepa	Metabolito				
	Glucosa	Fructosa	Glicerol	Etanol	Acético
CR85	0	0	7,01±0,13 ^{b,c}	11,39±0,05 ^{a,b}	982,86±13,18 ^{i,j}
T73	0	1,00±0,09	4,62±0,01 ^{a,b}	11,73±0,05 ^{a-c}	912,84±48,18 ^{g,h,i}
SPG126	0	0	4,55±0,24 ^a	11,76±0,19 ^{b,c}	744,86±10,66 ^{b-e}
AMH	0	0	4,39±0,04 ^a	12,03±0,05 ^{b,c}	834,69±35,50 ^{d-h}
CECT1102	0	0	5,04±0,01 ^{a-c}	11,97±0,09 ^{b,c}	764,66±1,69 ^{b-f}
IF6	0	0	4,92±0,08 ^{a-c}	11,95±0,03 ^{b,c}	761,88±29,85 ^{b-f}
SPG14-91	0	0	4,44±0,15 ^a	11,9±0,07 ^{b,c}	568,96±22,71 ^a
SPG16-91	0	0	4,24±0,05 ^a	11,81±0,03 ^{b,c}	720,55±0,42 ^{b-f}
SPG441	0	0	4,36±0,03 ^a	12,05±0,01 ^{b,c}	758,18±4,89 ^{b-f}
MR25	0	0	5,68±0,04 ^{a-c}	11,74±0,12 ^{b,c}	1075,97±57,81 ^{i,k}
CECT11003	0	0	4,09±0,3 ^a	11,79±0,09 ^{b,c}	669,17±33,27 ^{a,b}
CECT1104	0	0	4,52±0,08 ^a	11,95±0,14 ^{b,c}	784,84±17,42 ^{b-f}
W46	0	0	4,95±0,04 ^{a-c}	11,75±0,68 ^{b,c}	747±9,36 ^{b-e}
SPG172	0	0	4,85±0,24 ^{a-c}	11,82±0,12 ^{b,c}	685,93±24,39 ^{a-c}
SPG319	0	0	4,43±0,02	12,11±0,01 ^c	798,65±5,61 ^{c-g}
CECT1990	0	0	5,09±0,29 ^{a-c}	12,17±0,28 ^c	790,87±37,65 ^{b-g}
HA1841	0	0	4,81±0,06 ^{a,b}	11,98±0,06 ^{b,c}	850,54±64,62 ^{e-h}
CECT1388	0	0	4,07±0,03 ^a	11,83±0,12 ^{b,c}	724,12±28,12 ^{b-d}
CECT11011	0	0	5,12±0,07 ^{a-c}	11,99±0,04 ^{b,c}	1100,11±8,64 ^{i,k}
VIN7	0	0	7,27±2,92 ^c	11,78±0,05 ^{b,c}	1111,74±36,26 ^k
HA1842	0	0	4,33±0,11 ^a	12,05±0,02 ^{b,c}	872,19±11,61 ^{f-i}
W27	0	0	4,33±0,01 ^a	11,05±0,06 ^a	675,67±0,28 ^{a-c}
PB7	0	0	5,26±0,15 ^{a-c}	11,96±0,03 ^{b,c}	1138,32±24,93 ^k
HA1835	0	0	4,41±0,44 ^a	11,67±0,21 ^{a-c}	945,07±17,06 ^{h,i}
HA1837	0	0	4,71±0,10 ^{a,b}	12,08±0,09 ^{b,c}	940,00±42,84 ^{h,i}

Las letras en superíndice indican el grupo homogéneo significativo obtenido por análisis ANOVA de una vía (Prueba de Tukey, n=2, p-valor<0,05).

En la Figura 2.1 se representan gráficamente el consumo de azúcares, agrupando los híbridos en función de su región y tipo de fermentación de aislamiento (vino, cerveza u origen no alcohólico), con la finalidad de poder visualizar mejor las diferencias. Todos los híbridos pudieron fermentar bien a bajas temperaturas, como hemos comentado anteriormente, pero también incluso los híbridos aislados de cervezas o de pacientes de hospital y de un suplemento nutricional, estos últimos de ambientes no alcohólicos. Analizando con más detalle dicha figura, se puede observar que los híbridos véricos presentan un tiempo de latencia más corto, lo que indican una mejor

adaptación a las condiciones de crecimiento ensayadas, como era de esperar, datos que analizamos a continuación con más detalle.

Capítulo 2

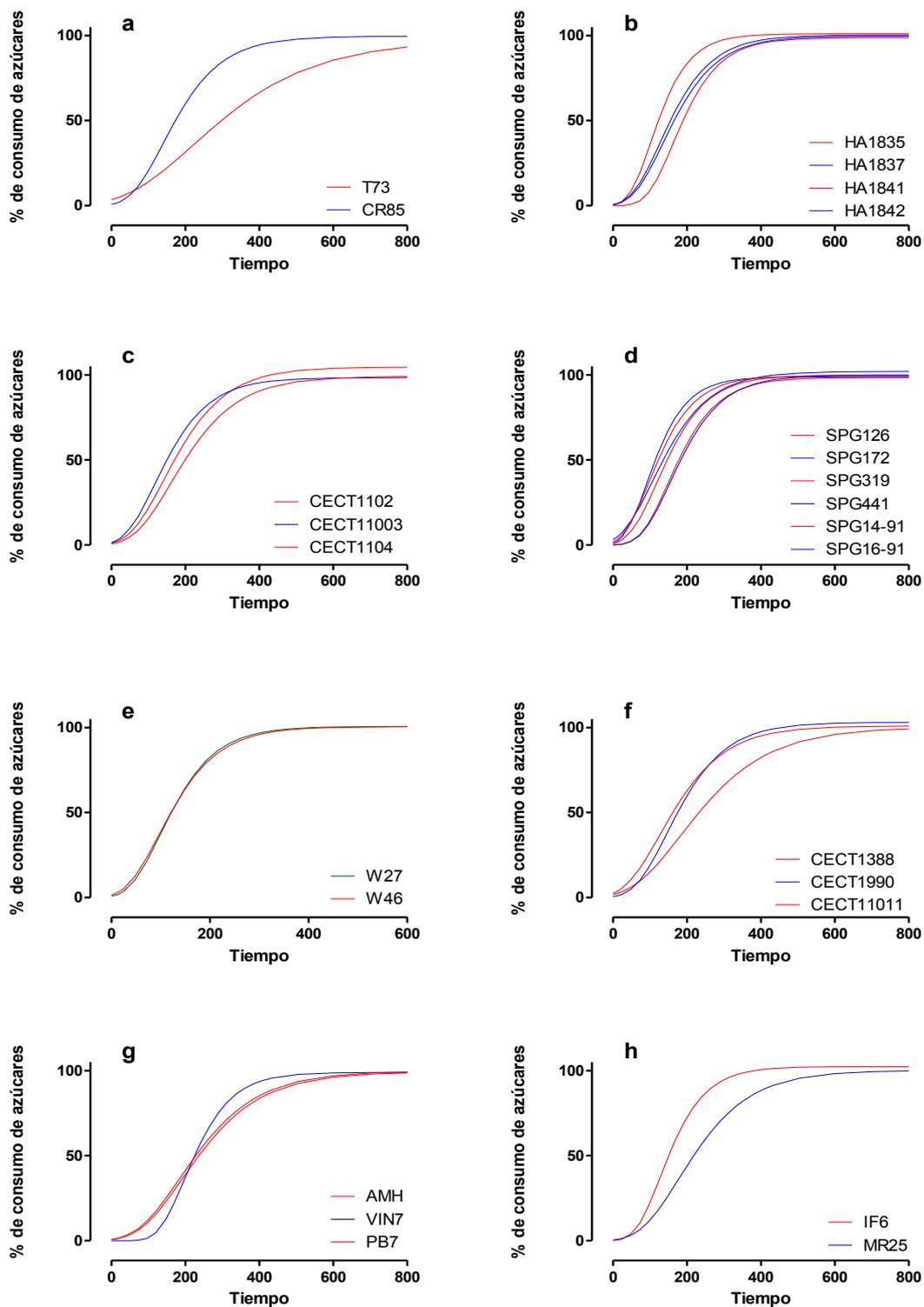


Figura 2.1. Cinéticas de consumo de azúcares de *S. cerevisiae* T73(a), *S. kudriavzevii* CR85(a) y 23 híbridos naturales provenientes de diferentes ambientes y de distintas regiones del mundo. Vino austriaco (b), Cerveza belga (c), Vino suizo (d y e), Cerveza alemana, inglesa y neozelandesa (f), Vino alemán, sudafricano y español (g), Origen no alcohólico (h).

2.1.2 Tiempo requerido para consumir el 50% de azúcares totales

Teniendo en cuenta el tiempo en consumir el 50% de los azúcares, es posible analizar las cepas que se adaptan mejor a iniciar la fermentación y tienen una fase de latencia más corta. En primer lugar, cabe destacar que los híbridos fueron los primeros en consumir el 50% de azúcares presentes en el mosto sintético comparando con las cepas control de *S. cerevisiae* (T73) como representante de una levadura vínica y CR85 de *S. kudriavzevii*, como representante de una especie mejor adaptada a crecer a bajas temperaturas.

En la Figura 2.5. se muestra de forma gráfica el tiempo en consumir el 50% de los azúcares, indicando en verde los híbridos más rápidos en iniciar la fermentación y en rojo los que necesitaron más tiempo. Tal y como se observa en dicha Figura, el híbrido SPG441 fue el primero en consumir de 50% de azúcares, seguido de SPG14-91, W46, CECT11011 y SPG172, todos estos híbridos vínicos fueron aislados de la misma región geográfica, excepto la cepa CECT11011, aislada de cerveza. Las cepas que presentaron más problemas para iniciar la fermentación son PB7, AMH, SPG16-91, HA1835, VIN7 que se agrupan junto a *S. kudriavzevii* y muy próximos al control de *S. cerevisiae*. En este grupo todas las cepas son de origen vínico y los híbridos cerveceros se sitúan entre ambos grupos.

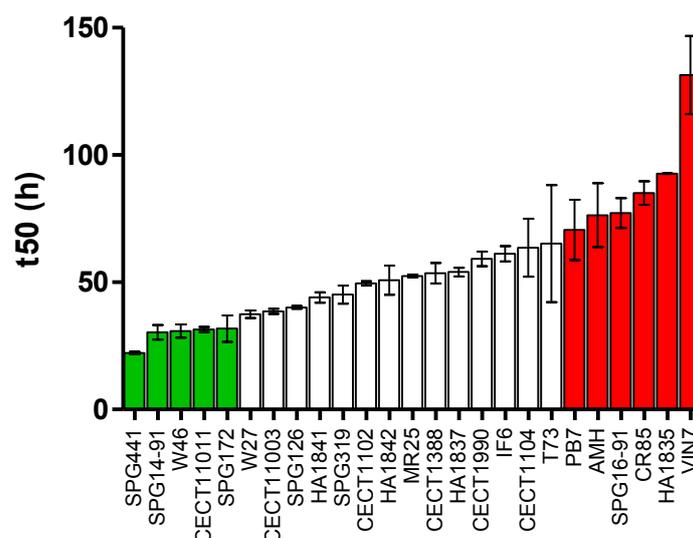


Figura 2.2 Tiempo transcurrido para el consumo del 50% de los azúcares presentes en el mosto sintético (t50) por *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C.

Capítulo 2

2.1.3 Tiempo requerido para consumir el 95% de azúcares totales

En este apartado analizamos el tiempo en consumir el 95% de los azúcares, es decir el tiempo necesario para considerar acabada la fermentación. La fermentación realizada por la cepa control de *S. cerevisiae* T73 se completó después de 570 horas, es decir aproximadamente 24 días, mientras que la cepa de *S. kudriavzevii* CR85 requirió en promedio un tiempo de 500 horas, es decir, necesitó aproximadamente 21 días para finalizar la fermentación. Al igual que hemos realizado en el apartado anterior, en la Figura 2.6. se muestra de forma gráfica el tiempo en consumir el 95% de los azúcares, indicando en verde los híbridos más rápidos en acabar la fermentación y en rojo los que necesitan más tiempo en acabar la fermentación. Las cepas más rápidas fueron HA1841, W27, SPG172, W46 y SPG14-91, todas de origen vínico y de la misma región de aislamiento, Suiza, excepto la cepa HA1841 que es austriaca. Resulta interesante indicar que todas las cepas suizas también fueron las más rápidas en consumir el 50% de los azúcares (Figura 2.2). Entre los híbridos que tardaron más en acabar la fermentación se encuentran los híbridos vínicos PB7 (de León) y AMH (de Alemania), así como los cerveceros CECT1104 y CECT1388, el aislado clínico MR25 y los dos controles, T73 y CR85. En este caso, no se observa una relación clara entre los híbridos con mayor tiempo del 50% del consumo de azúcares y más tiempo en acabar la fermentación, esto solo ocurre con los híbridos vínicos PB7 y AMH. Cabe destacar que el híbrido AMH, es un híbrido tetraploide con el menor contenido en su genoma de la especie *S. kudriavzevii*, tal como indicamos en el capítulo 1, y que PB7 también es un híbrido tetraploide, que además pertenece a un linaje único, distinto a los demás.

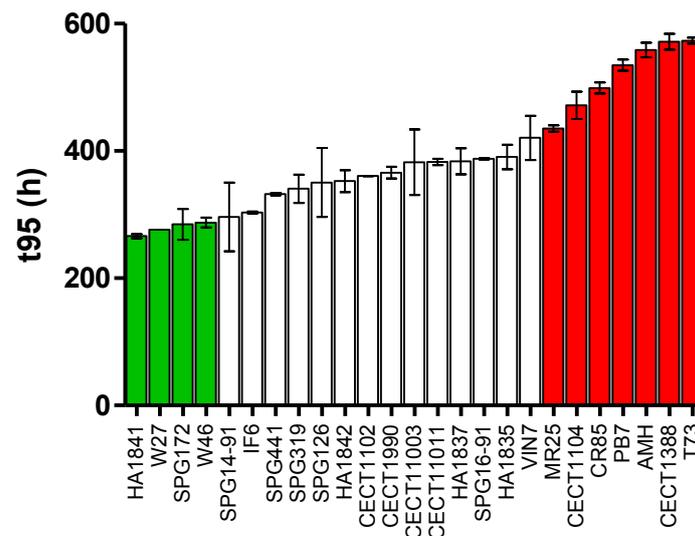


Figura 2.3. Tiempo transcurrido para el consumo del 95% de los azúcares presentes en el mosto sintético (t_{95}) por *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C.

2.1.4 Tasa máxima de consumo de azúcares

En la Figura 2.2. se indican en color verde las cepas con las tasas de consumo de azúcares (m) más altas y en color rojo, aquellas cepas que mostraron los valores más bajos para este parámetro. De acuerdo con nuestros resultados, las cepas más rápidas fueron los híbridos con origen vínico HA1841, SPG172 y W27 con valores de m iguales a 0,635, 0,609 y 0,596 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. La cepa más lenta fue la cepa aislada de cerveza, CECT1388 con una tasa máxima de consumo de azúcares promedio de 0,28 g L⁻¹ h⁻¹. Sin embargo, se puede observar que las cepas *S. cerevisiae* T73 y *S. kudriavzevii* CR85 se encuentran entre las cepas con la menor tasa máxima de consumo de azúcares, junto a los híbridos AMH y PB7, los cuales también fueron aisladas de ambientes vínicos, por lo que no puede establecerse una clara relación entre la fuente de aislamiento y el comportamiento de este parámetro, aunque como ya se ha indicado antes, estos dos últimos híbridos son tetraploides y singulares.

La tasa máxima de consumo de azúcar (m) fue 2,29 veces mayor para la cepa más rápida (HA1841) que para la cepa más lenta (CECT1388). Las cepas aisladas de ambientes no relacionados con fermentaciones de bebidas

Capítulo 2

alcohólicas MR25 e IF6 presentan valores de 0,36 y 0,50 g L⁻¹ h⁻¹ respectivamente.

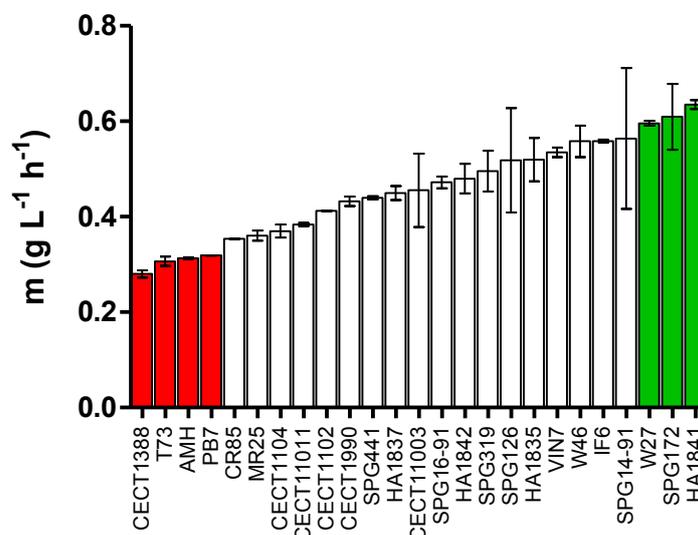


Figura 2.4. Tasa máxima de consumo de azúcares (m) de *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C.

2.1.5 Fase de adaptación

En lo que respecta a este parámetro, conocido como fase de latencia o de adaptación (λ), nuestros resultados indican que λ fue más corta para la mayoría de los híbridos naturales que para las cepas *S. cerevisiae* T73 y *S. kudriavzevii* CR85. En promedio, la fase de adaptación para *S. kudriavzevii* CR85 fue de 84.5 horas, mientras que el tiempo de adaptación promedio para el híbrido SPG441 fue de 21,7 horas, es decir, 3.89 veces mayor para la cepa de referencia que para el híbrido natural. En la Figura 2.3 se puede observar los resultados coloreados en verde para aquellas cepas con los valores más bajos para este parámetro, mientras que se muestran en rojo aquellas cepas que mostraron los valores más altos para la fase de adaptación.

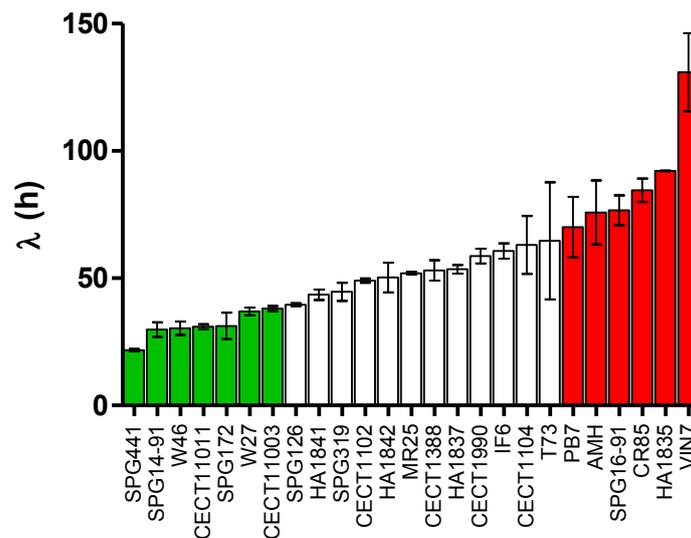


Figura 2.5. Fase de adaptación (λ) de *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C.

2.1.6 Producción de metabolitos

Las concentraciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol se midieron por HPLC tal y como hemos descrito en el apartado 13 de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 2. En primer lugar, cabe destacar la producción de glicerol respecto al parental *S. cerevisiae*, al contrario de lo esperado, no se observan diferencias significativas excepto para el híbrido natural VIN 7 que produjo una concentración de glicerol de 7,3 g L⁻¹, incluso mayor que el control de *S. kudriavzevii* (CR85) que produjo 7,0 g L⁻¹, siendo ambas cepas de mayor síntesis de glicerol (en verde). El resto de las cepas produjeron cantidades menores con concentraciones desde 4,1 g L⁻¹ hasta 5,7 g L⁻¹, cuyas diferencias no son estadísticamente significativas. El control de *S. cerevisiae* T73 produjo alrededor de 4,6 g L⁻¹ de glicerol, una producción intermedia.

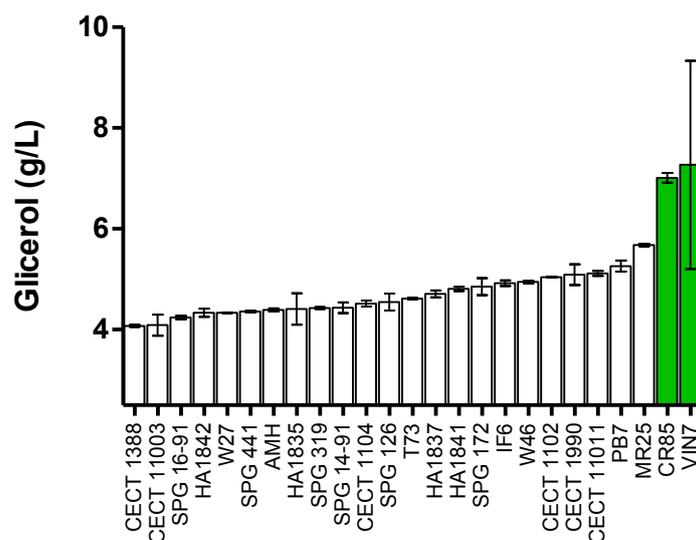


Figura 2.6. Producción de glicerol por *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C.

Otro parámetro importante en el caso de los híbridos es el rendimiento en etanol, ya que tal y como hemos descrito en la introducción, una de las características de fermentar con la especie *S. kudriavzevii* es el menor rendimiento en etanol respecto a *S. cerevisiae*. Tal y como se observa en la Figura 2.7, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de etanol producido por las cepas analizadas, excepto para el híbrido W27 y el control de *S. kudriavzevii* (CR85), que además fueron las que mostraron menor rendimiento produciendo 11,04% y 11,39% de etanol, respectivamente.

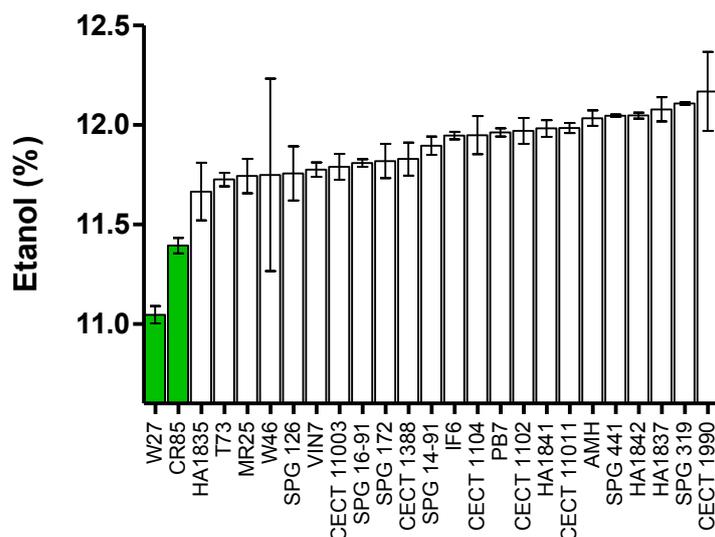


Figura 2.7. Producción de etanol por *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* CR85 y 23 híbridos naturales en mosto sintético a 12°C.

2.1.7 Producción de aromas

Otro de los parámetros de interés en una vinificación son los aromas, en este apartado hemos estudiado las diferencias en la síntesis de aromas producidos entre los diferentes híbridos, centrándonos en alcoholes superiores y ésteres. Se tomaron muestras la final de la fermentación y se analizaron por cromatografía de gases tal y como está descrito en material y métodos.

En la Tabla 2.3 se muestran los resultados, indicando en negrita los compuestos para los que se observan diferencias significativas. En dicha tabla se observa que la cepa CECT 11002 es la cepa que produce mayor concentración de acetato de isoamilo (aroma a banana y pera), acetato de 2 fenil-etanol (aroma a fruta y flores) y de 2 fenil alcohol (aroma a flores y más particularmente a rosas). El híbrido clínico destaca por la producción de acetato de isobutanol (aroma en exceso no deseado, recuerda a hidrocarburos), SPG172 por la producción de hexanoato de etilo (manzana); SPG319 por la producción de isobutanol y alcohol isoamílico (esmalte), ambos no deseados y HA1841 por la producción de acetato de etilo (no deseado, pegamento). Con el resto de los compuestos y cepas no se observan diferencias significativas.

Por otro lado, consideramos la producción de alcoholes superiores y ésteres en global, en este caso se observó que la cepa que produce mayor concentración de alcoholes superiores fue SPG319, pero debido a que produce altas concentraciones de dos alcoholes no deseados como son isobutanol y alcohol isoamílico. Respecto a la producción de ésteres, es la cepa HA1841, pero al igual que en el caso anterior, por producir un aroma no deseado, acetato de etilo.

Teniendo en cuenta todos los datos los híbridos que muestra diferencias significativas en la síntesis de aromas que contribuyen positivamente en el aroma global del vino son, CECT 11002 por producir acetato de isoamilo, acetato de 2 fenil-etanol y de 2 fenil alcohol y SPG172 por la producción de hexanoato de etilo. No se ha observado una correlación entre el perfil aromático y el origen cervecero o vínico, ya que de las dos cepas que muestran diferencias significativas, el primero corresponde a un aislado cervecero y el segundo vínico.

Tabla 2.3 Concentraciones de los principales compuestos aromáticos al final de la fermentación.

Cepa	Etil acetato	Isobutil acetato	Isobutanol	Isoamil acetato	Alcohol isoamilico	Etil hexanoato	2-feniletíl acetato	Alcohol bencilico	2-fenil etanol	Alcoholes superiores totales	Ésteres totales
CECT11002	114±12 ^{c-f}	nd	15±0,3 ^a	5,2±0,39^g	192±3, ^{a-e}	0,34±0,38 ^a	2,8±0,2ⁱ	13,6±0,2 ^a	88,6±16^d	310±12 ^{a-d}	122±12 ^{d-g}
CECT11004	72±6 ^{a-c}	0,21±0,07 ^{a-d}	47±2,2 ^{d-h}	1,2±0,35 ^{a-d}	197±27 ^{a-e}	0,4±0,06 ^{a,b}	0,2±0,1 ^{a-d}	16±4,1 ^a	26,9±4 ^{a,b}	286±30 ^{a-d}	74±6 ^{a-d}
W46	84±21 ^{a-d}	nd	53±1,4 ^{f-j}	1,6±0,24 ^{b-e}	188±3 ^{a-e}	0,4±0,04 ^{a,b}	0,7±0,01 ^{d-h}	15±0,9 ^a	45±5 ^{a-d}	301±2 ^{a-d}	87±22 ^{a-e}
CR85	57±6 ^{a,b}	0,08±0,01 ^{a,b}	44±5 ^{c-h}	0,5±0,09 ^a	175±16 ^{a-d}	0,33±0,01 ^a	0,1±0,01 ^{a,b}	14±2,3 ^a	27±4 ^{a-c}	260±28 ^{a-d}	58±7 ^{a,b}
MR25	83,1±8 ^{a-d}	nd	17±1,9 ^{a,b}	1,6±0,15 ^{c-e}	194±26 ^{a-e}	0,54±0,08 ^{a-d}	0,5±0,06 ^{a-h}	15±2,5 ^a	74±13 ^{c,d}	299±42 ^{a-d}	86±8 ^{a-e}
IF6	115±8 ^{c-f}	0,49±0,29^d	89±12 ^k	1,9±0,3 ^{d-f}	198±31 ^{a-e}	0,4±0,03 ^{a,b}	0,95±0,33 ^{g,h}	16±0,4 ^a	48±2 ^{a-d}	352±44 ^{b-d}	118±9 ^{d-g}
AMH	61±11 ^{a,b}	nd	42±0,4 ^{c-g}	0,64±0,08 ^{a-c}	176±9,6 ^{a-d}	0,5±0,07 ^{a-d}	nd	18±6,2 ^a	30±2 ^{a-c}	266±18 ^{a-d}	62±12 ^{a-c}
W27	122±0,3 ^d	0,33±0,09 ^{b-d}	59±5,2 ^{g-j}	2±0,03 ^{d-f}	200±8,6 ^{a-e}	0,57±0,01 ^{a-d}	0,9±0,33 ^{f-h}	16±1,7 ^a	73±48 ^{b-d}	348±64 ^{b-d}	126±1 ^{e-g}
CECT11003	80,6±3 ^{a-d}	0,22±0,01 ^{a-d}	58±5,4 ^{g-j}	1,6±0,2 ^{c-e}	239±8,5 ^{b-e}	0,4±0,06 ^{a,b}	0,5±0,23 ^{a-h}	14±1,2 ^a	58±1 ^{a-d}	368±36 ^{c-d}	83±4 ^{a-e}
CECT1990	117±2 ^{c-f}	0,25±0,05 ^{a-d}	41±0,1 ^{c-g}	1,8±0,09 ^{d-f}	172±2 ^{a-d}	0,9±0 ^{d-e}	0,7±0,07 ^{c-h}	16±1,1 ^a	57±1 ^{a-d}	286±0,5 ^{a-d}	120±2 ^{d-g}
CECT1388	81±6,5 ^{a-d}	0,14±0,01 ^{a,b}	29±1,8 ^{a-c}	1,6±0,09 ^{b-e}	215±11 ^{a-e}	0,6±0,07 ^{a-d}	0,3±0,02 ^{a-e}	14±0,8 ^a	54±0,2 ^{a-d}	311±13 ^{a-d}	83±7 ^{a-e}
CECT11011	97±5 ^{a-e}	0,36±0,07 ^{b-d}	19,4±1 ^{a,b}	2±0,06 ^{d-f}	136±4,6 ^a	0,6±0,03 ^{a-d}	0,6±0,17 ^{b-h}	18±1,6 ^a	25±3 ^{a,b}	198±4,5 ^a	101±4 ^{a-f}
PB7	77±5 ^{a-d}	0,1±0,03 ^{a,b}	38±8,8 ^{c-f}	0,5±0,12 ^{a,b}	168,6±26 ^{a-d}	0,5±0,07 ^{a-c}	0,13±0 ^{a-c}	14,5±2 ^a	29±10 ^{a-c}	249±47 ^{a-c}	78±5 ^{a-e}
VIN7	145±30 ^{e-f}	0,2±0,03 ^{a-d}	31±2,3 ^{a-d}	2,1±0,2 ^{d-f}	155±5 ^a	0,4±0,05 ^{a,b}	0,66±0,21 ^{b-}	11±0 ^a	31±6 ^{a-c}	228±1 ^{a,b}	149±31 ^{f-g}
SPG126	87±10 ^{a-d}	0,17±0,1 ^{a-c}	63±8,9 ^{i,j}	1,6±0,2 ^{c-e}	244±8 ^{d-e}	0,4±0,1 ^{a,b}	0,42±0,12 ^{a-}	17±1,6 ^a	43±12 ^{a-d}	367±48 ^{b-d}	89±11 ^{a-e}
T73	56±26 ^a	nd	35±7 ^{b-e}	0,7±0,3 ^{a-c}	162±16 ^{a-c}	0,5±0,05 ^{a-d}	0,13±0 ^{a-c}	10±8,8 ^a	23±2 ^a	230±12 ^{a,b}	57±26 ^a
SPG172	105±6 ^{b-f}	0,23±0,1 ^{a-d}	51±4 ^{e-i}	2,8±0,4 ^f	206±12 ^{a-e}	1,2±0,08^e	0,4±0,06 ^{a-f}	14±1,5 ^a	27±7,6 ^{a-c}	298±25 ^{a-d}	109±5 ^{c-g}
HA1842	115±4,5 ^{c-}	0,18±0,04 ^{a-c}	52±3 ^{e-i}	2±0,09 ^{d-f}	213±20 ^{a-e}	0,75±0,03 ^{b-d}	0,4±0,07 ^{a-g}	17±1,7 ^a	27±4,6 ^{a-c}	309±30 ^{a-d}	119±5 ^{d-g}
SPG319	86±19 ^{a-d}	0,15±0,04 ^{a-c}	69±3ⁱ	2,1±0,4 ^{d-f}	268±3^e	0,4±0,02 ^{a,b}	0,57±0,21 ^{a-}	18±3 ^a	42±12 ^{a-d}	397±22^d	89±19 ^{a-e}
HA1841	148±14^f	0,23±0 ^{a-d}	48±3 ^{d-i}	2,4±0,2 ^{e-f}	162±8 ^{a-c}	0,8±0,15 ^{c-e}	0,9±0,03 ^{e-h}	18±1 ^a	42±6 ^{a-d}	265±6 ^{a-d}	153±15^g
SPG16-91	74±4 ^{a-d}	0,09±0,02 ^{a,b}	56±2 ^{g-j}	1,3±0,4 ^{a-e}	239±29 ^{c-e}	0,4±0,08 ^{a,b}	0,4±0,15 ^{a-g}	17±2,4 ^a	44±5 ^{a-d}	356±34 ^{b-d}	77±5 ^{a-e}
HA1837	95±7 ^{a-d}	0,12±0,01 ^{a,b}	45±2 ^{c-i}	1,8±0,3 ^{d-f}	195±16 ^{a-e}	0,7±0,05 ^{a-d}	0,5±0,12 ^{a-h}	13±2 ^a	35±8 ^{a-c}	287±28 ^{a-d}	98±8 ^{a-e}
HA1835	86±9 ^{a-d}	0,15±0,01 ^{a-c}	39±2 ^{c-f}	1,6±0,04 ^{c-e}	161±13 ^{a,b}	0,7±0,03 ^{a-d}	0,5±0,1 ^{a-h}	8±5,5 ^a	38±14 ^{a-c}	246±20 ^{a-c}	89±9 ^{a-e}
SPG14-91	103±6 ^{a-f}	0,44±0,16 ^{c,d}	62±5 ^{h-j}	2,9±0,7 ^f	242±35 ^{b-e}	0,5±0,02 ^{a-d}	1±0,24 ^h	9±0 ^a	48±13 ^{a-d}	361±53 ^{b-d}	108±7 ^{b-g}
SPG441	77±25 ^{a-d}	0,26±0,06 ^{a-}	46±1 ^{c-i}	1,2±0,4 ^{a-d}	157±0,9 ^a	0,3±0,15 ^a	0,4±0,04 ^{a-g}	19±1 ^a	28±2 ^{a-c}	250±1 ^{a-c}	80±26 ^{a-e}

Las letras en superíndice indican el grupo homogéneo significativo obtenido por análisis ANOVA de una vía (Prueba de Tukey, n=2, p-valor<0,05).nd=no detectado en el cromatograma de gases.

Tabla 2.4 Umbral de Percepción y Valor de la Actividad Aromática (OAV) de los compuestos aromáticos al final de la fermentación.

Umbral de percepción (mg L ⁻¹)	Etil acetato	Isobutil acetato	Isobutanol	Isoamil acetato	Alcohol Isoamílico	Etil hexanoato	2-Feniletill acetato	Alcohol bencílico	2-Fenil etanol
	7.5	1.6	40	0.03	30	0.05	0.25	200	12
	Valores de la Actividad Aromática (OAV)								
CECT11002	15.2	nd	0.38	174.3	6.4	6.8	11.2	0.068	7.4
CECT11004	9.6	0.13	1.17	40.9	6.6	8.2	0.96	0.079	2.2
W46	11.3	nd	1.33	52.0	6.3	8.2	2.8	0.074	3.8
CR85	7.7	0.05	1.10	15.9	5.8	6.5	0.4	0.070	2.2
M/R25	11.1	nd	0.42	52.6	6.5	10.7	2.2	0.073	6.2
IF6	15.3	0.30	2.24	61.6	6.6	8.4	3.8	0.080	4.0
AMH	8.1	nd	1.05	21.4	5.9	10.3	nd	0.089	2.5
W27	16.3	0.21	1.47	65.2	6.7	11.4	3.8	0.079	6.1
CECT11003	10.7	0.14	1.44	54.5	8.0	8.2	2.1	0.068	4.9
CECT1990	15.6	0.15	1.03	61.1	5.7	17.4	2.7	0.081	4.7
CECT1388	10.8	0.09	0.71	51.9	7.2	12.4	1.4	0.070	4.5
CECT11011	13.0	0.22	0.48	70.4	4.5	11.5	2.5	0.090	2.1
PB7	10.3	0.06	0.94	16.9	5.6	9.6	0.5	0.072	2.4
VIN7	19.4	0.12	0.77	70.1	5.2	7.6	2.6	0.056	2.6
SPG126	11.6	0.11	1.57	53.3	8.1	8.1	1.7	0.086	3.6
T73	7.4	nd	0.87	22.9	5.4	10.2	0.5	0.051	2.0
SPG172	14.0	0.15	1.28	93.0	6.9	23.5	1.5	0.069	2.3
HA1842	15.4	0.11	1.29	66.6	7.1	15.1	1.6	0.085	2.3
SPG319	11.5	0.09	1.73	71.0	8.9	8.6	2.3	0.090	3.5
HA1841	19.8	0.14	1.21	79.3	5.4	16.8	3.7	0.063	3.5
SPG16-91	9.9	0.05	1.42	44.6	8.0	7.7	1.7	0.084	3.7
HA1837	12.7	0.08	1.12	60.7	6.5	13.9	1.9	0.065	2.9
HA1835	11.4	0.09	0.98	53.0	5.4	13.4	2.0	0.039	3.1
SPG14-91	13.8	0.27	1.54	95.1	8.1	9.9	4.0	0.045	4.0
SPG441	10.3	0.16	1.16	40.9	5.2	6.5	1.6	0.095	2.3

Azul claro= OAV<1, Azul oscuro= OAV>1, Valores en negrita= Valor más alto, nd= no detectado por el cromatógrafo de gases.

2.2 Conclusiones

En este capítulo nos hemos centrado en caracterizar enológicamente los híbridos entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, analizando al final de la fermentación azúcares residuales, glicerol, etanol y los aromas producidos. En primer lugar, cabe destacar que los híbridos fueron los primeros en consumir el 50% de azúcares presentes en el mosto sintético comparando con las cepas control de *S. cerevisiae* (T73) como representante de una levadura vínica y CR85 de *S. kudriavzevii*, como representante de una especie mejor adaptada a crecer a bajas temperaturas. Entre los híbridos vínicos que tardaron más en acabar la fermentación se encuentran un híbrido aislado del norte de España (León) y que se caracteriza por ser tetraploide, PB7 y el híbrido AMH (de Alemania), que es de todos los híbridos el que tiene menor contenido de la especie *S. kudriavzevii*.

Respecto a la tasa de consumo de azúcares, hemos observado que la cepa más lenta fue la cepa aislada de cerveza, CECT1388 con una tasa máxima de consumo de azúcares promedio de $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Cabe destacar que las cepas *S. cerevisiae* T73 y *S. kudriavzevii* CR85 se encuentran entre las cepas con la menor tasa máxima de consumo de azúcares, junto a los híbridos AMH y PB7. Al igual que en el caso anterior, no se puede establecerse una relación entre la fuente de aislamiento y el comportamiento de este parámetro, ya que encontramos con tasas de consumo de azúcares bajas, tanto cepas cerveceras como vínicas, aunque cabe destacar que las dos cepas vínicas con bajas tasas de consumo presentan características especiales como hemos indicado anteriormente.

En lo que respecta a la fase de latencia (λ), nuestros resultados muestran una fase de latencia más corta para la mayoría de los híbridos naturales que para las cepas *S. cerevisiae* T73 y *S. kudriavzevii* CR85, indicando una mejor adaptación a fermentar a bajas temperaturas.

CAPÍTULO 3

3. Construcción y evolución de híbridos artificiales entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*

Durante los últimos años, se ha descrito la importancia de la hibridación interespecífica en las especies del género *Saccharomyces* como un mecanismo de adaptación a diferentes procesos industriales. Nuestro grupo de trabajo describió por primera vez la presencia de cepas vínicas que correspondían a híbridos entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (Lopandic et al., 2007; González et al., 2008, 2006; Belloch et al., 2009; Peris et al., 2012a, 2012b). La caracterización enológica de varias de estas cepas vínicas híbridas muestra que han adquirido de *S. cerevisiae* la tolerancia al etanol y la alta capacidad fermentativa (Belloch et al., 2008; Arroyo-López et al., 2010, 2009), y de *S. kudriavzevii* la adaptación a condiciones de crecimiento a bajas temperaturas (Arroyo-López et al., 2009; Salvadó et al., 2011).

Una aplicación, que se ha derivado del estudio de los híbridos naturales presentes en fermentaciones, ha sido la obtención de nuevas cepas híbridas artificiales (Pérez-Través et al., 2015, 2012) entre especies del género *Saccharomyces*, que nos permite responder a algunas de las exigencias actuales de las bodegas, sin necesidad de recurrir a organismos modificados genéticamente. Algunos ejemplos descritos en la bibliografía corresponden a híbridos intraespecíficos de *S. cerevisiae*, que mejoraron las propiedades enológicas de cepas comerciales de *S. cerevisiae*, mostrando una buena capacidad fermentativa y una elevada producción de manoproteínas (Pérez-Través et al., 2015). En el caso de los híbridos interespecíficos entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (Pérez-Través et al., 2012), la hibridación artificial nos ha permitido obtener levaduras con buena capacidad fermentativa, que incrementan la concentración de manoproteínas y de glicerol en vinos, además de reducir la concentración de etanol producida o incluso entre cepas de *S. cerevisiae* y *S. uvarum* para mejorar la tolerancia a fermentar a bajas temperaturas o incrementar la fracción aromática (Origone et al., 2018).

Capítulo 3

Pérez-Través et al., (2012), han estudiado diferentes aproximaciones para la obtención de híbridos artificiales, siendo la técnica de “rare-mating” o el cruce espóra-espóra las que mostraron los mejores resultados. En el caso de los híbridos obtenidos por ‘rare-mating’ entre células diploides de cada parental, la estabilización se alcanza con una dotación genómica próxima a la alodiploidía, con una copia del genoma de cada parental, mientras que los híbridos naturales estudiados son mayoritariamente alotriploides y algunos alotetraploides (Belloch et al., 2009; Peris et al., 2018, 2012a). Pérez-Través et al., (2014) estudiaron el proceso de estabilización de los híbridos artificiales, ya que, si la finalidad es su aplicación a nivel industrial, es necesario la comercialización de híbridos estables genéticamente que aseguren las propiedades fisiológicas e industriales deseadas. En dicho estudio, los autores propusieron un proceso de estabilización, pensando en su aplicación en enología, que consistía en diferentes pases usando mosto y en condiciones similares a las que se dan en una fermentación vínica en bodega.

Como se ha comentado anteriormente, la ventaja de los híbridos es su capacidad de crecer en condiciones de estrés más fluctuantes debido a la adquisición de las propiedades de ambos parentales (Belloch et al., 2008). Así, por ejemplo, en el caso de híbridos *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, los híbridos tienen la capacidad de crecer a bajas temperaturas (*S. kudriavzevii*) y la tolerancia a crecer en concentraciones altas de etanol, característica típica de *S. cerevisiae* ya que las cepas de *S. kudriavzevii* son muy poco tolerantes al etanol (Belloch et al., 2008). Por lo tanto, en el presente capítulo decidimos estudiar con más detalle diferentes procesos de estabilización de los híbridos en diferentes condiciones. De este modo, estudiamos la estabilización en presencia de etanol, y la estabilización creciendo a bajas temperaturas con la finalidad de poder analizar si estas condiciones favorecían la dominancia de una u otra parte del genoma.

En experimentos anteriores, tal y como hemos comentado anteriormente, se utilizaron mutantes auxótrofos espontáneos para la selección de híbridos porque se pretendía desarrollar cepas que no fuesen GMOs. Sin embargo, en experiencias de evolución experimental la presencia de alelos

mulos puede suponer una restricción a la pérdida del alelo silvestre que lo complementa, por lo que en el presente trabajo los nuevos híbridos se seleccionaron utilizando marcadores de resistencia a antibióticos localizados en plásmidos. Una vez obtenidos los híbridos por selección frente a antibióticos, se forzó la pérdida de los plásmidos por crecimiento en ausencia de los agentes selectivos, de este modo los híbridos resultantes no contendrán DNA exógeno, lo que evita que se consideren GMOs, y a la vez resulten útiles para las experiencias de evolución durante la estabilización genética ya que, de este modo, se obtienen híbridos de partida con ambos genomas de los parentales sin mutaciones marcadoras. Los híbridos así obtenidos, se estabilizaron en condiciones de estrés por presencia de etanol en el medio (GPY adicionado con 10% de etanol) y de estrés por baja temperatura (creciendo a 12°C). Como control, también se estabilizó en condiciones sin ningún tipo de estrés (crecimiento en GPY a 25°C). La comprobación de los híbridos y la estabilización se realizaron mediante diferentes marcadores moleculares y por citometría de flujo y, una vez estables, se realizó una caracterización fisiológica. y enológica. A continuación, se muestran los resultados.

3.1. Resultados

3.1.1 Selección de los marcadores de hibridación de las cepas parentales

Los criterios utilizados para la selección de marcadores son la obtención de una alta eficiencia en la transformación y la fiabilidad de seleccionar transformantes verdaderos. En el presente trabajo, los parentales se transformaron con plásmidos portadores de genes de resistencia a distintos antibióticos (G418 e higromicina B, respectivamente), los híbridos se seleccionaron por doble resistencia a estos antibióticos (ver secciones 4 y 5 de Material y Métodos). Usando dichos marcadores de selección, se obtuvieron clones resistentes a higromicina para la cepa T73 de la especie *S. cerevisiae* y resistentes a G418 para la cepa CR85 de *S. kudriavzevii*. Estos transformantes fueron usados en la construcción del híbrido S_{T73}XSk_{CR85}.

Capítulo 3

3.1.2. Construcción y caracterización del híbrido

Las cepas T73 y CR85, cada una con un plásmido de resistencia a un antibiótico distinto, se crecieron una noche a 25°C en 25mL de GPY con el antibiótico correspondiente. Las células se recogieron y se lavaron y resuspendieron en agua destilada, siguiendo la metodología descrita por Pérez-Través et al., (2012). Los dos precultivos se mezclaron en medio GPY sin antibióticos y 500µl de la mezcla se inocularon en 5mL de GPY y se crecieron a 25°C. Al cabo de 3, 5, 7 y 10 días se pasó una alícuota a placas con GPY sólido adicionado con los dos antibióticos. Tras 4-7 días se sembraron las colonias de nuevo en GPY sólido con ambos antibióticos. En total se obtuvieron 64 colonias híbridas putativas. De estas 64 colonias, 10 fueron aisladas al azar y se confirmó la naturaleza híbrida mediante amplificación por PCR de los genes *BRE5* y *PPR1* y posterior digestión con enzimas de restricción mediante la metodología descrita por González et al., (2006). En la Figura 3.1 se muestran los resultados obtenidos para los parentales T73 y CR8, y en la Figura 3.2 se muestra uno de los híbridos a modo de ejemplo.

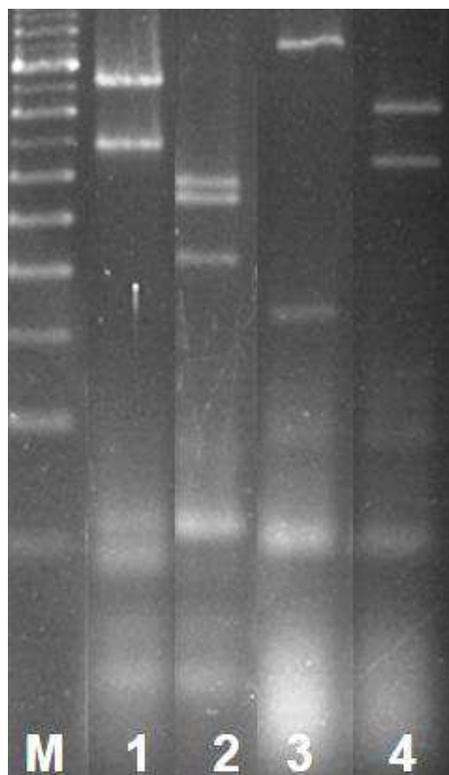


Figura 3.1. Patrón de restricción obtenido para los parentales *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* con el enzima *HaeIII* para el gen *BRE5* y *PPR1*. M=Marcador molecular, 1=BRE5/CR85, 2=BRE5/T73, 3=PPR1/CR85, 4=PPR1/T73 .

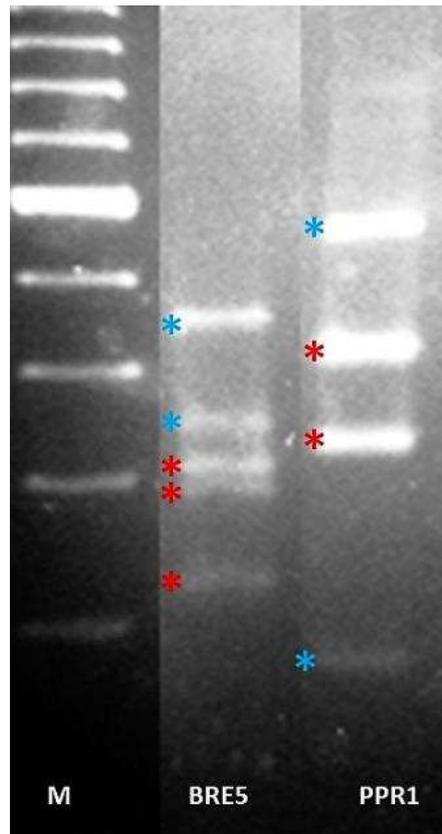


Figura 3.2. Patrón de restricción obtenido para el híbrido a modo de ejemplo con el enzima *HaeIII* para el gen *BRE5* y *PPR1*. M= Marcador molecular, asterisco rojo= *S. cerevisiae*, asterisco azul= *S. kudriavzevii*.

Tal y como se puede observar al comparar los resultados de estas dos figuras, se confirma la naturaleza híbrida para aquellas colonias que presentan los patrones de restricción de ambos parentales. Se confirmó mediante esta aproximación que las 10 colonias resultaron ser híbridos S_{CT73}XSk_{CR85}.

De estos 10 híbridos se seleccionó una colonia al azar para iniciar la estabilización.

3.1.3. Caracterización genómica de los híbridos estabilizados bajo diferentes condiciones de estrés

Para el proceso de estabilización se partió del glicerinado original para evitar pérdidas o variaciones del genoma antes de iniciar el proceso de estabilización. Los experimentos de estabilización genética se realizaron bajo

Capítulo 3

tres distintas condiciones de estrés, partiendo de una única colonia para las tres condiciones de estabilización. Los estreses realizados fueron crecimiento en presencia de 10% de etanol, y crecimiento a 12°C, mientras que el híbrido creciendo en GPY a 25°C se utilizó como control. En el apartado 7 de Material y Métodos se muestra un esquema del proceso de estabilización. Una colonia híbrida de partida se creció por triplicado en GPY en las tres condiciones de estrés (total 9 líneas híbridas) durante 7-10 días, al cabo de los cuales se sembró una alícuota en placa en la correspondiente condición de estrés. Las tres colonias mayores, indicativo de crecimiento más rápido en las condiciones de estrés, se seleccionaron para inocular el siguiente cultivo líquido, para repetir el proceso durante un total de 16 rondas. En paralelo, se sometieron las cepas parentales al mismo proceso de evolución experimental (9 líneas puras de cada parental). Al final de cada cultivo líquido se tomaron muestras, se recogieron las células y se congelaron. En cada evolución se han tomado muestras para comprobar la estabilización genómica. En la Tabla 3.1 se muestran (a modo de ejemplo) los datos de ploidía para los pases 4 y 16 de una de las líneas de evolución, así como la ploidía de los parentales y del híbrido inicial antes de someterlo al proceso evolutivo.

Resulta interesante destacar de los datos que se muestran en esta tabla, que los híbridos tras la estabilización (pase 16), tienen prácticamente la misma ploidía que el híbrido original (próximo a 3n) y mayor que los parentales.

Tabla 3.1. Resultados de ploidía de el híbrido artificial sin evolucionar (híbrido inicial), híbridos de los pases 4 y 16 en las tres condiciones de evolución (e=10% de etanol en el medio, h=GPY a 25°C y f=GPY a 12°C), además de las cepas parentales (*S. cerevisiae* T73 y *S. kudriavzevii* CR85).

Cepa	Ploidía	Cepa	Ploidía	Cepa	Ploidía
<i>S. cerevisiae</i> T73	2,2261	<i>S. kudriavzevii</i> CR85	2,1602	Híbrido inicial	3,2251
4CK2h	3,19000	4CK3f	3,2317	4CK1e	3,2547
16CK3h	3,2322	16CK3f	3,2018	16CK3e	3,2946

Para estudiar la estabilización también se ha realizado una caracterización molecular analizando los patrones de elementos delta (Legras y Karst 2003), de restricción del mtDNA (Querol et al., 1992) y de restricción de

regiones del genoma nuclear (González et al., 2008) del cultivo. En primer lugar, comprobamos la naturaleza híbrida usando genes marcadores de todos los cromosomas, un total de 35 genes, siguiendo la metodología descrita por González et al., (2008). De los 9 híbridos obtenidos en el pase 9 (3 por cada línea y por cada estrés) todos dieron el mismo patrón y se muestra en la Tabla 3.2. Al final de la estabilización, en el pase 16 se realizó la misma caracterización y se obtuvo el mismo patrón para todos los híbridos que el obtenido para los híbridos del pase 9 y que se incluye en la Tabla 3.2, confirmándose la naturaleza híbrida. En la mayoría de los casos se observó una copia de cada parental, con algunas excepciones. En el cromosoma I se observa, con el gen *CYC3* los dos parentales (CK); sin embargo, con el gen *BUD14* solo se identificó el patrón de *S. cerevisiae* (C), indicando que ha habido una recombinación de manera que una parte del cromosoma tiene la secuencia de *S. cerevisiae* y otra parte de *S. kudriavzevii*. Otro dato interesante corresponde a los cromosomas V y XIII donde se obtuvieron bandas no observadas en los parentales, indicando cambios en su genoma a lo largo de la evolución.

Capítulo 3

Tabla 3.2. RFLPs de los híbridos evolucionados bajo las tres condiciones de estrés correspondientes a la etapa 9 del proceso de evolución.

Cromosoma	Gen	Enzima de Restricción	Patrón (a)	Observaciones
I	CYC3	<i>Hinfl</i>	CK	Un cromosoma solo C, otro CK
	BUD14	<i>TaqI</i>	C	
II	OPYI	<i>ScrI</i>	C	
		<i>TaqI</i>	K	
	APM3	<i>MspI</i>	CK	
		<i>Hinfl</i>	CK	
	PKC1	<i>Hinfl</i>	K	
		<i>Asp700</i>	C	
III	KIN82	<i>Hinfl</i>	CK	
	MRC1	<i>MspI</i>	CK	
IV	EUG1	<i>HaeIII</i>	CK	
	RPN4	<i>CfoI</i>	CK	
		<i>MspI</i>	CK	
	UGA3	<i>Hinfl</i>	CK	
V	MET6	<i>Hinfl</i>	CK	Se observa una banda de 120 pb que no aparece en el patrón de los parentales y no corresponde a una digestión parcial, indicando un nuevo patrón
	NPR2	<i>MspI</i>	CK	
VI	EPL1	<i>HaeIII</i>	CK	
	GSY1	<i>MspI</i>	CK	
VII	KEL2	<i>MspI</i>	CK	
	MNT2	<i>ScrI</i>	CK	
VIII	CBP2	<i>Hinfl</i>	CK	
	MNL1	<i>Hinfl</i>	CK	
IX	DAL1	<i>HaeIII</i>	CK	
	UBP7	<i>Hinfl</i>	CK	
X	DAL5	<i>HaeIII</i>	CK	
	CYR1	<i>MspI</i>	CK	
	PEX2	<i>HaeIII</i>	C	
XI	BAS1	<i>HaeIII</i>	CK	
	CBT1	<i>EcoRI</i>	CK	
XII	MAG2	<i>MspI</i>	CK	
	PPR1	<i>HaeIII</i>	CK	
XIII	CAT8	<i>MspI</i>	CK	Se observan dos bandas que no aparecen en el patrón de los parentales, una de 120 pb y otra de 150 pb, indicando un nuevo patrón no esperado.

	<i>ORC1</i>	<i>HaeIII</i>	CK	
	<i>BRE5</i>	<i>HaeIII</i>	CK	
XIV	<i>EGT2</i>	<i>HaeIII</i>	K	Fue necesario digerir con los dos enzimas para comprobar la naturaleza híbrida de la cepa
		<i>RsaI</i>	C	
XV	<i>ATF1</i>	<i>HaeIII</i>	CK	
	<i>RRI2</i>	<i>HinfI</i>	CK	
XVI	<i>GAL4</i>	<i>ScrFI</i>	CK	
	<i>JIP5</i>	<i>MspI</i>	CK	

(a) C, indica que tiene el patrón de restricción en ese gen similar al del *S. cerevisiae*; K, al de *S. kudriavzevii* y CK ambos patrones.

Por otro lado, comprobamos para las mismas cepas el patrón de restricción del mtDNA con el enzima de restricción *HinfI* (Figura 3.3) y con elementos delta (Figura 3.4).

Las levaduras vínicas pertenecientes al género *Saccharomyces* han sido caracterizadas de forma satisfactoria mediante el análisis de polimorfismo del ADN mitocondrial (mtDNA) (Querol et al., 1994, 1992; Martínez et al., 1995; Guillamón et al., 1996; Ibeas et al., 1997; Fernandez-Espinar et al., 2001), siendo el análisis de restricción con el enzima *HinfI* el que mostró un mayor polimorfismo entre las cepas del género *Saccharomyces* (Guillamon et al., 1994). Por ello, se realizó un análisis de restricción de mtDNA con el enzima *HinfI* a los híbridos generados en el presente trabajo.

En la Figura 3.3a se puede observar un patrón para el parental *S. cerevisiae* T73 a la izquierda de la figura (carril 1) y otro para el híbrido SCT73xSkCR85 (carril 2), y parental *S. kudriavzevii* CR85 se muestra en 3.3b (carril 3), así como de una representación de híbridos. Todos los híbridos analizados comparten el mismo patrón de restricción que el que se muestra en el carril marcado como 2 de la Figura 3.3, idéntico al parental *S. cerevisiae*.

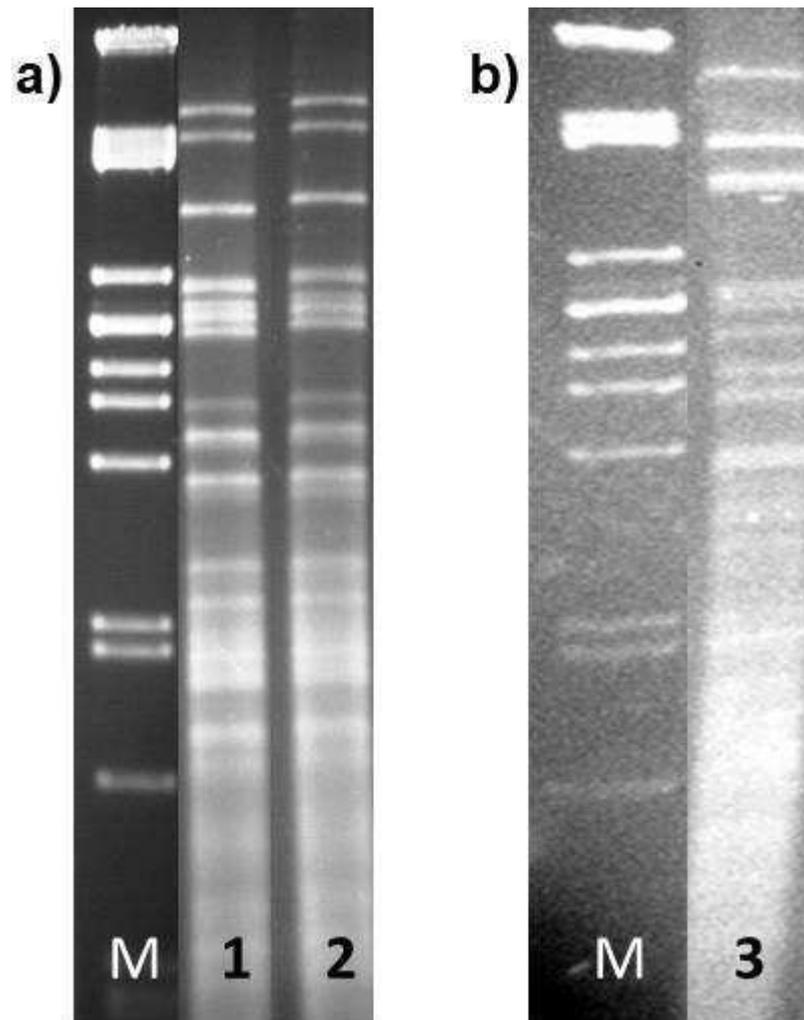


Figura 3.3 Análisis de restricción del ADN mitocondrial con el enzima de restricción *Hinfl*. Las líneas señaladas con M corresponden al marcador molecular, 1= T73, 2= Híbrido, 3=CR85.

También se caracterizaron los híbridos durante el proceso de estabilización mediante análisis de elementos delta. La finalidad de este estudio era ver si a lo largo de la evolución se observaban patrones distintos que nos indicaran que los híbridos no estaban evolucionados. En la Figura 3.4 se muestran los resultados, a modo de ejemplo de híbridos de los pases 4 y 5. Tal y como se observa en las bandas de mayor intensidad, todos los híbridos tienen el mismo patrón, indicando que hay un patrón mayoritario a lo largo de la evolución. Se observan pequeñas diferencias en bandas de poca intensidad que pueden ser patrones muy minoritarios o bandas inespecíficas frecuentes en la técnica utilizada.

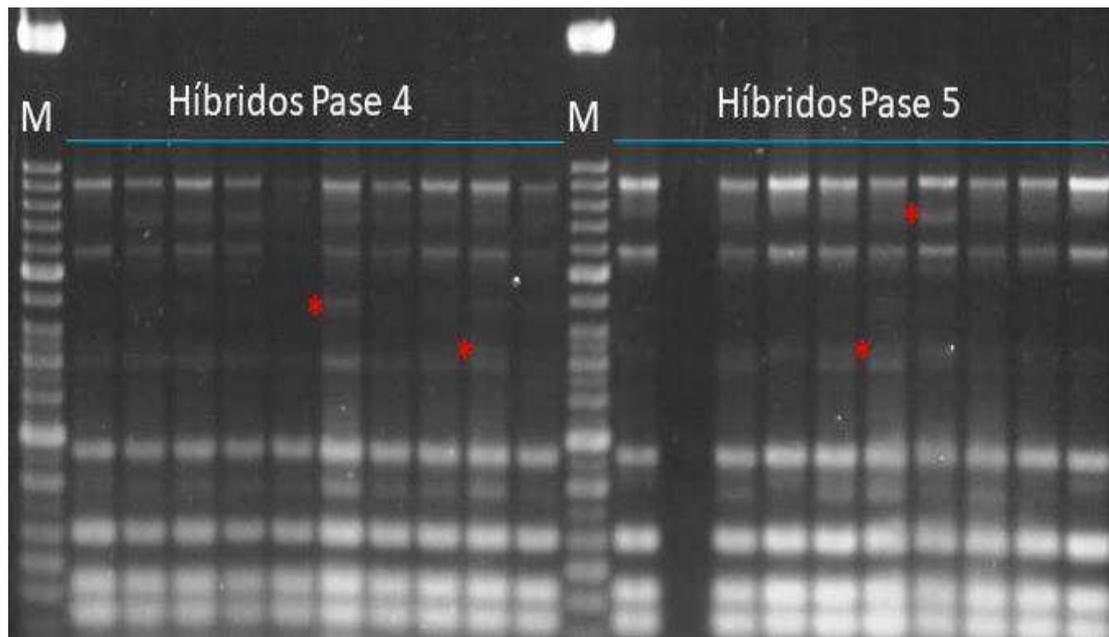


Figura 3.4. Patrón de restricción de elementos delta de diez híbridos de los pases 3 y 4 evolucionados bajo estrés por etanol y los parentales. En asterisco se indican algunas bandas diferentes.

3.1.4. Caracterización fisiológica de los híbridos estabilizados bajo diferentes condiciones de estrés

Una vez se estabilizaron los híbridos, estudiamos si la estabilización a bajas temperaturas o altas concentraciones de etanol mejora la eficacia de los híbridos crecidos en diferentes condiciones. Para lo cual se han determinado las curvas de crecimiento de las tres líneas en los pases 4, 9 y 16 mediante el sistema SPECTROstar Omega (ver la sección 10 de Material y Métodos). Para cada línea evolucionada en una condición, se ha comprobado su eficiencia en las tres condiciones de crecimiento estudiadas, GPY a 25°C, GPY a 12°C y GPY adicionado con 10% de etanol; además se ha incluido una condición adicional, mosto sintético a 25°C. Con los datos obtenidos se ha calculado, al igual que se hizo en el capítulo 1 y 2, la tasa de crecimiento (μ), la fase de latencia λ y el parámetro A (crecimiento máximo asintótico). En los siguientes subapartados se describen los resultados obtenidos de la caracterización fisiológica realizada.

Capítulo 3

3.1.5 Caracterización del crecimiento a 12°C de los híbridos

En la Tabla 3.3 se presentan los datos obtenidos para cada uno de los parámetros estimados mediante el ajuste de nuestros datos al modelo de Gompertz reparametrizado para los híbridos creciendo en GPY líquido a 12°C. Cada condición de evolución tenía tres líneas (línea 1, 2 y 3) y cada línea se analizó por triplicado. En la tabla 3.3 se muestra el promedio y el error estándar de los parámetros obtenidos después del ajuste de los datos de caracterización fisiológica realizada en GPY a 12°C de los híbridos correspondientes a las etapas 4, 9 y 16 del proceso de evolución.

Tabla 3.3 Parámetros de crecimiento de los híbridos de la etapa 4, 9 y 16 caracterizados en GPY a 12°C.

Parámetro	Condición de Evolución	Condición de crecimiento para caracterización fisiológica: GPY a 12°C											
		Pase 4			Pase 9			Pase 16					
		Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3			
A	25°C	2,3±0,1 ^{e-9}	2,4±0,09 ⁹	2,4±0,13 ⁹	1,8±0,05 ^b	1,9±0,08 ^b	1,7±0,06 ^b	1,5±0,03 ^a	1,6±0,07 ^a	1,5±0,04 ^a			
	12°C	2,3±0,05 ^{e-9}	2,1±0,08 ^c	2,1±0,23 ^c	2,1±0,07 ^{c-d}	2,2±0,07 ^{c-e}	1,9±0,02 ^b	2,8±0,1 ^h	2,8±0,04 ^h	2,7±0,12 ^h			
	Etanol	2,3±0,1 ^{f-9}	2,3±0,12 ^{f-9}	2,4±0,11 ^{f-9}	2,3±0,06 ^{e-9}	2,2±0,1 ^{c-f}	2,2±0,1 ^{c-f}	1,5±0,05 ^a	1,5±0,05 ^a	1,5±0,04 ^a			
	25°C	0,1±0,01 ^{m-p}	0,11±0,01 ^p	0,10±0,02 ^{o-p}	0,06±0 ^{c-h}	0,07±0 ^{f-j}	0,06±0 ^{c-9}	0,05±0 ^{b-e}	0,05±0 ^{b-f}	0,05±0 ^{g-k}			
	12°C	0,08±0,00 ⁿ	0,09±0,01 ^{m-o}	0,08±0,02 ^{i-m}	0,07±0 ^{e-i}	0,07±0,01 ^{d-h}	0,06±0 ^{c-h}	0,08±0,01 ^{h-l}	0,08±0 ^{i-m}	0,07±0,01 ^{g-k}			
	Etanol	0,09±0,01 ^{m-o}	-0,09±0,01 ^{m-o}	0,09±0 ⁿ	0,09±0,01 ^{l-o}	0,08±0,01 ^{i-m}	0,07±0,01 ^{g-j}	0,05±0,01 ^{ab}	0,04±0 ^a	0,05±0 ^{a-c}			
λ	25°C	3,7±1,4 ^{a-b}	4,2±2,2 ^{a-c}	6,2±3,8 ^{b-c}	4,4±1,1 ^{a-c}	4,3±0,6 ^{a-c}	5,0±0,4 ^{a-c}	14±1,9 ^d	12,8±1,2 ^d	14,4±1,5 ^d			
	12°C	2,8±0,87 ^a	6,2±2,1 ^{b-c}	4,4±1,4 ^{a-c}	2,3±0,5 ^a	2,6±0,8 ^a	4,3±0,6 ^{a-c}	4,98±1,0 ^{a-c}	4,8±0,2 ^{a-c}	5±0,5 ^{a-c}			
	Etanol	7,1±2,4 ^c	5,4±1,7 ^{a-c}	4,2±0,4 ^{a-c}	6,8±3,1 ^{b-c}	7,1±3,8 ^c	2,8±1,5 ^a	15,24±3,4 ^d	14,5±1,4 ^d	14,0±1,2 ^d			
	25°C en GPY), 12°C=Estrés por baja temperatura (12°C en GPY), Etanol= Estrés por etanol (GPY + 10% de etanol a 25°C).												

25°C=Sin estrés (25°C en GPY), 12°C=Estrés por baja temperatura (12°C en GPY), Etanol= Estrés por etanol (GPY + 10% de etanol a 25°C).
A= Crecimiento máximo asintótico, μ= Tasa máxima de crecimiento (h⁻¹), λ= Fase de latencia o adaptación (h). Las letras en superíndice indican los grupos homogéneos significativos obtenidos por análisis ANOVA factorial (prueba de Tukey, n = 2, valor de p <0,05).

Capítulo 3

a. Crecimiento máximo asintótico de los híbridos caracterizados a 12°C

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial de la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre el crecimiento máximo asintótico (A). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

En la Figura 3.5 se muestran las gráficas correspondientes al efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa del proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución de los híbridos, el cual muestra una relación $F(4, 216)=687.21$, $p<0,001$, lo cual indica que hay diferencias significativas entre las condiciones de evolución y las etapas (Pases) de la evolución.

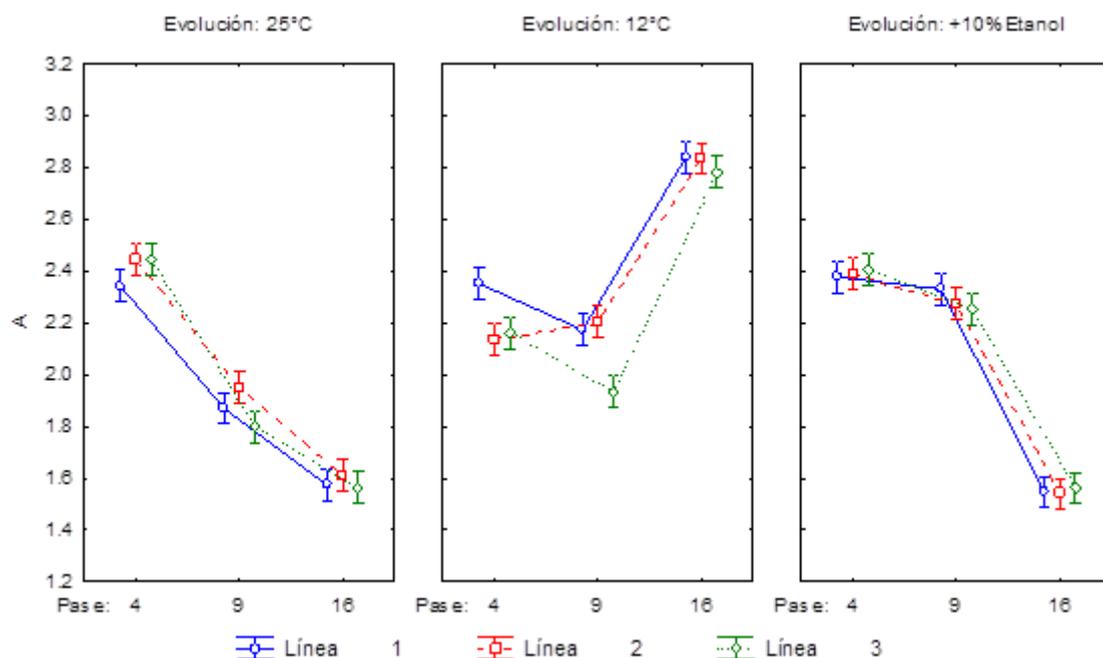


Figura 3.5. Efecto de interacción Condición de evolución*Pase*Línea sobre el máximo crecimiento asintótico (Parámetro A) en GPY a 12°C.

El efecto principal para la condición de evolución produjo una razón $F(2,216)=453,06$, $p<0,001$, indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=2,07$, $DE=0,38$), GPY a 12°C ($M=2,37$, $DE=0,34$) y GPY a 25°C ($M=1,95$, $DE=0,35$). En la Figura 3.6 puede observarse que los híbridos que fueron evolucionados bajo la condición de estrés por frío presentaron el mayor valor del parámetro A (máximo crecimiento asintótico), mientras que aquellos híbridos que fueron evolucionados en GPY a 25°C , es decir, sin ninguna condición de estrés presentaron el mínimo valor para este parámetro cuando crecían a baja temperatura. Los híbridos evolucionados bajo el estrés por etanol presentaron un valor del parámetro A superior a los híbridos evolucionados sin estrés, pero inferior a aquellos evolucionados bajo condición de estrés por frío.

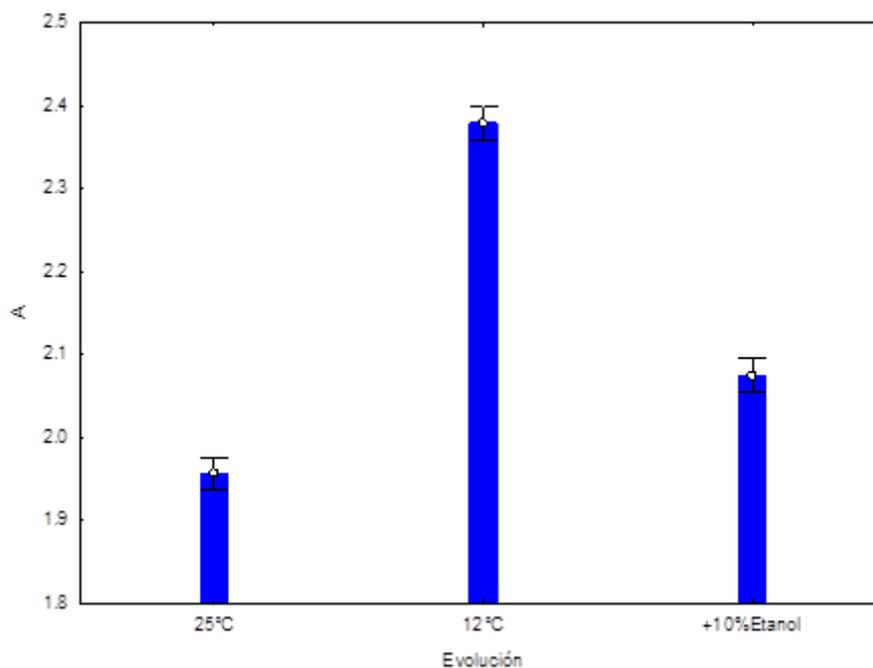


Figura 3.6. Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (Parámetro A) en GPY a 12°C .

El efecto para el pase o la fase del proceso de evolución produjo una $F(2, 216) = 318,14$, $p<0.001$, indicando una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M=2,33$, $DE=0,15$), el noveno pase ($M=2,08$, $DE=0,19$) y el pase 16 ($M=1,98$, $DE=0,59$). Es decir, que de acuerdo con este análisis estadístico el parámetro A disminuye conforme avanza el proceso evolutivo. Este efecto puede observarse en la Figura 3.7. Sin embargo, el ANOVA factorial también

Capítulo 3

indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos. El análisis indica que existe una relación estadísticamente significativa entre la etapa de evolución (Pase) y la condición de evolución, $F(4, 216)=687,21$, $p<0,001$. En la Figura 3.5 y la Figura 3.8 se puede observar que, aunque existe una tendencia a disminuir el valor del parámetro A cuando avanza la fase de estabilización (Pase), el efecto de interacción muestra que esto no ocurre en los híbridos evolucionados bajo la condición de estrés por frío. Se puede observar como a medida que avanza el proceso evolutivo, aumenta el crecimiento máximo asintótico para los híbridos evolucionados a bajas temperaturas y disminuye para los híbridos evolucionados en condiciones de estrés por etanol y para aquellos que fueron evolucionados sin ningún tipo de estrés.

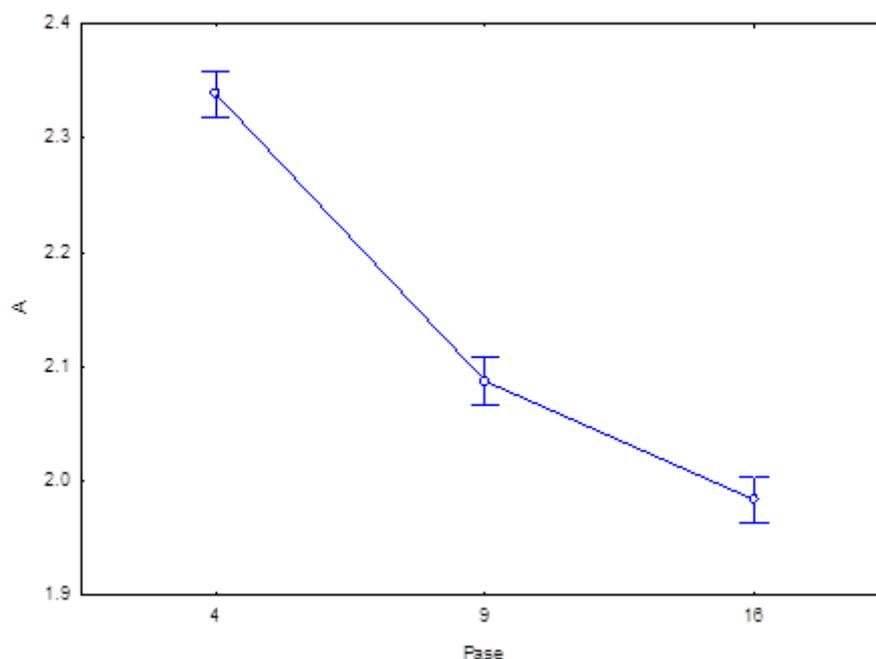


Figura 3.7. Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A).

El efecto de la línea de evolución, $F(2, 232)=7,22$, $p=0,001$, indica que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=2,15$, $DE=0,4$), la línea 2 ($M=2,15$, $DE=0,39$) y la línea 3 ($M=2,1$, $DE=0,4$).

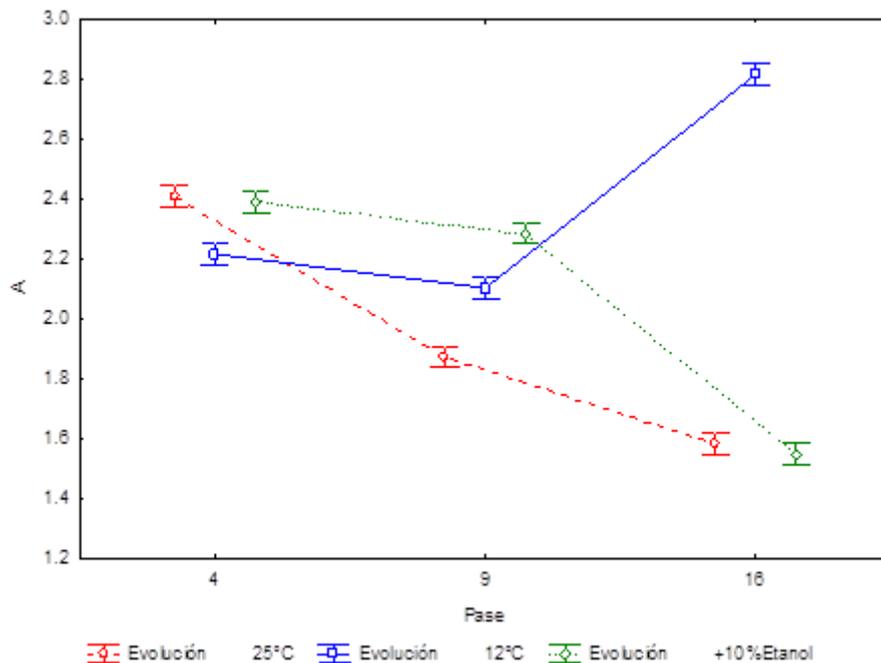


Figura 3.8. Efecto de interacción entre el máximo crecimiento asintótico (Parámetro A) y la etapa de evolución (Pase).

Además, se realizó un análisis post-hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.3).

b. Parámetro μ en híbridos caracterizados a 12°C

En el siguiente apartado se midió la tasa de crecimiento (μ) de los híbridos estabilizados. Se realizó el mismo tratamiento estadístico que en el apartado anterior, un análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

El efecto principal para la condición de evolución sobre μ produjo una razón $F(2,216)=4,38$, $p<0,05$ indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=0,077$, $DE=0,021$), GPY a

Capítulo 3

12°C ($M=0,080$, $DE=0,021$) y GPY a 25°C ($M=0,078$, $DE=0,023$). En la Figura 3.9 se observa que, de acuerdo con estos resultados estadísticos, los híbridos que fueron evolucionados bajo condición de estrés por baja temperatura presentaron una mayor tasa de crecimiento que aquellos híbridos evolucionados en condiciones de estrés por etanol y sin ningún tipo de estrés.

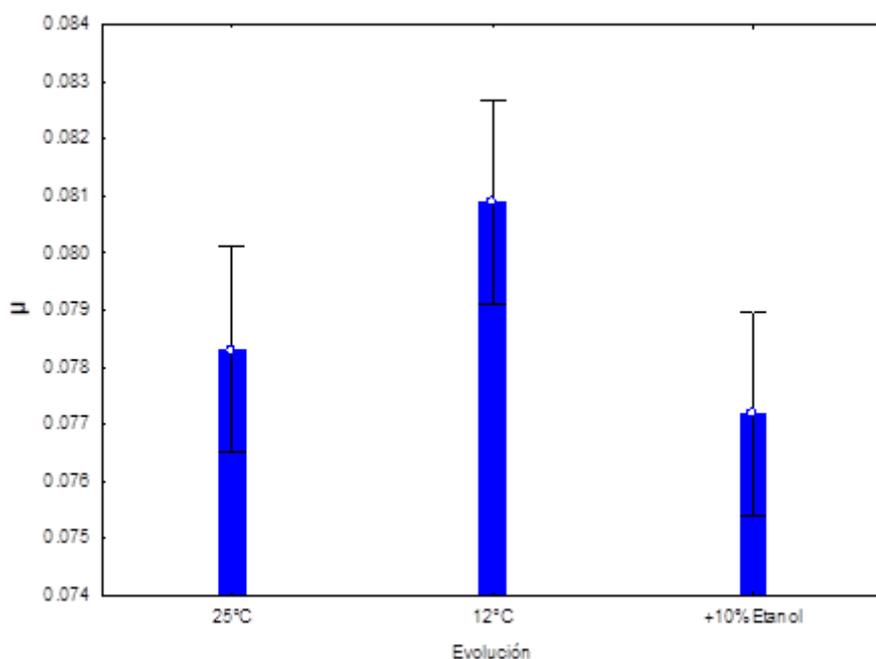


Figura 3.9. Efecto principal de la condición de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY a 12°C.

El efecto principal para el pase o la fase del proceso de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento produjo una $F(216,2)=380,33$, $p<0,001$, indicando una diferencia significativa entre la μ de los híbridos del cuarto pase ($M=0,098$, $DE=0,013$), el noveno pase ($M=0,074$, $DE=0,01$) y el pase 16 ($M=0,063$, $DE=0,014$). En la Figura 3.10, se observa que al igual que para el parámetro A, a medida que el proceso evolutivo avanza se observa una disminución en la máxima tasa de crecimiento.

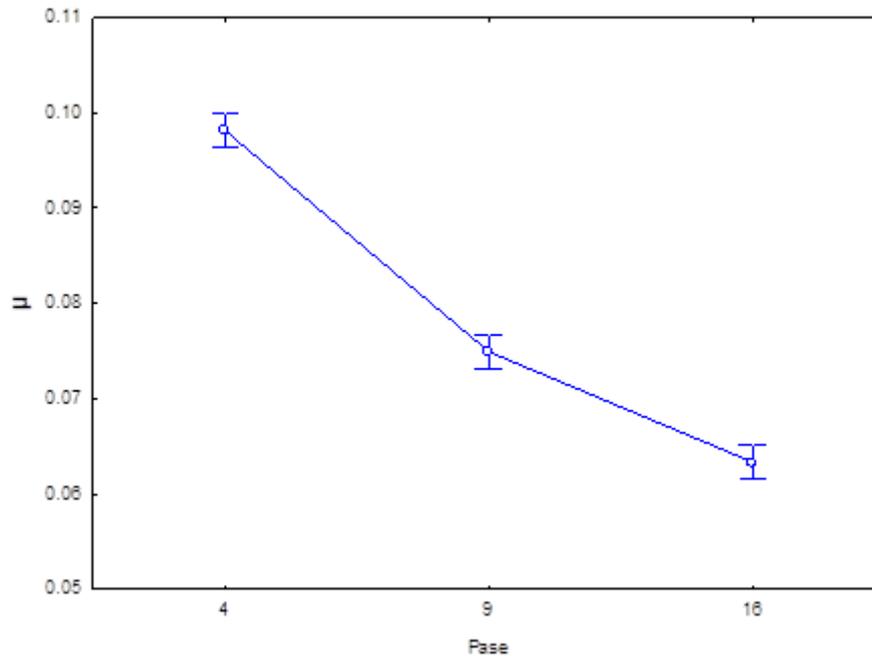


Figura 3.10. Efecto de la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) a en GPY a 12°C.

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=5,29$, $p>0,001$, indicando que no existe diferencia significativa entre las líneas de evolución de los híbridos, línea 1 ($M=0,079$, $DE=0,018$), línea 2 ($M=0,080$, $DE=0,021$) y línea 3 ($M=0,076$, $DE=0,019$) respecto a la tasa máxima de crecimiento.

El ANOVA factorial también indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos, $F(4, 216)=83,807$, $p<0,001$. En la Figura 3.11 se puede observar como a medida que avanza el proceso evolutivo, claramente disminuye la máxima tasa de crecimiento para los híbridos evolucionados en condiciones de estrés por etanol y aquellos que fueron evolucionados sin ningún tipo de estrés, mientras que para los híbridos evolucionados a 12°C existe una disminución entre el pase 4 y el nueve, seguida de un aumento entre el pase 9 y el pase 16.

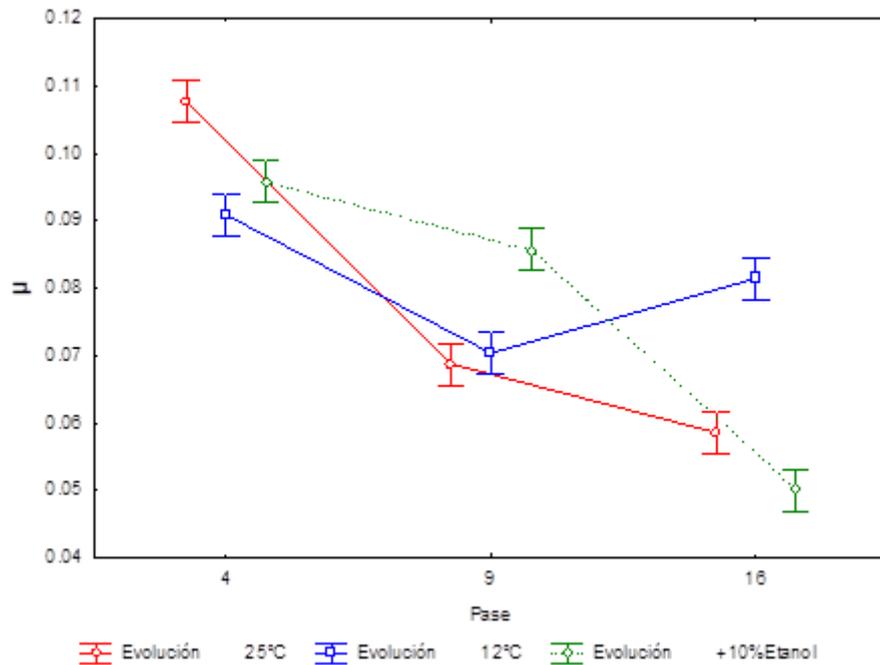


Figura 3.11. Efecto de interacción entre la tasa máxima de crecimiento (μ) y la etapa de evolución (Pase) en GPY a 12°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.3).

El ANOVA factorial de los datos obtenidos al crecer los híbridos bajo condición de estrés por etanol muestran un efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa del proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución de los híbridos, con una relación $F(4, 216)=687.21$, $p<0,001$, lo cual indica que hay diferencias significativas entre las condiciones de evolución y las etapas (Pases) de la evolución. La Figura 3.12 muestra el efecto de interacción de las tres variables analizadas sobre la tasa máxima de crecimiento en GPY a 12°C. Básicamente la Figura 3.12 resume lo que ha explicado líneas atrás. Es decir la disminución de la μ para los híbridos en GPY a 25°C y los híbridos evolucionados en GPY adicionado con 10% de etanol, mientras que para los híbridos evolucionados a 12°C no ocurre esta disminución.

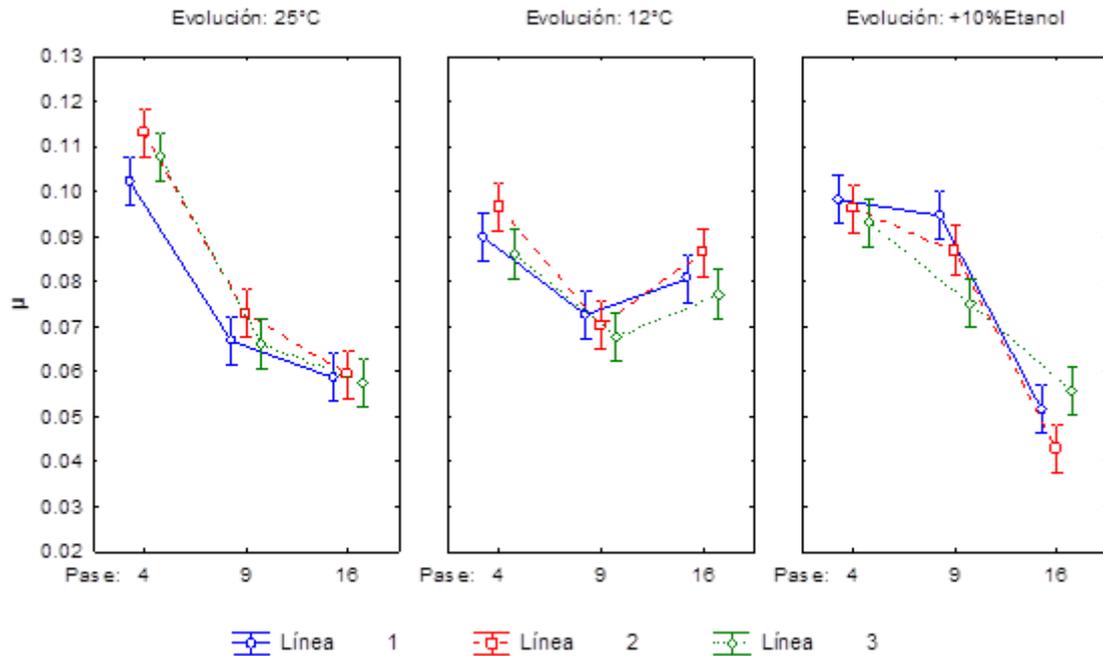


Figura 3.12. Tasa de crecimiento (μ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 12°C.

c. Parámetro λ en híbridos caracterizados a 12°C

Se realizó el mismo análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de las tres variables independientes: condición de evolución, pase o fase en el proceso de evolución y línea de evolución, sobre la fase de latencia o fase de adaptación de los híbridos (λ). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Líneas 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue mayor, $p=0,001$.

Capítulo 3

En la Figura 3.13 se puede observar el efecto principal para la condición de evolución, la cual produjo una razón $F(2,216)=126,64$ $p<0.001$, indicando una diferencia significativa entre la fase de latencia de los híbridos evolucionados en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=8,59$, $DE=5,03$), GPY a 12°C ($M=4,19$, $DE=1,60$) y GPY a 25°C ($M=7,71$, $DE=4,71$). Es decir, la fase de latencia o de adaptación fue significativamente menor para las cepas evolucionadas a baja temperatura que para las cepas evolucionadas bajo condición de estrés por etanol y sin ningún tipo de estrés.

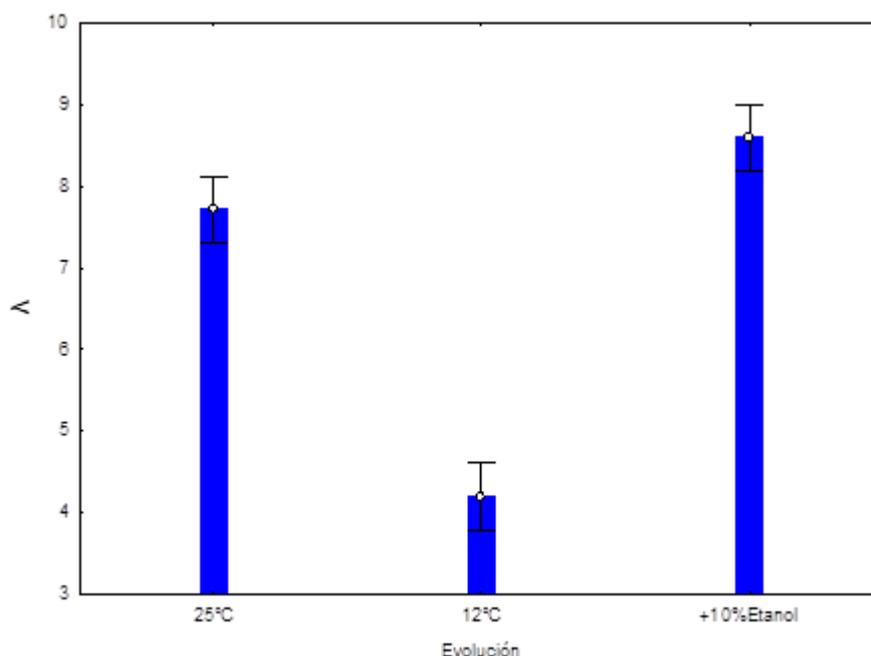


Figura 3.13. Efecto principal de la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en GPY a 12°C .

El efecto para el pase o la fase del proceso de evolución produjo una $F(2,216)=320,4$, $p=001$, indicando una diferencia significativa entre los híbridos del cuarto pase ($M=4,95$, $DE=2,37$), el noveno pase ($M=4,45$, $DE=2,36$) y el pase 16 ($M=11,1$, $DE=4,1$). En la Figura 3.14 puede observarse como a medida que avanza el proceso de evolución, los híbridos aumentan el tiempo de latencia o adaptación.

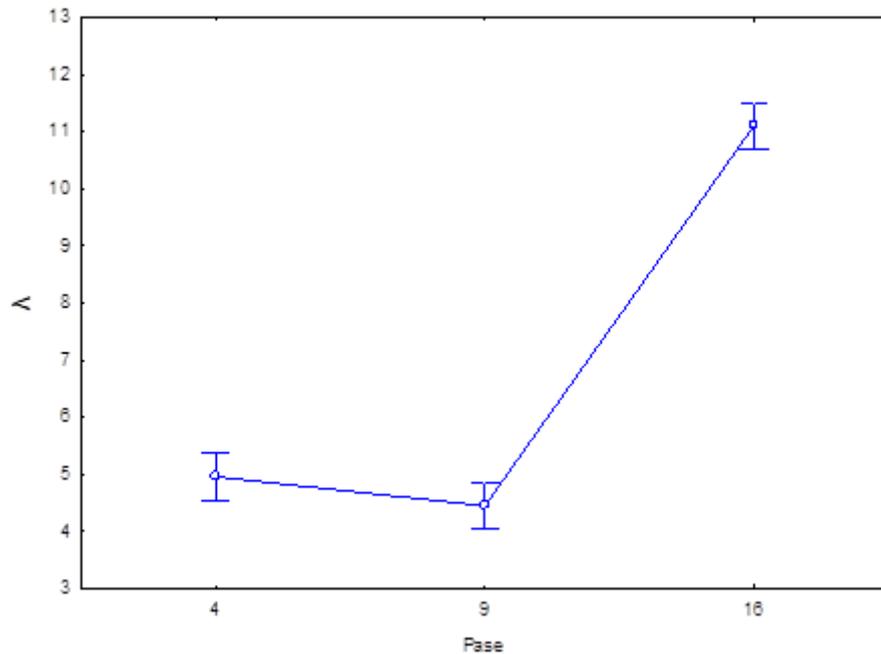


Figura 3.14. Efecto de la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) a 12°C.

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=$, $p>0,05$, indicando que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=6,84$, $DE=4,84$), la línea 2 ($M=6,91$, $DE=4,26$) y la línea 3 ($M=6,76$, $DE=4,21$).

Así como para el efecto principal “Pase”, el ANOVA factorial también indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la fase de latencia o adaptación $F(4, 216)=55,468$, $p<0,001$. En la Figura 3.15 se puede observar como a medida que avanza el proceso evolutivo, claramente aumenta la fase de latencia (λ) en mayor proporción para los híbridos evolucionados en condiciones de estrés por etanol y para aquellos que fueron evolucionados sin ningún tipo de estrés, mientras que para los híbridos evolucionados a 12°C el aumento es prácticamente nulo.

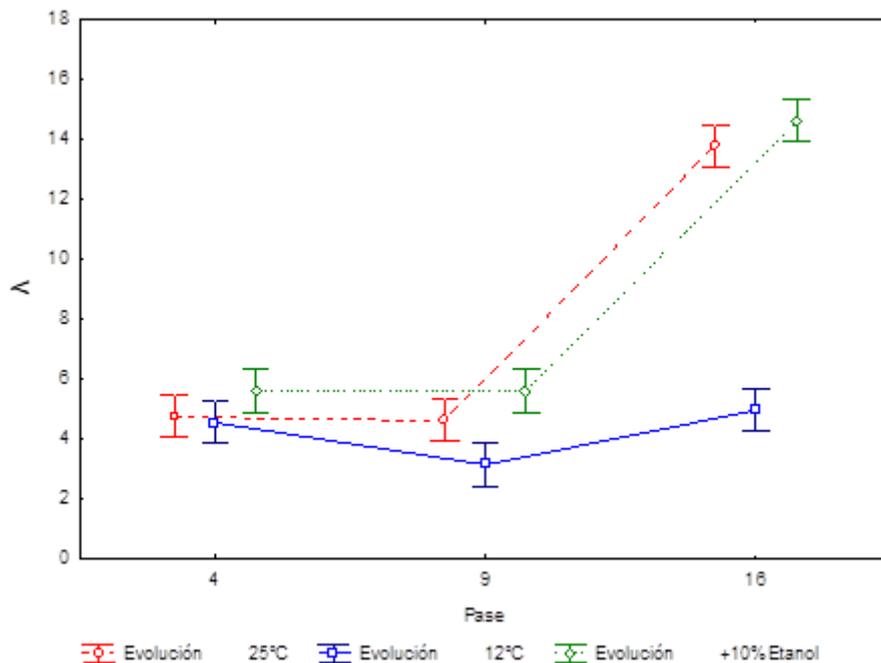


Figura 3.15. Efecto de interacción entre la etapa de evolución (Pase) y la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en GPY a 12°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.3).

En la Figura 3.16 puede observarse el efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre la fase de latencia λ al crecer los híbridos en GPY a 12°C. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=55,468$, $p<0,001$, lo cual indica que las variables de estudio efectivamente tienen influencia sobre la fase de latencia de los híbridos evolucionados. Esta Figura 3.16 resume los efectos que se describieron anteriormente.

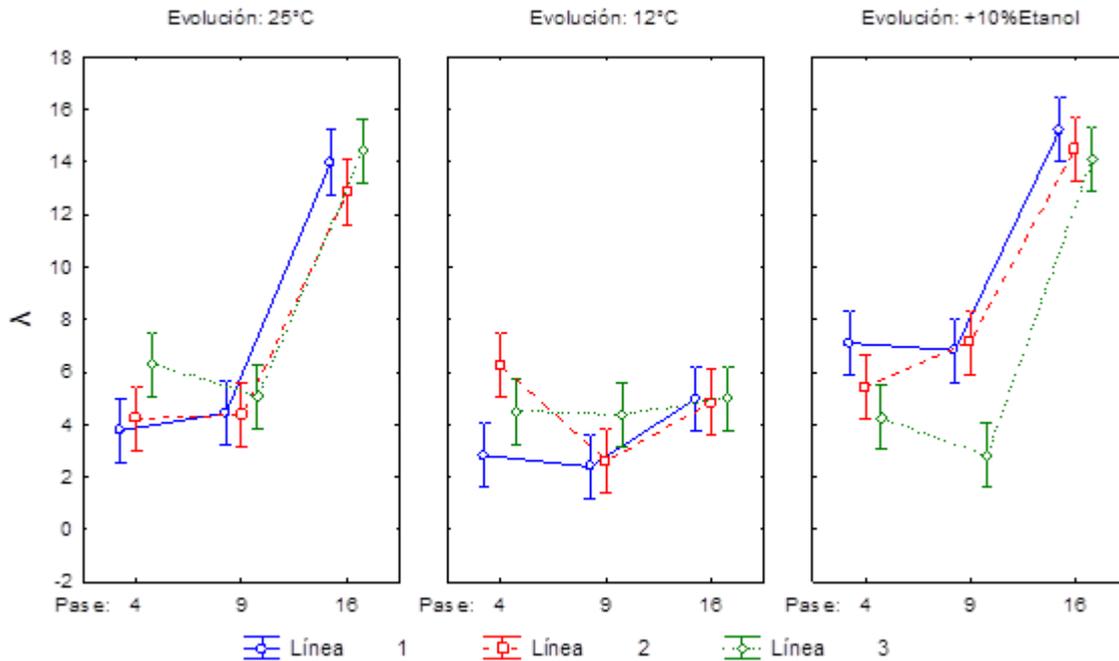


Figura 3.16. Fase de latencia (λ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 12°C.

3.1.6 Caracterización del crecimiento en GPY + 10% de etanol a 25°C de los híbridos

En la Tabla 3.4 se presenta un resumen de los datos obtenidos para cada uno de los parámetros estimados mediante el ajuste de nuestros datos al modelo de Gompertz reparametrizado para los híbridos creciendo en GPY líquido a adicionado con 10% de etanol a 25°C. Cada condición de evolución tenía tres líneas (línea 1, 2 y 3) y cada línea se analizó por triplicado. En la Tabla 3.4 se muestra el promedio y el error estándar de los parámetros obtenidos después del ajuste de los datos de caracterización fisiológica realizada en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C de los híbridos correspondientes a las etapas 4, 9 y 16 del proceso de evolución.

Tabla 3.4 Parámetros de crecimiento de los híbridos de la etapa 4, 9 y 16 caracterizados en GPY + 10% de etanol a 25°C.

Parámetro	Condición de Evolución	Condición de crecimiento para caracterización fisiológica: GPY + 10% de etanol a 25°C											
		Pase 4			Pase 9			Pase 16					
		Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3			
A	25°C	3,0±0,5 ^{c-f}	3,1±0,41 ^{d-f}	2,7±0,2 ^{b-d}	2,5±0,3 ^{a-c}	2,5±0,09 ^{a-c}	2,7±0,10 ^{b-d}	2,6±0,1 ^{a-d}	2,6±0,4 ^{a-d}	2,8±0,1 ^{b-e}			
	12°C	3,5±0,5 ^{f,g}	3,7±0,55 ^g	2,6±0,3 ^{a-d}	2,6±0,2 ^{a-d}	2,7±0,09 ^{b-d}	2,3±0,25 ^{ab}	2,5±0,5 ^{a-c}	2,6±0,2 ^{a-d}	2,9±0,3 ^{b-e}			
	Etanol	2,8±0,2 ^{b-d}	3,3±0,39 ^{e-g}	2,10±0,1 ^a	2,5±0,08 ^{a-c}	2,6±0,05 ^{a-d}	2,5±0,07 ^{a-c}	2,3±0,1 ^{ab}	2,5±0,4 ^{a-c}	2,6±0,2 ^{a-e}			
μ	25°C	0,06±0,1 ^{a,b}	0,06±0,0,1 ^{a,b}	0,08±0,03 ^{a-d}	0,07±0,03 ^{ef}	0,1±0,04 ^{d,e}	0,1±0,02 ^{d,e}	0,07±0,01 ^{a-d}	0,05±0,01 ^a	0,06±0,01 ^{a-c}			
	12°C	0,05±0 ^a	0,05±0,01 ^a	0,09±0,03 ^{a-e}	0,1±0,05 ^{d,e}	0,1±0,01 ^{ef}	0,09±0,01 ^{a-e}	0,08±0,03 ^{a-d}	0,05±0 ^{ab}	0,07±0,03 ^{a-d}			
	Etanol	0,06±0,01 ^{a-c}	0,05±0 ^a	0,1±0,06 ^f	0,1±0,01 ^{a-e}	0,08±0,01 ^{a-e}	0,08±0,02 ^{a-e}	0,08±0,03 ^{a-e}	0,11±0,08 ^{b-e}	0,11±0,07 ^{c-e}			
λ	25°C	1,8±1,0 ^{a-d}	2,5±1,2 ^{a-e}	2±1,7 ^{a-d}	2,7±1,6 ^{a-e}	3,5±1,6 ^{a-e}	4,1±2,3 ^{c-e}	2±1,0 ^{a-d}	1,28±0,9 ^{ab}	1,6±1,1 ^{a-d}			
	12°C	2,1±1,5 ^{a-d}	2,7±1,9 ^{a-e}	3,2±2,8 ^{a-e}	5,2±2,2 ^e	1,8±1,0 ^{a-d}	0,8±0,4 ^a	2,8±1,3 ^{a-e}	1,99±1,3 ^{a-d}	3,4±1,7 ^{a-e}			
	Etanol	1,9±1,2 ^{a-d}	1,2±0,9 ^{ab}	4,3±1,7 ^{d,e}	1,4±1,2 ^{a-d}	1,1±0,7 ^a	1,3±0,9 ^{a-c}	3,0±2,8 ^{a-e}	2,7±1,1 ^{a-e}	4,0±2,2 ^{b-e}			

25°C=Sin estrés (25°C en GPY), 12°C=Estrés por baja temperatura (12°C en GPY), Etanol= Estrés por etanol (GPY + 10% de etanol a 25°C).

A= Crecimiento máximo asintótico, μ= Tasa máxima de crecimiento (h⁻¹), λ= Fase de latencia o adaptación (h). Las letras en superíndice indican los grupos homogéneos obtenidos por análisis ANOVA factorial (prueba de Tukey, n = 2, valor de p <0,05).

a. Parámetro A de híbridos caracterizados en GPY + 10% de etanol

A continuación, se describen los resultados del análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro de crecimiento A) de los híbridos creciendo en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C. Para dicho análisis, la condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

El efecto principal para la condición de evolución produjo una $F(2, 216)=11,71$, $p<0,001$, indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=2,63$, $DE=0,403$), GPY 12°C ($M=2,81$, $DE=0,581$) y GPY a 25°C ($M=2,76$, $DE=356$) (Ver Figura 3.17).

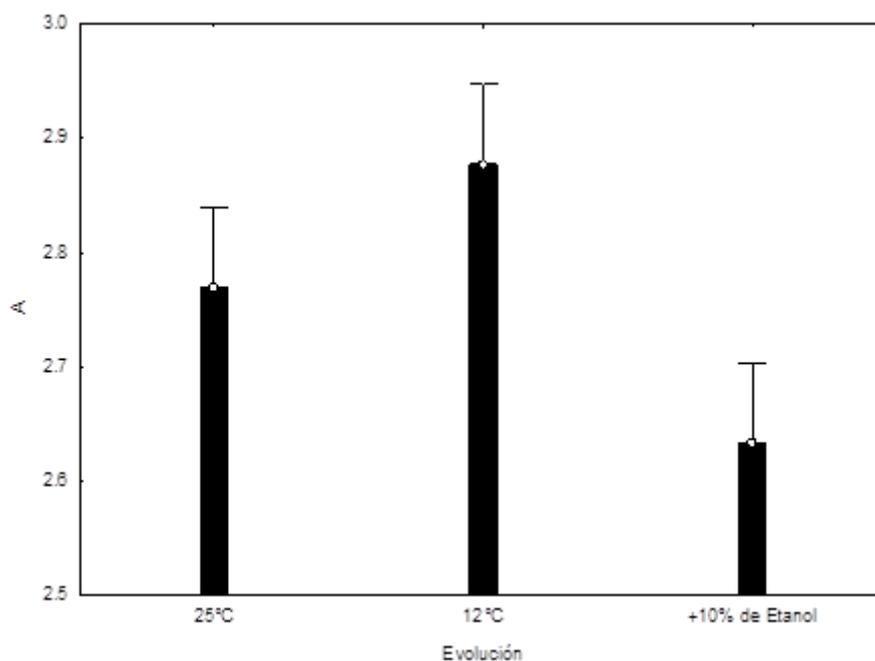


Figura 3.17. Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

Capítulo 3

En la Figura 3.18 se muestra el efecto para el pase o la fase del proceso de evolución, el cual presenta una $F(2,216) = 41,62$, $p < 0,001$, indicando una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M=3,0241$, $DE=0,625$), el noveno pase ($M=2,6035$, $DE=0,197$) y el pase 16 ($M=2,65$, $DE=0,348$).

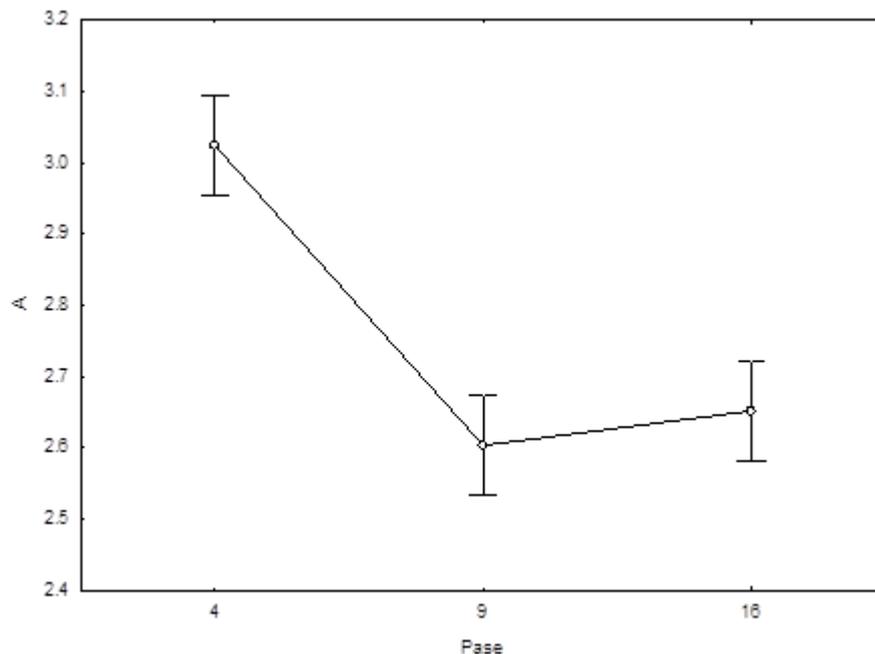


Figura 3.18. Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=16,83$, $p < 0,001$, indicando diferencia significativa entre la línea 1 ($M=2,76$, $DE=0,483$), la línea 2 ($M=2,9$, $DE=0,525$) y la línea 3 ($M=2,61$, $DE=0,32$).

El efecto de interacción entre el pase de evolución y la condición de evolución produce una $F(4,216)=6.916$, $p < 00,00$. En la Figura 3.19 puede observarse como a medida que aumenta la etapa de evolución, disminuye el valor del parámetro A para las tres condiciones de evolución.

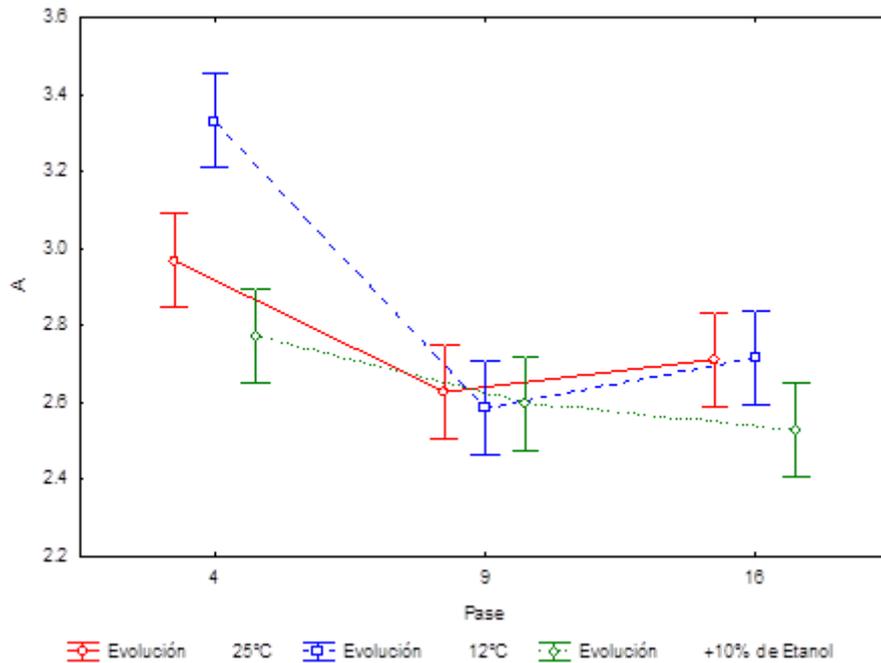


Figura 3.19. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (Parámetro A) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.4).

En la Figura 3.20 se muestra el efecto de interacción entre las variables estudiadas, puede observarse la interacción entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre la fase de latencia λ al crecer los híbridos en GPY a 12°C. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=1,546$, $p>0,05$.

Capítulo 3

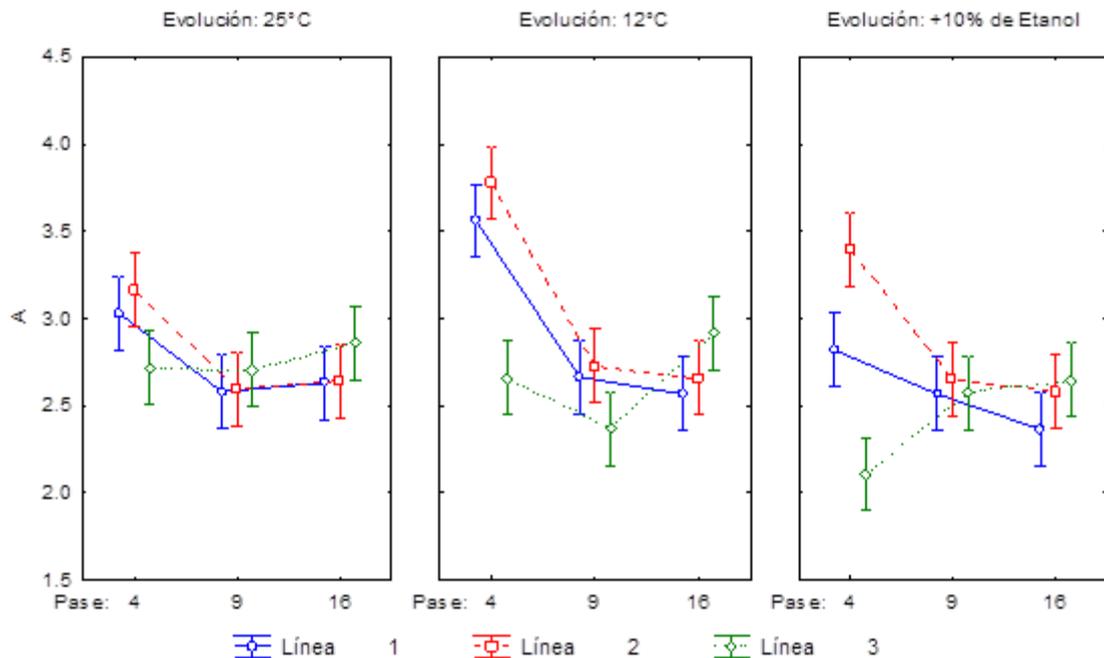


Figura 3.20. Valores determinados del crecimiento máximo asintótico (parámetro A) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

b. Parámetro μ de híbridos caracterizados en GPY + 10% de etanol

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

El efecto principal para la condición de evolución produjo una razón $F(2,216)=8,84$, $p=0,001$, indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=0,099$, $DE=0,051$), GPY a 12°C ($M=0,082$, $DE=0,03$) y GPY a 25°C ($M=0,082$, $DE=0,033$). En la Figura 3.21 se observa que el valor más alto de μ para esta condición de crecimiento lo presentó el híbrido evolucionado bajo la misma condición de estrés (+10% de etanol).

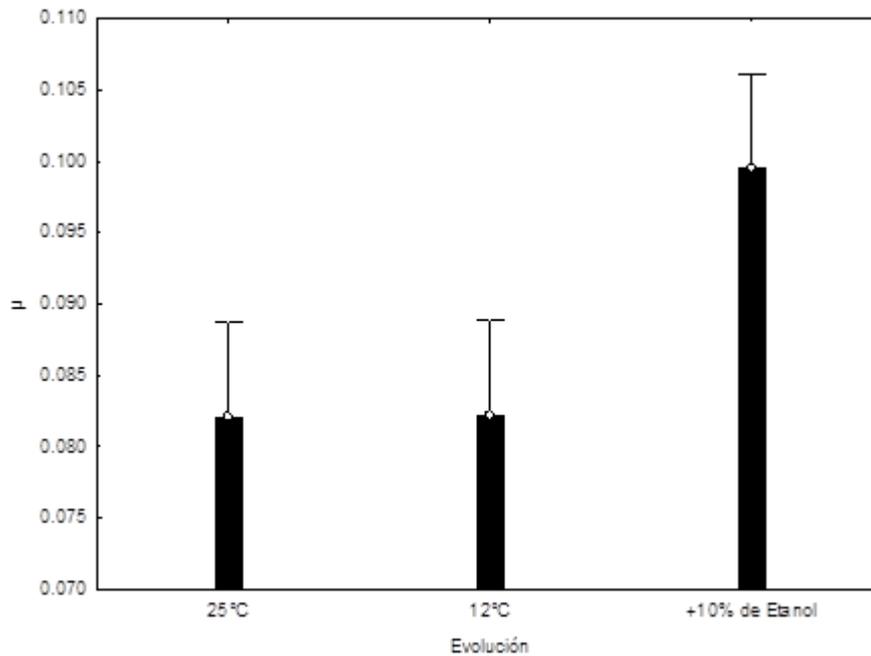


FIGURA 3.21. Efecto de la condición de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

El efecto para el pase o la fase del proceso de evolución produjo una $F(2,216) = 16,243$, $p = 0,001$, indicando una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M = 0,078$, $DE = 0,043$), el noveno pase ($M = 0,10$, $DE = 0,03$) y el pase 16 ($M = 0,081$, $DE = 0,04$). En la Figura 3.22 se puede observar como el valor de μ aumenta del pase 4 al pase 9 y posteriormente disminuye para los híbridos del pase 16.

Capítulo 3

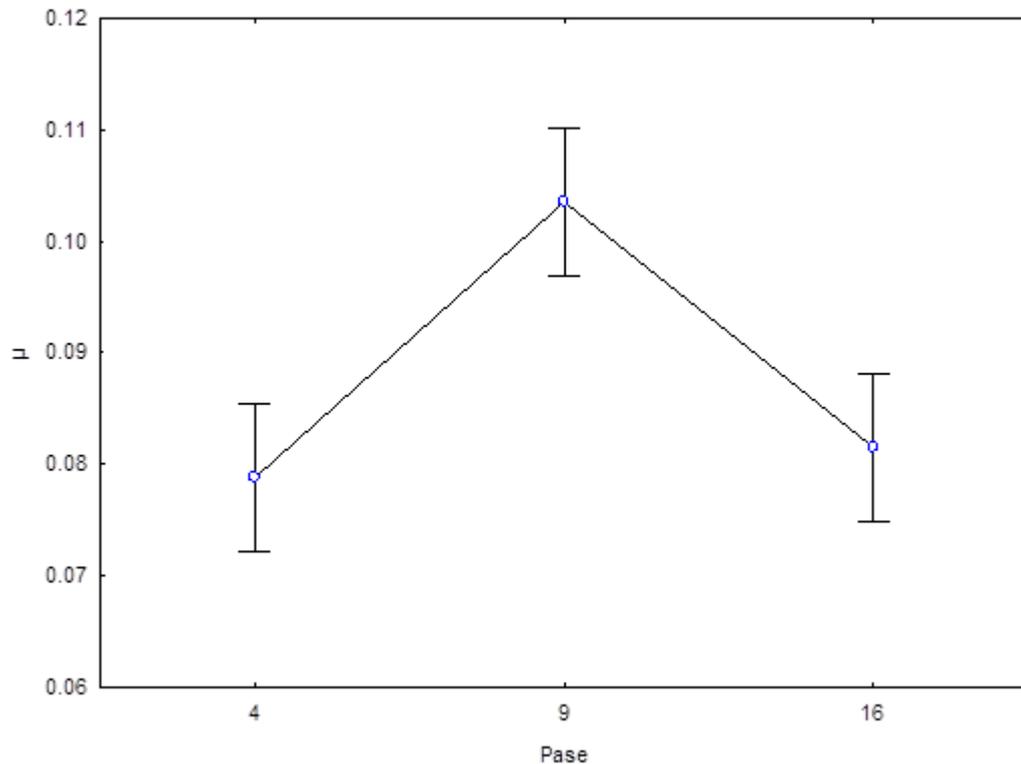


Figura 3.22. Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=10,520$, $p<0,001$, indicando que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=0,081$, $DE=0,03$), la línea 2 ($M=0,081$, $DE=0,04$) y la línea 3 ($M=0,1$, $DE=0,04$).

El ANOVA factorial también indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos, con una $F(4, 216)=8,56$, $p<0,001$. En la Figura 3.23 y la Figura 3.24 se puede observar como en el pase 9 aumenta la tasa máxima de crecimiento para las cepas evolucionadas bajo condiciones de estrés por baja temperatura y sin estrés, disminuyendo nuevamente en el pase 16, mientras que para los híbridos evolucionados en GPY adicionado con 10% de etanol, la μ tiene un comportamiento con una variación significativamente menor.

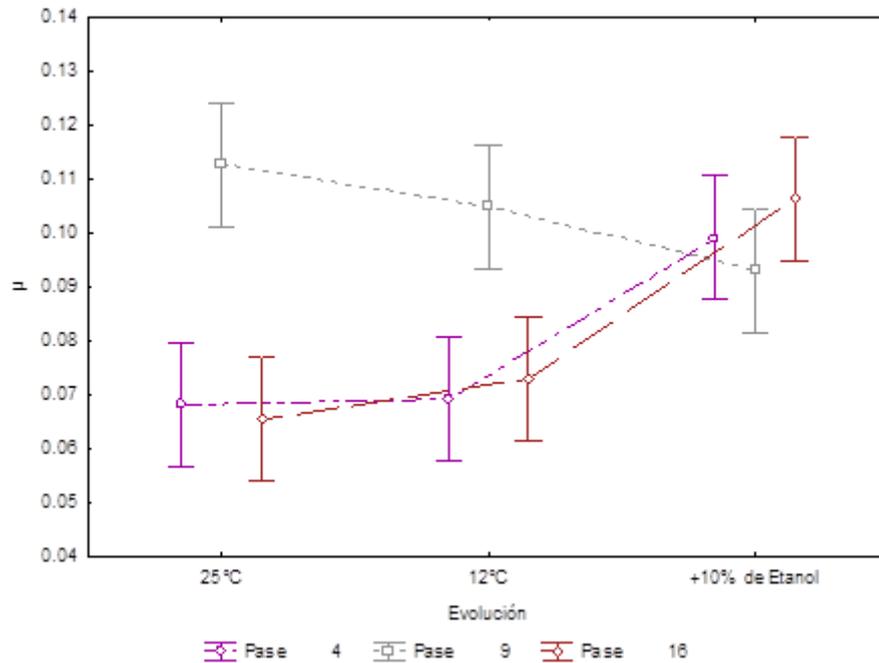


Figura 3.23. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

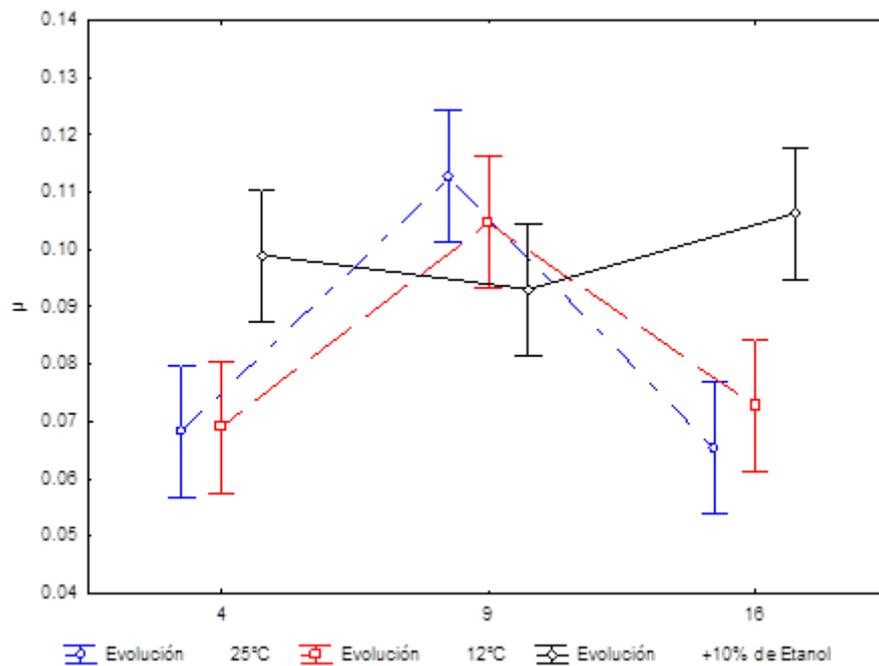


Figura 3.24. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.4).

Capítulo 3

En la Figura 3.25 se muestra el efecto de interacción de entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento de los híbridos en GPY adicionado con 10% de etanol. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=5,4029$, $p<0,001$, lo cual indica que las variables de estudio, efectivamente tienen influencia sobre la tasa máxima de crecimiento de los híbridos evolucionados. Esta Figura 3.25 resume los efectos sobre μ que se describieron anteriormente.

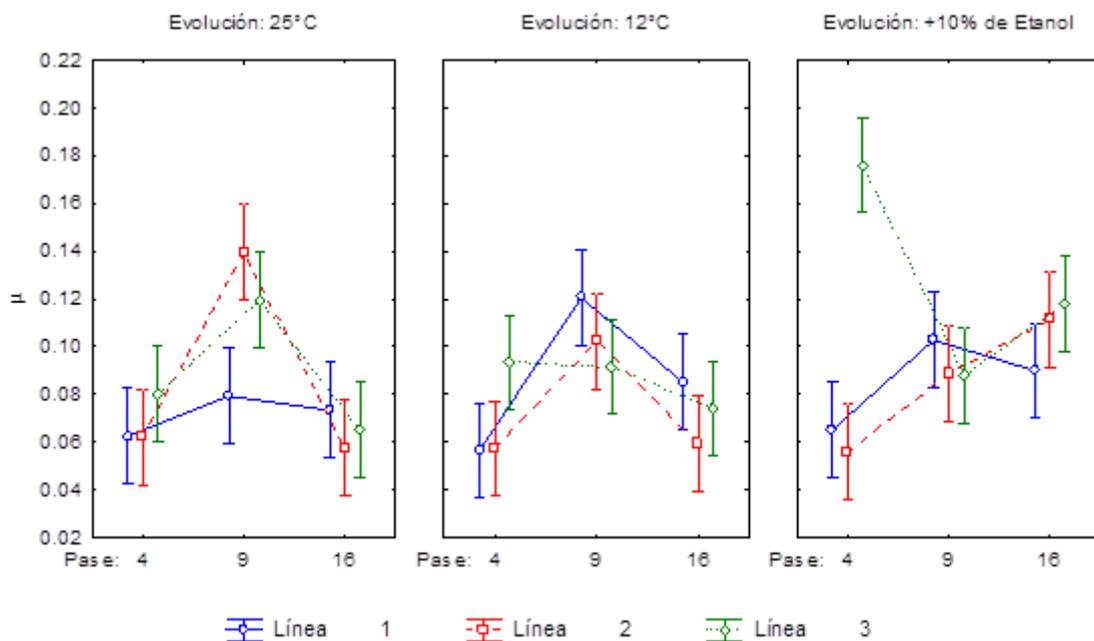


Figura 3.25. Tasa de crecimiento (μ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

c. Parámetro λ de híbridos caracterizados en GPY + 10% de etanol a 25°C

Para la fase de latencia también se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de las tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre fase de latencia o fase de adaptación (λ). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

En la Figura 3.26 se muestra el efecto principal para la condición de evolución, con una razón $F(2,216)=0,980$, $p>0,05$, indicando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=2,38$, $DE=1,91$), GPY a 12°C ($M=2,70$, $DE=2,04$) y GPY a 25°C ($M=2,42$, $DE=1,67$).

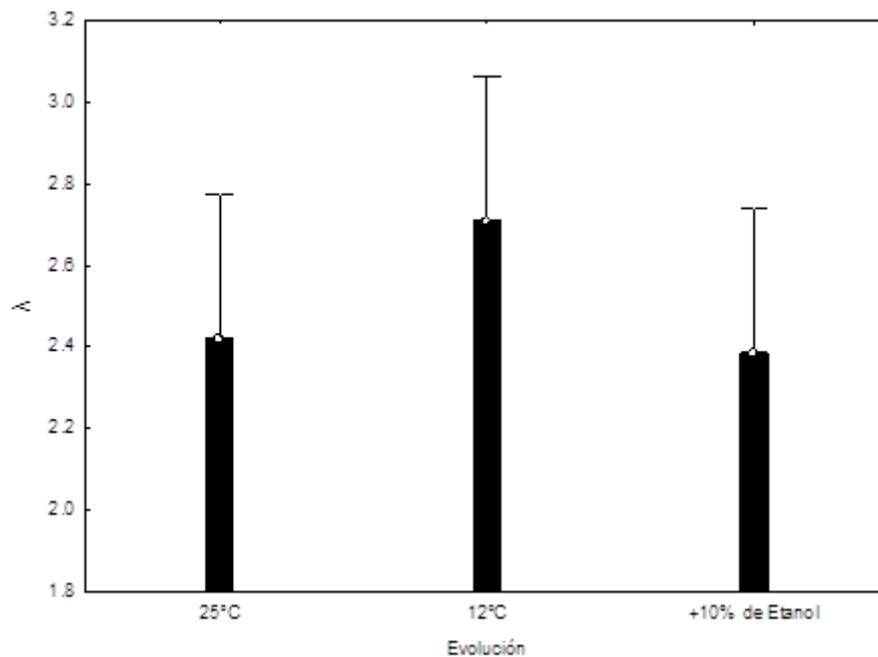


Figura 3.26. Efecto principal de la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C .

En la Figura 3.27 se muestra el efecto para el pase o la fase del proceso de evolución, el cual produjo una $F(2,216)=0,102$, $p>0,05$, indicando que no existe una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M=2,45$, $DE=1,82$), el noveno pase ($M=2,48$, $DE=2,03$) y el pase 16 ($M=2,56$, $DE=1,76$).

Capítulo 3

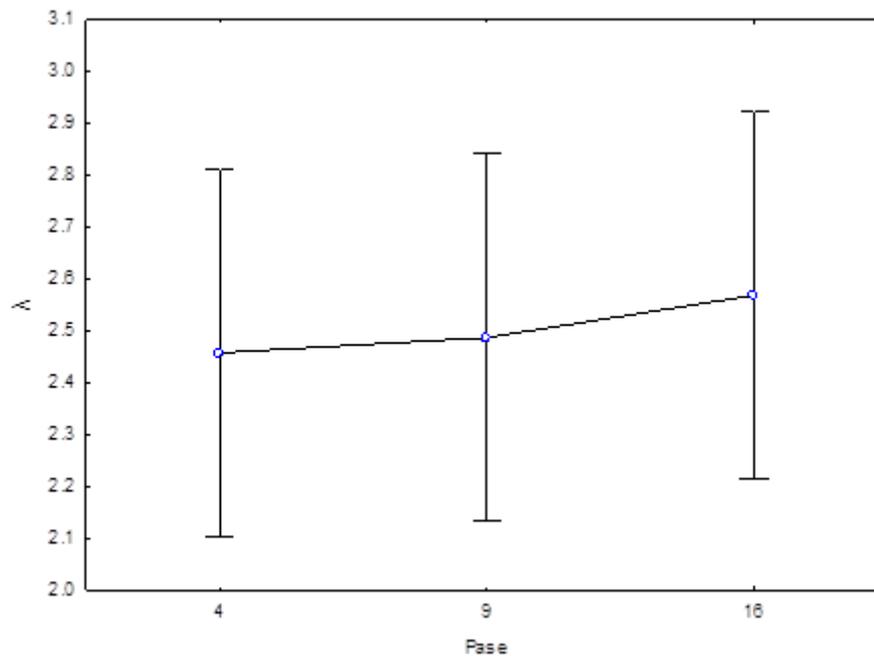


Figura 3.27. Efecto principal de la condición de etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=3,492$, $p>0,001$, indicando que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=2,60$, $DE=1,91$), la línea 2 ($M=2,12$, $DE=1,44$) y la línea 3 ($M=2,77$, $DE=2,15$).

El ANOVA factorial también indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos, arrojando una $F(4, 216)=9,7562$, $p<0,001$. En la Figura 3.28 se puede observar como la fase de latencia se mantiene constante a través de las etapas de evolución para aquellos híbridos evolucionados en GPY a 12°C, mientras que para los que se evolucionaron sin estrés, el parámetro λ aumenta en el pase 9 y disminuye en el pase 16. También se observa que los híbridos evolucionados bajo la misma condición de análisis, es decir, bajo estrés por etanol, presentan una disminución de la fase de latencia en el pase 9 pero posteriormente aumenta en el pase 16.

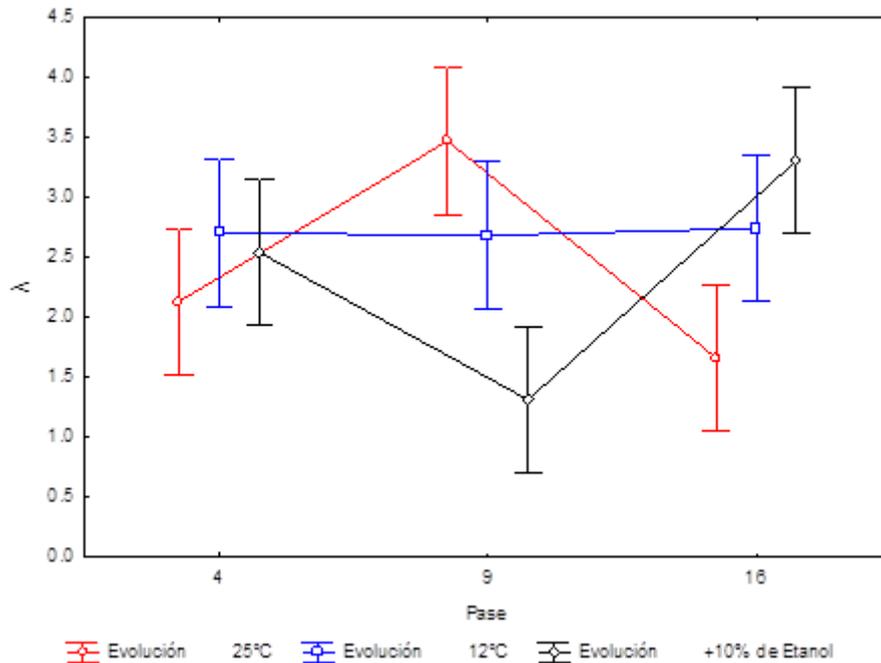


Figura 3.28. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.4).

En la Figura 3.29 se muestra el efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre la fase de latencia de los híbridos creciendo en GPY adicionado con 10% de etanol. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=4,1906$, $p<0,001$, lo cual indica que las variables de estudio efectivamente tienen influencia sobre la fase de latencia de los híbridos evolucionados. Esta Figura 3.29 resume los efectos sobre λ que se describieron anteriormente.

Capítulo 3

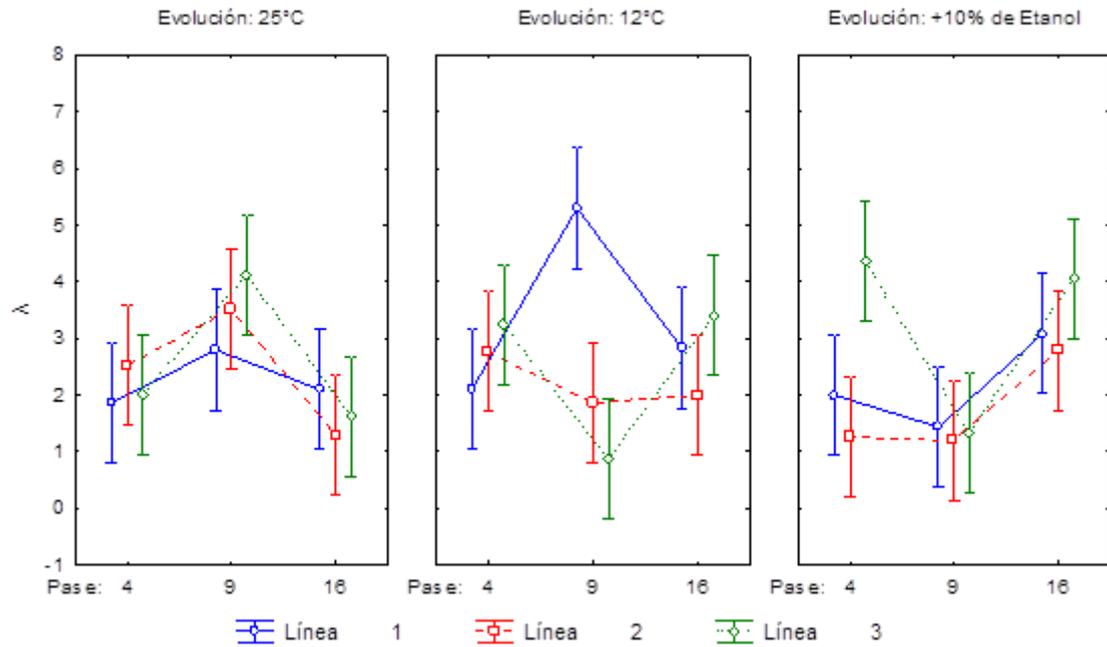


Figura 3.29. Fase de latencia (λ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY adicionado con 10% de etanol a 25°C.

3.4.3. Caracterización del crecimiento en GPY a 25°C de los híbridos

Los datos que se muestran en este apartado corresponden al crecimiento de los híbridos en condiciones óptimas de crecimiento y sin ningún estrés durante el crecimiento. Esta condición fue usada como control.

Tabla 3.5 Parámetros de crecimiento de los híbridos de la etapa 4, 9 y 16 caracterizados en GPY a 25°C.

Parámetro	Condición de Evolución	Condición de crecimiento para caracterización fisiológica: GPY a 25°C											
		Pase 4			Pase 9			Pase 16					
		Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3			
A	25°C	2,59±0,33 ^{df}	3,08±0,09 ^{hi}	3,11±0,28 ⁱ	2,33±0,07 ^{b-d}	2,65±0,04 ^{ef}	2,59±0,06 ^{d-f}	2,80±0,05 ^{f-h}	2,78±0,04 ^g	2,80±0,03 ^{f-h}			
	12°C	3,09±0,05 ^{hi}	2,98±0,32 ^{gi}	2,45±0,33 ^{c-e}	2,54±0,1 ^{df}	2,53±0,07 ^{df}	2,63±0,08 ^{ef}	2,21±0,17 ^{a-c}	2,11±0,18 ^{ab}	2,03±0,20 ^a			
	Etanol	2,56±0,22 ^{df}	2,60±0,24 ^{df}	2,48±0,09 ^{c-e}	2,43±0,08 ^{c-e}	2,57±0,07 ^{df}	2,54±0,28 ^{df}	2,79±0,03 ^{f-h}	2,78±0,11 ^g	2,78±0,02 ^g			
H	25°C	0,40±0,01 ^{c-e}	0,39±0,01 ^{b-de}	0,41±0,01 ^{de}	0,31±0,05 ^{a-d}	0,34±0,01 ^{a-cd}	0,33±0,02 ^{a-d}	0,32±0,01 ^{a-d}	0,32±0,01 ^{a-d}	0,32±0,01 ^{a-d}			
	12°C	0,37±0,01 ^{a-d}	0,39±0,02 ^{b-e}	0,28±0,05 ^{a-c}	0,33±0,02 ^{a-d}	0,31±0,02 ^{a-d}	0,31±0,02 ^{a-d}	0,27±0,01 ^a	0,28±0,01 ^{ab}	0,26±0,02 ^a			
	Etanol	0,50±0,34 ^e	0,34±0,01 ^{a-d}	0,34±0,02 ^{a-d}	0,34±0,01 ^{a-d}	0,35±0,01 ^{a-d}	0,32±0,02 ^{a-d}	0,30±0,04 ^{a-d}	0,27±0,01 ^a	0,32±0,01 ^{a-d}			
λ	25°C	4,63±1,0 ^h	3,44±0,64 ^{e-h}	3,81±0,64 ^{f-h}	1,38±0,32 ^a	1,54±0,18 ^{a-c}	1,46±0,19 ^{ab}	2,44±0,32 ^{a-e}	2,38±0,46 ^{a-e}	2,77±0,38 ^{c-f}			
	12°C	3,04±0,36 ^{d-g}	4,24±0,77 ^{gh}	2,66±2,36 ^{b-f}	1,45±0,12 ^{ab}	1,64±0,26 ^{a-c}	1,68±0,14 ^{a-c}	1,63±0,6 ^{abc}	1,64±0,57 ^{a-c}	1,81±0,48 ^{a-d}			
	Etanol	2,67±1,63 ^{b-f}	1,45±0,26 ^{ab}	1,65±0,34 ^{a-c}	1,51±0,22 ^{a-c}	1,68±0,32 ^{a-c}	1,93±0,55 ^{a-d}	2,63±0,59 ^{a-f}	2,95±0,89 ^{d-f}	2,71±0,18 ^{b-f}			

25°C=Sin estrés (25°C en GPY), 12°C=Estrés por baja temperatura (12°C en GPY), Etanol= Estrés por etanol (GPY + 10% de etanol a 25°C).

A= Crecimiento máximo asintótico, μ= Tasa máxima de crecimiento (h⁻¹), λ= Fase de latencia o adaptación (h). Las letras en superíndice indican los grupos homogéneos significativos obtenidos por análisis ANOVA factorial (prueba de Tukey, n = 2, valor de p <0,05).

Capítulo 3

a. Parámetro A de híbridos caracterizados en GPY a 25°C

Para la condición control también se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

El efecto principal para la condición de evolución produjo una razón $F(2,216)=41,43$, $p<0,001$, indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=2,61$, $DE=0,19$), GPY a 12°C ($M=2,51$, $DE=0,39$) y GPY a 25°C ($M=2,75$, $DE=0,27$). La Figura 3.30 muestra que los híbridos evolucionados en GPY a 25°C presentaron el máximo valor del parámetro A, mientras que los híbridos evolucionados en condiciones de estrés tuvieron un valor menor para este parámetro de crecimiento.

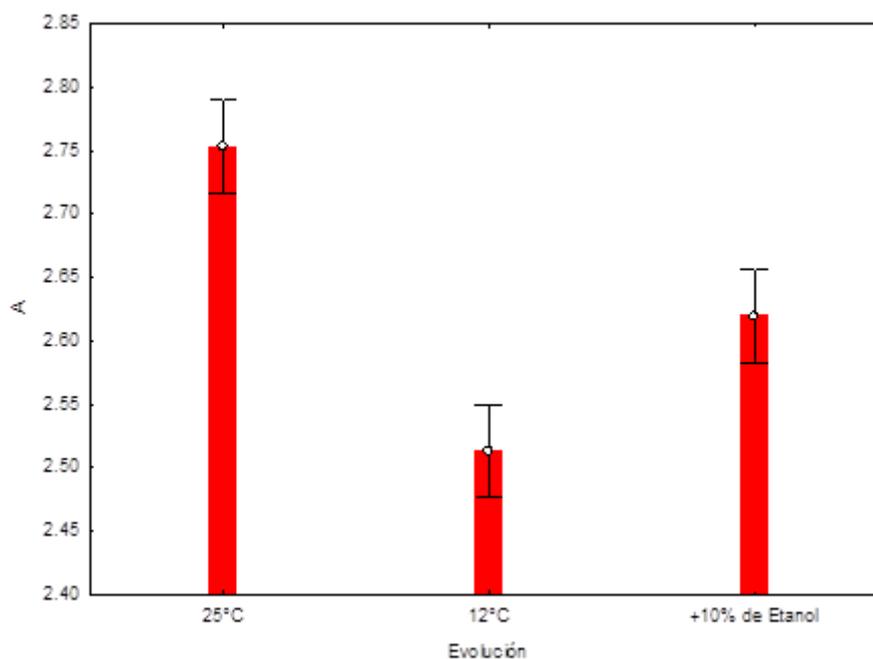


Figura 3.30. Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY a 25°C.

El efecto para el pase o la fase del proceso de evolución produjo una $F(2,216) = 47,33$, $p < 0,001$, indicando una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M=2,77$, $DE=0,35$), el noveno pase ($M=2,53$, $DE=0,14$) y el pase 16 ($M=2,57$, $DE=0,33$). En la Figura 3.31 se observa una disminución entre los pases 4 y 9, con un ligero aumento en el pase 16.

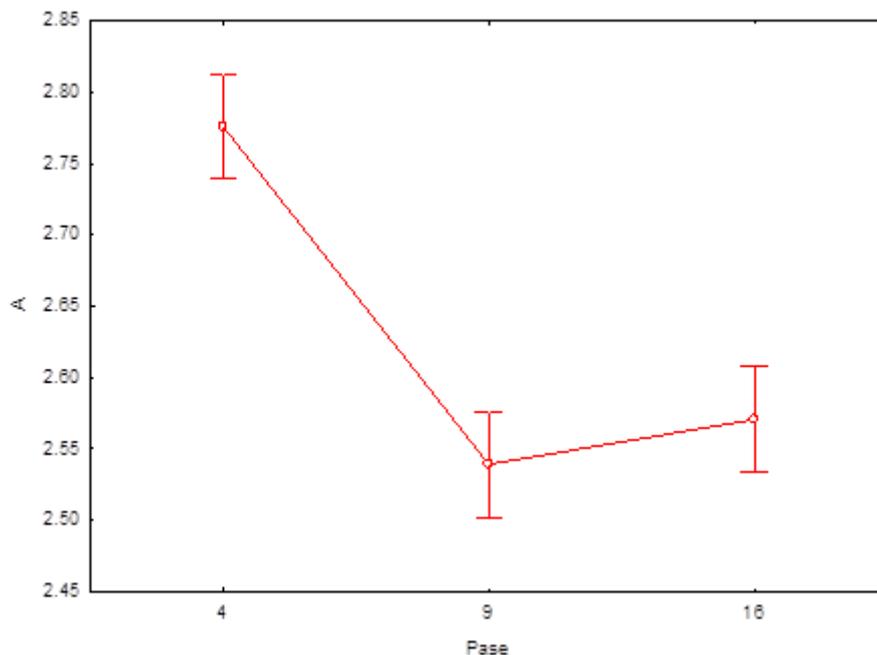


Figura 3.31. Efecto de la condición de etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY a 25°C.

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216) = 5,871$, $p > 0,001$, indicando que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=2,59$, $DE=0,29$), la línea 2 ($M=2,68$, $DE=0,30$) y la línea 3 ($M=2,6$, $DE=0,33$).

El ANOVA factorial también indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos, arrojando una $F(4, 216) = 70,621$, $p < 0,001$. En la Figura 3.32 se puede observar como los híbridos evolucionados a baja temperatura disminuyeron el valor del parámetro A en los pases 4 y 16. Para los híbridos evolucionados en GPY a 25°C y en GPY adicionado con etanol se presenta un aumento de A entre los pases 9 y 16.

Capítulo 3

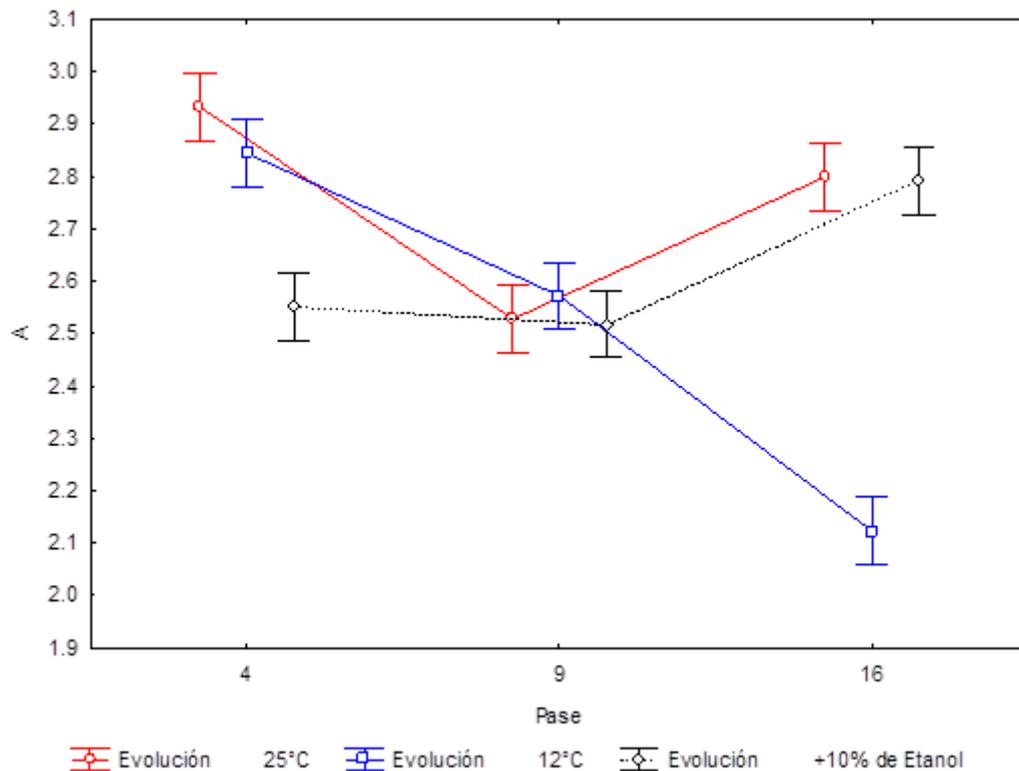


Figura 3.32. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en GPY a 25°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.5).

En la Figura 3.33 se muestra el efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre el parámetro A (crecimiento máximo asintótico) de los híbridos creciendo en GPY a 25°C. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=7,386$, $p<0,001$, lo cual indica que las variables de estudio, efectivamente tienen influencia sobre la fase de latencia de los híbridos evolucionados. Esta Figura 3.33 resume los efectos sobre el parámetro A que se describieron anteriormente.

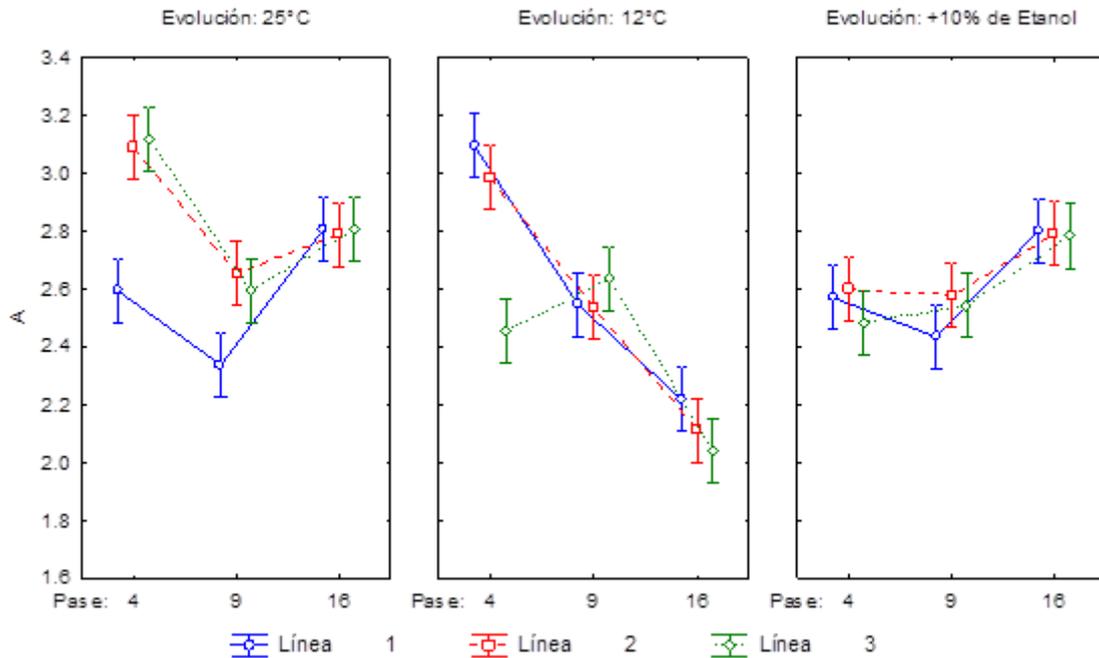


Figura 3.33. Valores determinados del crecimiento máximo asintótico (parámetro A) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 25°C.

b. Parámetro μ de híbridos caracterizados en GPY a 25°C

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

El efecto principal para la condición de evolución produjo una razón $F(2,216)=6,528$, $p<0,05$, indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=0,345$, $DE=0,122$), GPY a 12°C ($M=0,317$, $DE=0,048$) y GPY a 25°C ($M=0,354$, $DE=0,041$). En la Figura 3.34 puede observarse que la mayor tasa de crecimiento la presentaron los híbridos que fueron evolucionados a 25°C, mientras que la menor tasa de crecimiento la presentaron los híbridos evolucionados a 12°C.

Capítulo 3

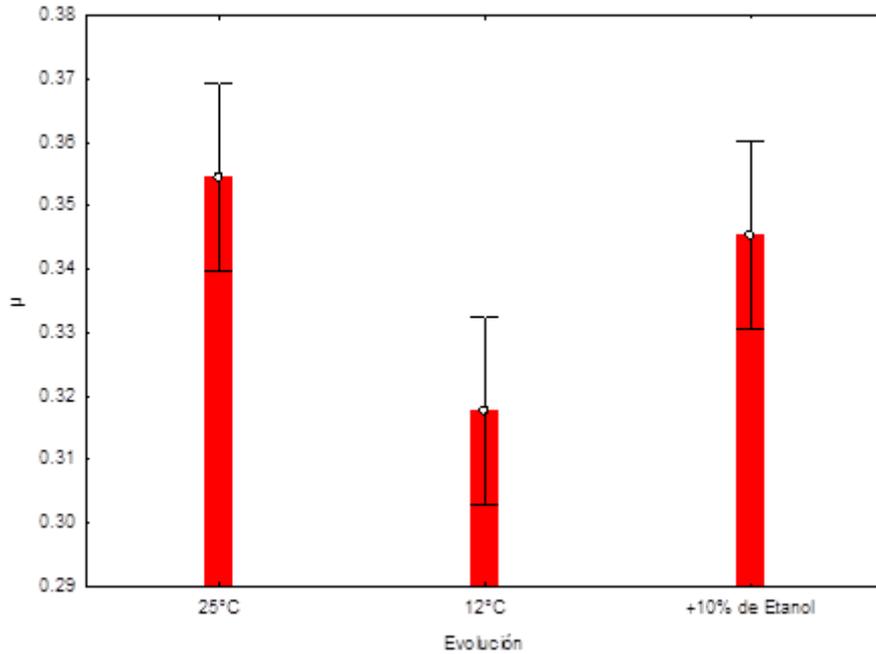


Figura 3.34. Efecto principal de la condición de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY a 25°C.

El efecto para el pase o la fase del proceso de evolución produjo una $F(2,216) = 32,216$, $p < 0,001$, indicando una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M=0,385$, $DE=0,121$), el noveno pase ($M=0,331$, $DE=0,024$) y el pase 16 ($M=0,30$, $DE=0,027$). En la Figura 3.35 se puede observar como la tasa de crecimiento de los híbridos en GPY a 25°C disminuye a medida que avanza el proceso de evolución.

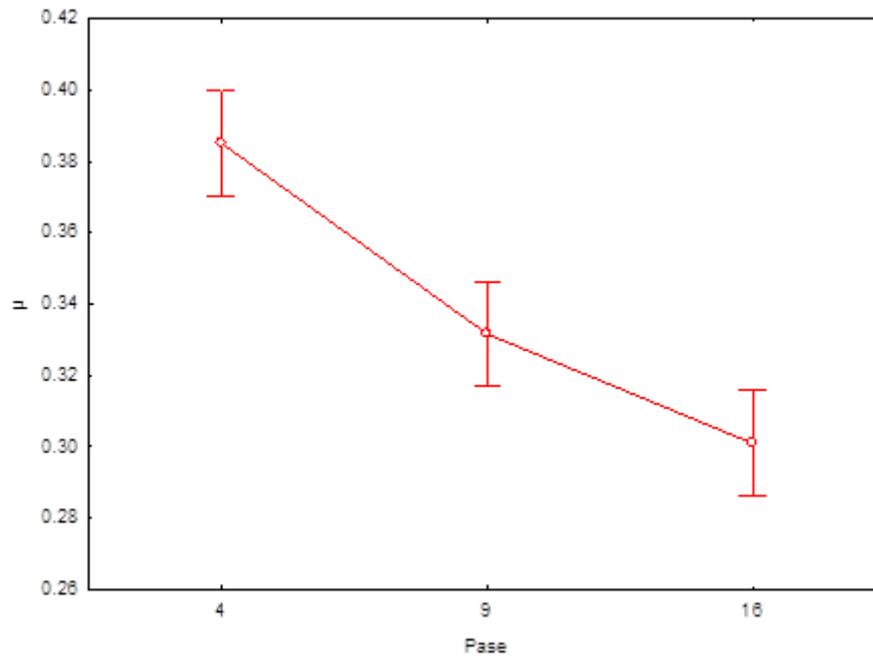


Figura 3.35. Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY a 25°C.

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=3,301$, $p>0,001$, indicando que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=0,35$, $DE=0,125$), la línea 2 ($M=0,33$, $DE=0,042$) y la línea 3 ($M=0,32$, $DE=0,44$).

El ANOVA factorial también indica que no hay efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos, arrojando una $F(4, 216)=0,78371$, $p>0,05$. En la Figura 3.36 se puede observar como todos los híbridos, independientemente de la condición en la que fueron evolucionados, presentaron una disminución de la tasa de crecimiento ente los pases 4, 9 y 16 creciendo en GPY a 25°C.

Capítulo 3

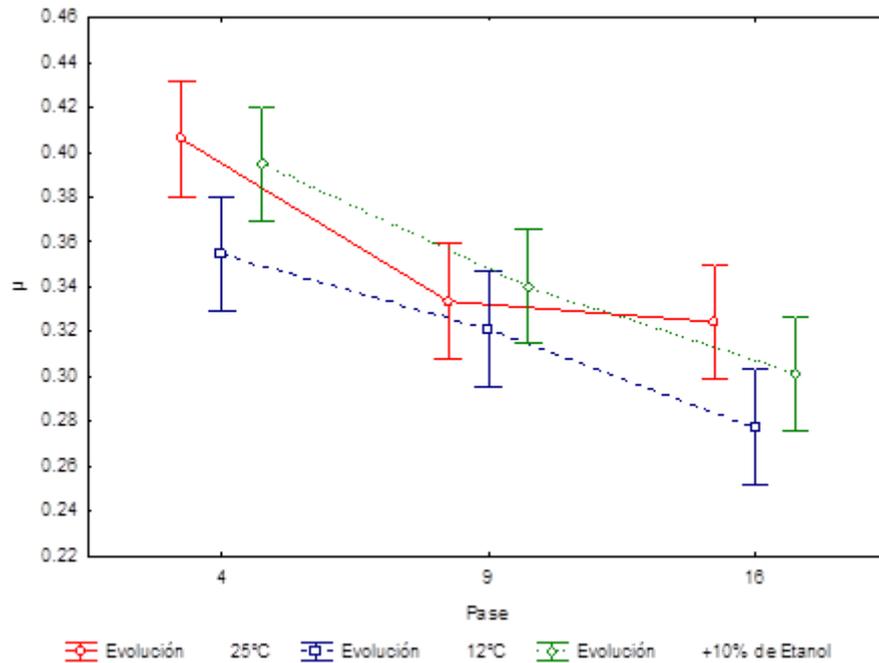


Figura 3.36. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en GPY a 25°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.5).

En la Figura 3.37 se muestra el efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) de los híbridos en GPY a 25°C. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=2,5053$, $p<0,05$, lo cual indica que las variables de estudio, efectivamente tienen influencia sobre la tasa de crecimiento de los híbridos evolucionados. Esta Figura 3.37 resume los efectos sobre μ que se describieron anteriormente.

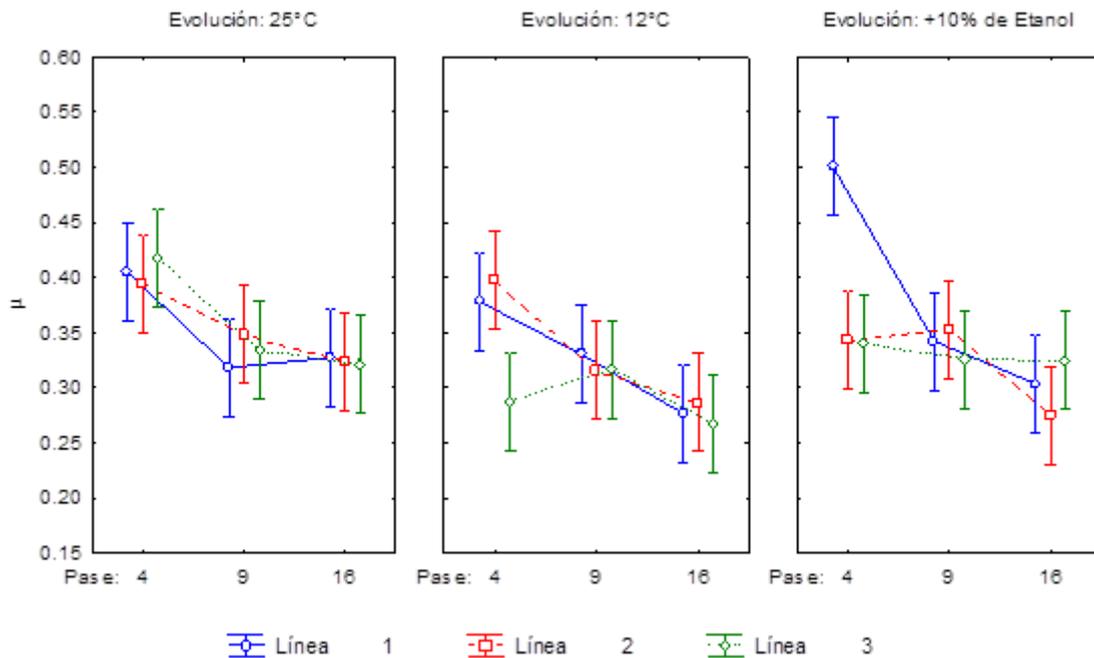


Figura 3.37. Tasa de crecimiento (m) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 25°C.

c. Parámetro λ de híbridos caracterizados en GPY a 25°C

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre la fase de latencia o fase de adaptación (λ). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

El efecto principal para la condición de evolución produjo una razón $F(2,216)=12,37$, $p<0,001$, indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=2,13$, $DE=0,87$), GPY a 12°C ($M=2,201$, $DE=1,233$) y GPY a 25°C ($M=2,656$, $DE=1,18$). En la Figura 3.38 se observa como los híbridos que presentan la menor fase de latencia son los híbridos evolucionados en condiciones de estrés por etanol,

Capítulo 3

mientras que los híbridos evolucionados sin estrés fueron los que presentaron la mayor fase de latencia.

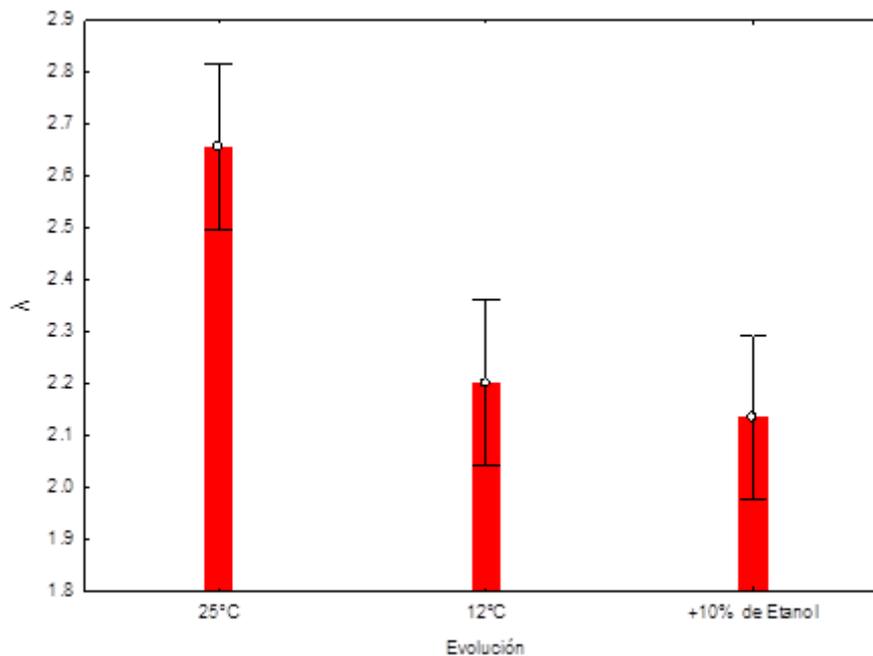


Figura 3.38. Efecto principal de la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en GPY a 25°C.

El efecto para el pase o la fase del proceso de evolución produjo una $F(2,216) = 84,0$, $p < 0,001$, indicando una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M=3,06$, $DE=1,47$), el noveno pase ($M=1,59$, $DE=0,31$) y el pase 16 ($M=2,33$, $DE=0,69$). En la Figura 3.39 se puede observar que no existe una tendencia de aumento o disminución, ya que mientras hay una disminución entre los pases 4 y 9, se presenta un aumento de la fase de latencia entre los pases 9 y 16.

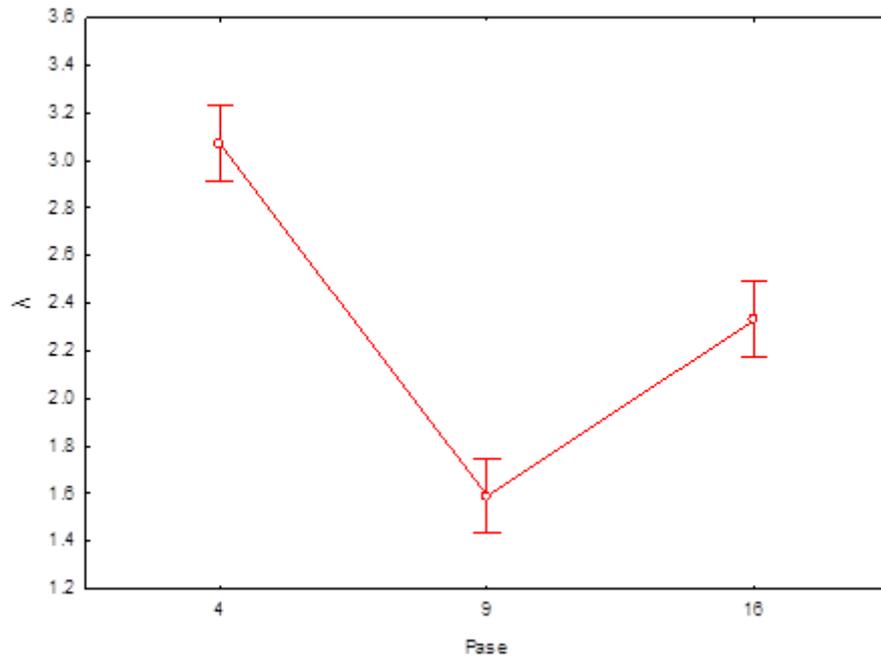


Figura 3.39. Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de adaptación (λ) en GPY a 25°C.

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=0,384$, $p>0,05$, indicando que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=2,38$, $DE=1,21$), la línea 2 ($M=2,33$, $DE=1,08$) y la línea 3 ($M=2,28$, $DE=1,12$).

El ANOVA factorial también indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos, arrojando una $F(4, 216)=30.31$, $p<0,001$. En la Figura 3.40 se puede observar que no existe una tendencia por parte de los híbridos de las tres condiciones evolutivas, es decir, las tres condiciones se comportan de forma diferente conforme avanza la evolución.

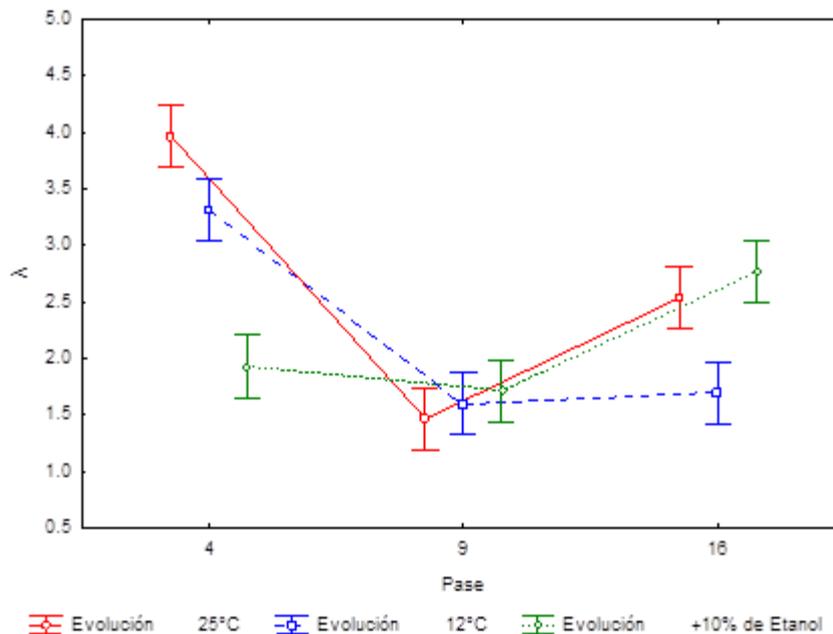


Figura 3.40. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en GPY a 25°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.5).

En la Figura 3.41 se muestra el efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre la fase de latencia (λ) de los híbridos creciendo en GPY a 25°C. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=3,4802$, $p<0,001$, lo cual indica que las variables de estudio efectivamente tienen influencia sobre la fase de latencia de los híbridos evolucionados. Esta Figura 3.41 resume los efectos sobre λ que se describieron anteriormente.

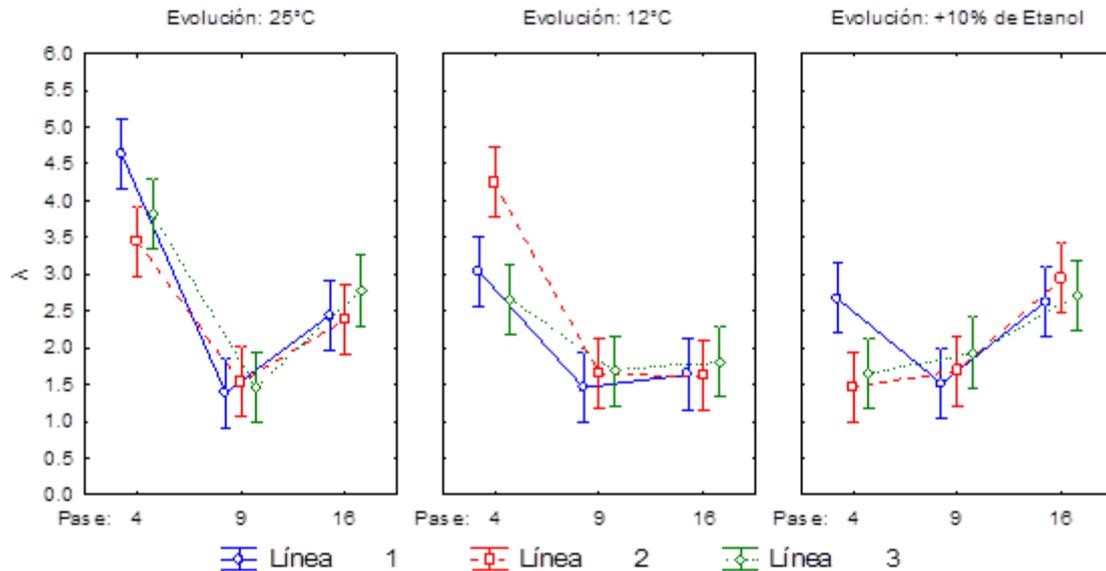


Figura 3.41. Fase de latencia (λ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en GPY a 25°C.

3.1.8 Caracterización del crecimiento en mosto sintético a 25°C de los híbridos

Tal y como se ha comentado en la introducción, una de las aplicaciones que se han derivado del estudio de los híbridos naturales presentes en fermentaciones ha sido la obtención de nuevas cepas híbridas artificiales entre especies del género *Saccharomyces*. Por este motivo decidimos estudiar el comportamiento de los híbridos en mosto sintético simulando una fermentación. A continuación, se describen los resultados del análisis estadístico realizado a los parámetros de las curvas de crecimiento ajustadas al modelo de Gompertz reparametrizado.

Tabla 3.6 Parámetros de crecimiento de los híbridos de la etapa 4, 9 y 16 caracterizados en Mosto Sintético a 25°C.

Parámetro	Condición de Evolución	Condicción de crecimiento para caracterización fisiológica:															
		Mosto sintético a 25°C															
		Pase 4			Pase 9			Pase 16									
		Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 1	Línea 2	Línea 3	
A	25°C	2,48±0,11 ^{ab}	2,33±0,03 ^a	2,35±0,07 ^a	2,82±0,08 ^{cdef}	2,78±0,07 ^c	2,77±0,14 ^c	2,86±0,19 ^{cdefg}	3,02±0,19 ^{defgh}	2,92±0,2 ^{cdefg}							
	12°C	2,82±0,06 ^{cd}	2,80±0,04 ^c	2,72±0,23 ^c	2,70±0,07 ^{bc}	2,74±0,10 ^c	2,79±0,08 ^{cd}	3,03±0,13 ^{efgh}	3,06±0,25 ^g	3,03±0,11 ^{fgh}							
	Etanol	2,86±0,05 ^{cd}	2,83±0,1 ^{cd}	2,78±0,03 ^c	2,81±0,08 ^{cdef}	2,79±0,06 ^c	2,80±0,08 ^{cde}	3,07±0,1 ^h	2,73±0,2 ^c	2,92±0,23 ^{cde}							
H	25°C	0,35±0,04 ^{ef}	0,32±0,05 ^e	0,38±0,04 ^f	0,29±0,02 ^{cde}	0,26±0,02 ^c	0,29±0,02 ^{cde}	0,20±0,01 ^b	0,19±0,02 ^{ab}	0,18±0,01 ^{ab}							
	12°C	0,33±0,02 ^{ef}	0,29±0,03 ^c	0,32±0,04 ^d	0,27±0,03 ^{cd}	0,28±0,02 ^{cde}	0,32±0,01 ^{def}	0,18±0,03 ^{ab}	0,18±0,01 ^{ab}	0,18±0,02 ^{ab}							
	Etanol	0,26±0,02 ^c	0,31±0,03 ^d	0,27±0,03 ^c	0,27±0,02 ^{cd}	0,27±0,05 ^{cd}	0,26±0,01 ^c	0,19±0,05 ^{ab}	0,15±0,01 ^a	0,17±0,04 ^{ab}							
λ	25°C	4,03±1,17 ^{de}	4,75±0,32 ^h	5,52±0,68 ⁱ	2,06±0,44 ^{abc}	2,60±0,27 ^{abcd}	3,16±0,88 ^{abcde}	2,96±1,1 ^{abcdef}	1,63±1,25 ^a	1,67±1,37 ^a							
	12°C	1,52±0,47 ^a	1,50±0,14 ^a	2,52±2,2 ^{abc}	5,20±0,61 ⁱ	4,62±0,86 ^{ghi}	1,89±0,34 ^{ab}	3,74±1,33 ^{bcdef}	2,98±0,94 ^{abcde}	4,48±1,34 ^{fghi}							
	Etanol	1,67±0,29 ^a	1,47±0,57 ^a	2,06±0,66 ^a	2,78±0,69 ^{abcde}	3,60±1,19 ^{bcdef}	4,22±0,59 ^{efghi}	2,18±1,75 ^{abcd}	3,93±2,53 ^{cdefg}	2,26±1,43 ^{abc}							

25°C=Sin estrés (25°C en GPY), 12°C=Estrés por baja temperatura (12°C en GPY), Etanol= Estrés por etanol (GPY + 10% de etanol a 25°C).

A= Crecimiento máximo asintótico, μ= Tasa máxima de crecimiento (h⁻¹), λ= Fase de latencia o adaptación (h). Las letras en superíndice indican los grupos homogéneos significativos obtenidos por análisis ANOVA factorial (prueba de Tukey, n = 2, valor de p <0,05).

a. Parámetro A de crecimiento de los híbridos en mosto sintético a 25°C

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

En la Figura 3.42 se muestra el efecto principal para la condición de evolución, la cual produjo una razón $F(2,216)=32,43$, $p<0,001$, indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=2,84$, $DE=0,149$), GPY a 12°C ($M=2,85$, $DE=0,189$) y GPY a 25°C ($M=2,70$, $DE=0,270$).

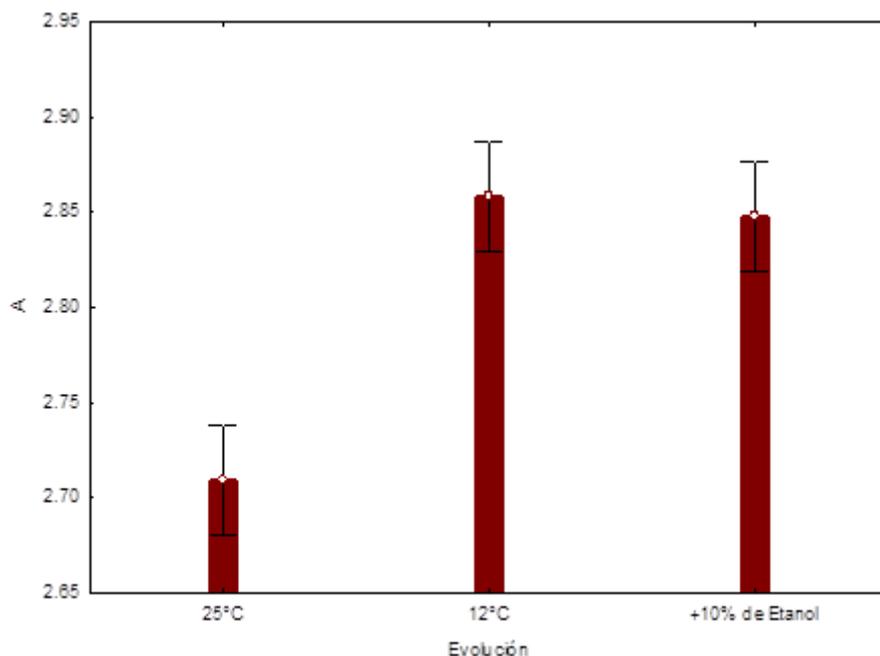


Figura 3.42. Efecto principal de la condición de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en mosto sintético a 25°C.

Capítulo 3

El efecto para el pase o la fase del proceso de evolución produjo una $F(2,216)=103,67$, $p<0,001$, indicando una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M=2,66$, $DE=0,22$), el noveno pase ($M=2,78$, $DE=0,09$) y el pase 16 ($M=2,96$, $DE=0,20$). En la Figura 3.43 se puede observar como el parámetro A aumenta con el pase de evolución cuando los híbridos crecen en mosto sintético a 25°C.

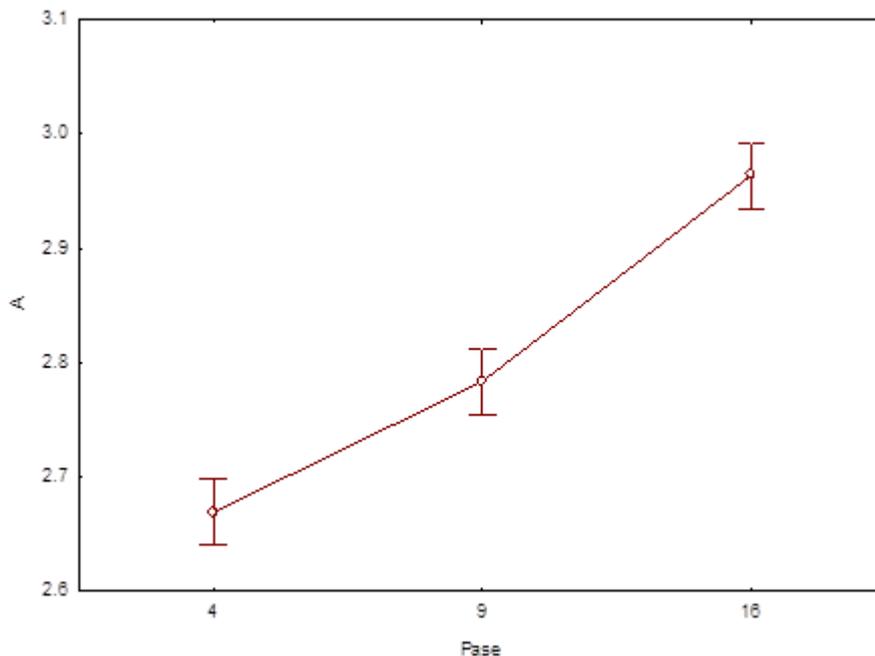


Figura 3.43. Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (Parámetro A) en mosto sintético a 25°C

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=2,804$, $p>0,05$, indicando que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=2,83$, $DE=0,19$), la línea 2 ($M=2,79$, $DE=0,23$) y la línea 3 ($M=2,79$, $DE=0,22$).

El ANOVA factorial también indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos, arrojando una $F(4, 216)=33,09$, $p<0,001$. En la Figura 3.44 se puede observar que existe una tendencia por parte de los híbridos de las tres condiciones evolutivas a aumentar el valor del parámetro A. Se puede observar un marcado aumento en la línea evolucionada a 25°C.

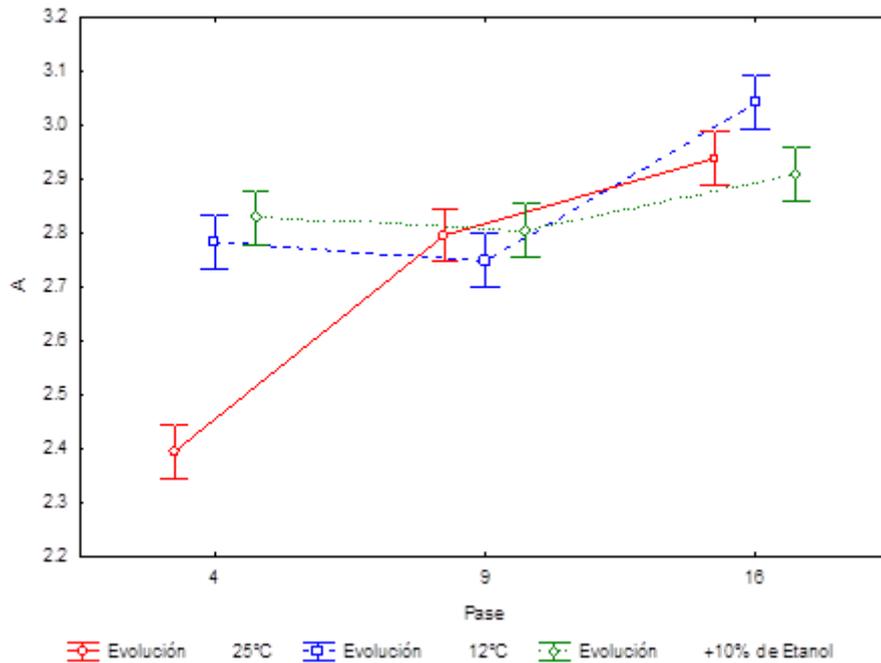


Figura 3.44. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) en mosto sintético a 25°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.6).

En la Figura 3.45 se muestra el efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) de los híbridos creciendo en mosto sintético a 25°C. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=3,9865$, $p<0,001$, lo cual indica que las variables de estudio efectivamente tienen influencia sobre la tasa de crecimiento de los híbridos evolucionados. Esta Figura 3.45 resume los efectos sobre el crecimiento máximo asintótico (parámetro A) que se describieron anteriormente.

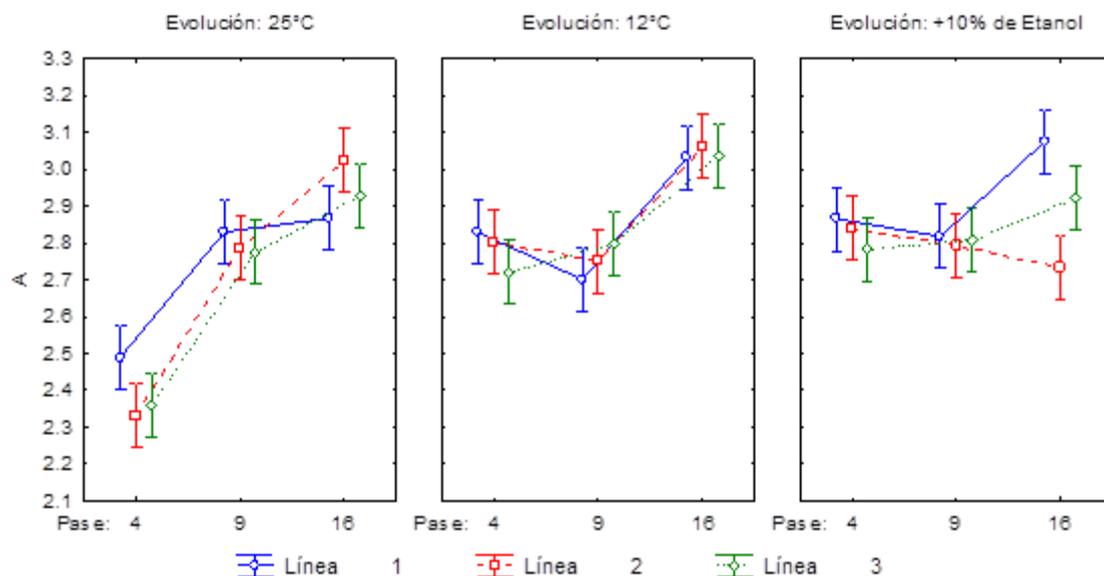


Figura 3.45. Valores determinados del crecimiento máximo asintótico (parámetro A) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos a en mosto sintético a 25°C.

b. Parámetro μ de híbridos caracterizados en mosto sintético a 25°C

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

En la Figura 3.46 se muestra la gráfica correspondiente al efecto principal para la condición de evolución, la cual produjo una razón $F(2,216)=28,881$, $p<0,001$, indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=0,243$, $DE=0,060$), GPY a 12°C ($M=0,263$, $DE=0,065$) y GPY a 25°C ($M=0,278$, $DE=0,073$).

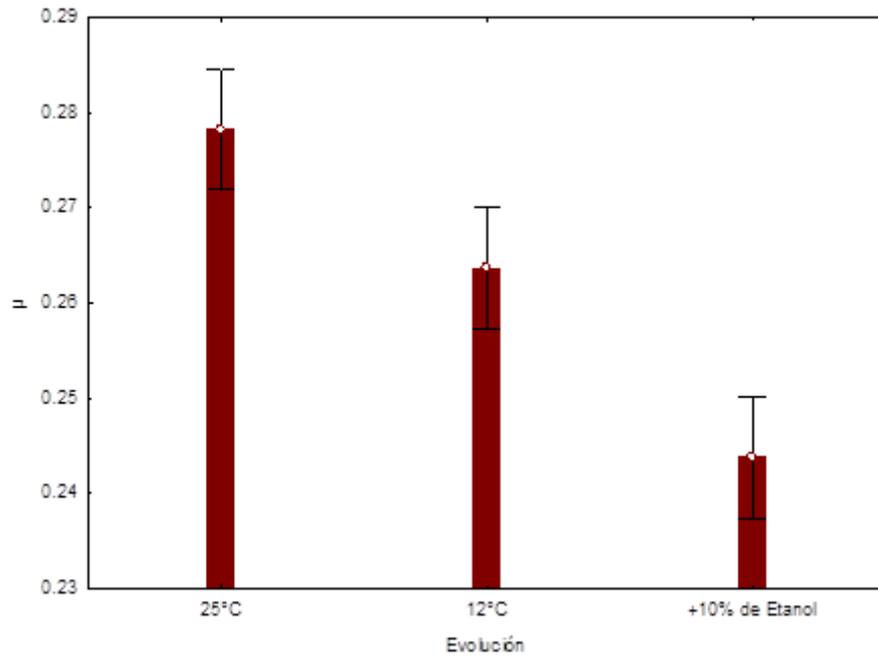


Figura 3.46. Efecto principal de la condición de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en mosto sintético a 25°C.

En la Figura 3.47 se muestra el efecto para el pase o la fase del proceso de evolución, la cual produjo una $F(2,216)=469,084$, $p<0,001$, indicando una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M=0,319$, $DE=0,047$), el noveno pase ($M=0,282$, $DE=0,030$) y el pase 16 ($M=0,184$, $DE=0,028$).

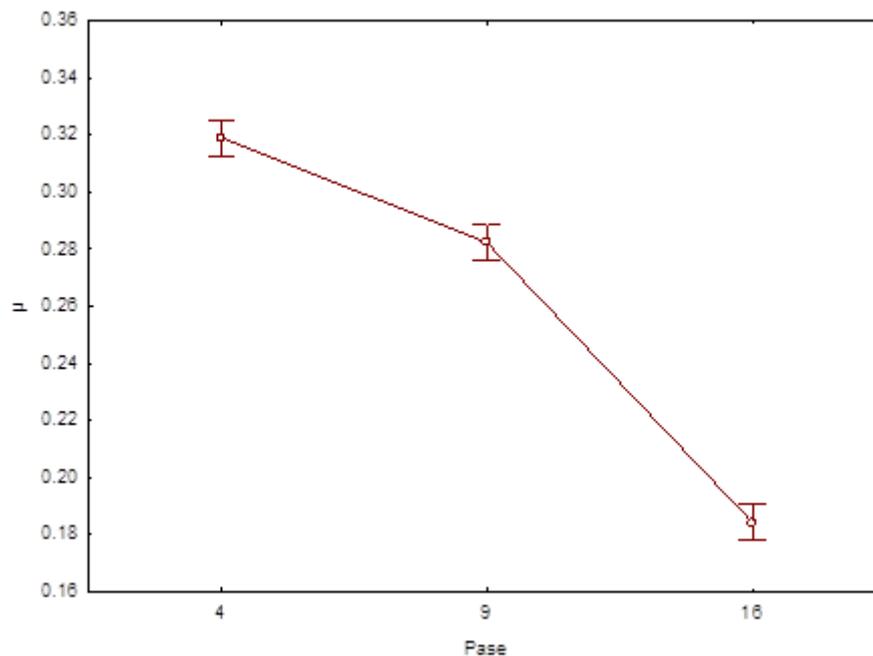


Figura 3.47. Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en mosto sintético a 25°C.

Capítulo 3

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=4,124$, $p>0,001$, indicando que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=0,263$, $DE=0,063$), la línea 2 ($M=0,254$, $DE=0,066$) y la línea 3 ($M=0,267$, $DE=0,072$).

El ANOVA factorial también indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos, arrojando una $F(4, 216)=9,1579$, $p<0,001$. En la Figura 3.48 se puede observar que existe una tendencia por parte de los híbridos de las tres condiciones evolutivas a disminuir la tasa de crecimiento máximo cuando los híbridos evolucionados crecen en mosto sintético a 25°C.

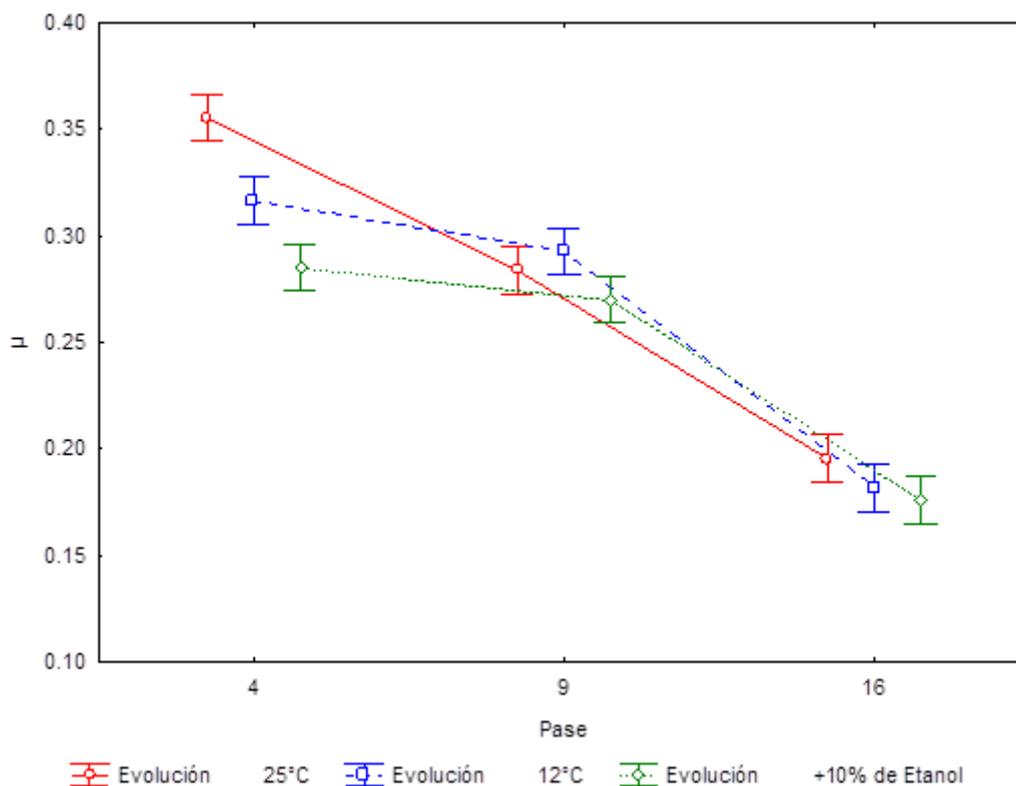


Figura 3.48. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) en mosto sintético a 25°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.6)

En la Figura 3.49 se muestra el efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre la tasa máxima de crecimiento (μ) de los híbridos creciendo en mosto

sintético a 25°C. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=5,7901$, $p<0,001$, lo cual indica que las variables de estudio efectivamente tienen influencia sobre la tasa de crecimiento de los híbridos evolucionados. Esta Figura 3.49 resume los efectos sobre μ que se describieron anteriormente.

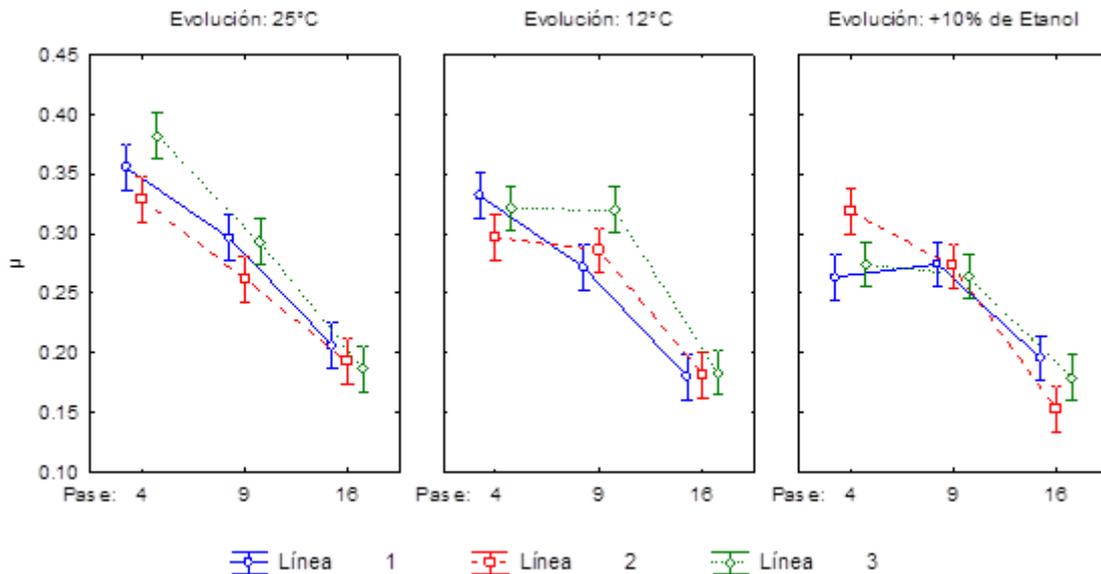


Figura 3.49. Tasa máxima de crecimiento (μ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en mosto sintético a 25°C.

c. Parámetro λ de híbridos caracterizados en mosto sintético a 25°C

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial sobre la influencia de tres variables independientes (Condición de Evolución, Pase o Fase en el proceso de evolución y línea de evolución) sobre la fase de latencia o de adaptación (λ). La condición de evolución incluyó tres niveles (las dos condiciones de estrés y la condición control), el pase de evolución incluyó tres niveles (pase 4, 9 y 16) y la línea de evolución incluyó tres niveles (Línea 1, 2 y 3). Todos los efectos fueron estadísticamente significativos con un nivel de significación $p=0,05$, excepto para la línea de evolución cuyo nivel de significación fue $p=0,001$.

El efecto principal para la condición de evolución produjo una razón $F(2,216)=4,916$, $p<0,05$, indicando una diferencia significativa entre la evolución en GPY adicionado con 10% de etanol ($M=2,69$, $DE=1,54$), GPY a 12°C ($M=3,165$, $DE=1,69$) y GPY a 25°C ($M=3,15$, $DE=1,56$). En la Figura 3.50

Capítulo 3

se puede observar como los híbridos evolucionados bajo la condición de estrés por etanol presentaron la fase de latencia más corta.

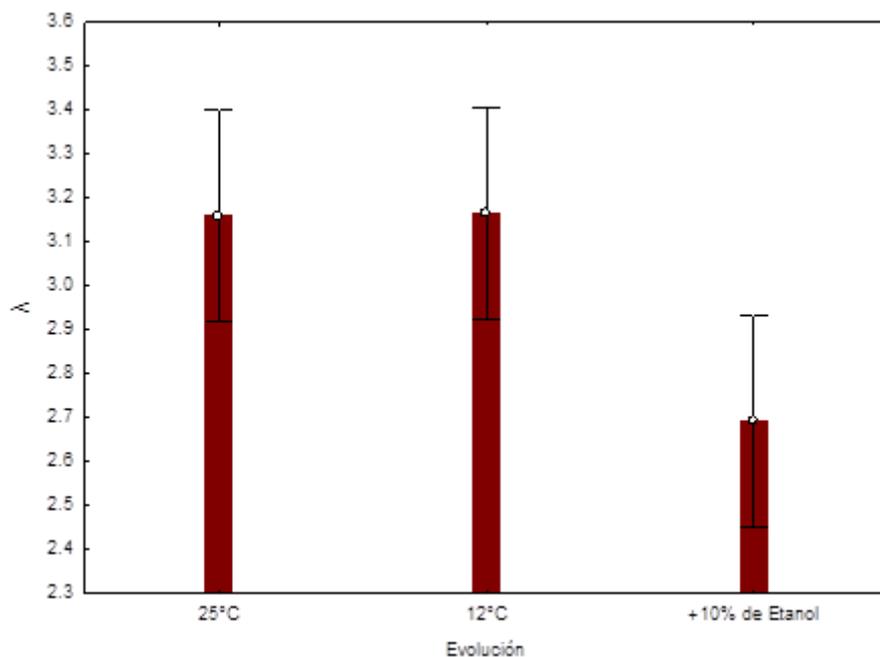


Figura 3.50. Efecto de la condición de evolución sobre la fase de latencia (λ) en mosto sintético a 25°C.

En la Figura 3.51 se muestra el efecto para el pase o la fase del proceso de evolución, cuya $F(2,216)=6,156$, $p<0,05$, indica una diferencia significativa entre el cuarto pase ($M=2,78$, $DE=1,73$), el noveno pase ($M=3,35$, $DE=1,28$) y el pase 16 ($M=2,87$, $DE=1,73$). No se observa una tendencia específica, ya que la fase de latencia aumenta en el pase 9 y disminuye en el pase 16.

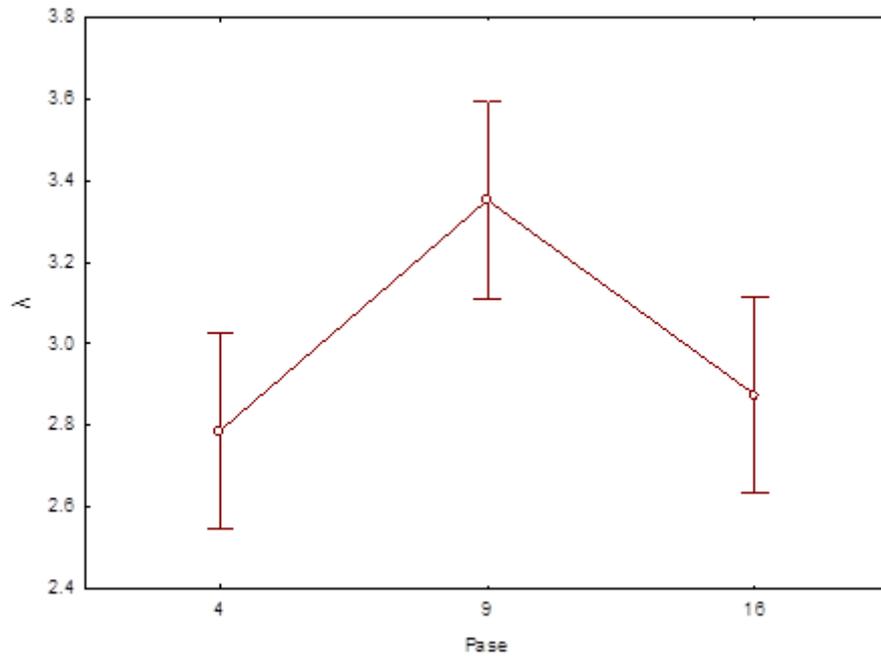


Figura 3.51. Efecto principal de la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en mosto sintético a 25°C.

El efecto de la línea de evolución produjo una $F(2,216)=0,554$, $p=>0,05$, indicando que no existe diferencia significativa entre la línea 1 ($M=2,90$, $DE=1,49$), la línea 2 ($M=3,01$, $DE=1,63$) y la línea 3 ($M=3,09$, $DE=1,70$).

El ANOVA factorial también indica un efecto de interacción entre la etapa del proceso de evolución (Pase) y la condición de evolución de los híbridos, arrojando una $F(4, 216)=42,786$, $p<0,001$. En la Figura 3.52 se puede observar que los híbridos que fueron evolucionados en GPY a 25°C, es decir, sin ningún tipo de estrés, muestran una disminución de la fase de latencia, mientras que los híbridos evolucionados en estrés por etanol y estrés por baja temperatura aumentaron la fase de latencia entre el pase 4 y el pase 9 y se mantuvieron sin cambios significativos entre los pases 9 y 16.

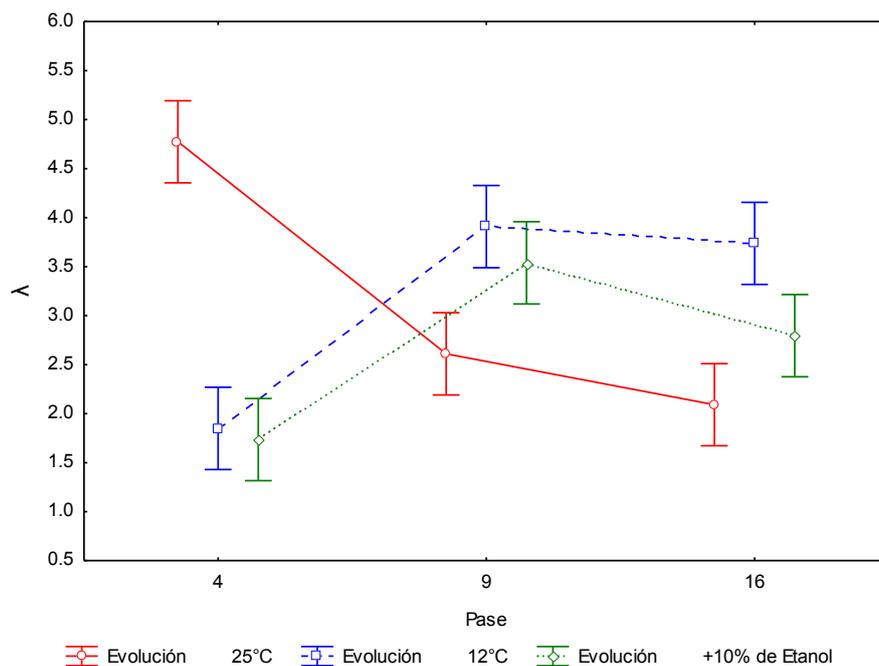


Figura 3.52. Efecto de interacción entre condición de evolución y la etapa de evolución (Pase) sobre la fase de latencia (λ) en mosto sintético a 25°C.

Además, se realizó un análisis post hoc (prueba de Tukey) para conocer qué niveles dentro de cada variable independiente eran significativos (Tabla 3.6).

En la Figura 3.53 se muestra el efecto de interacción entre la condición de evolución, la etapa en el proceso de evolución (Pase) y la línea de evolución sobre la fase de latencia (λ) de los híbridos creciendo en mosto sintético a 25°C. El efecto de interacción presenta una $F(4, 216)=9,478$, $p<0,001$, lo cual indica que las variables de estudio efectivamente tienen influencia sobre la fase de latencia (λ) de los híbridos evolucionados. Esta Figura 3.53 resume los efectos sobre λ que se describieron anteriormente.

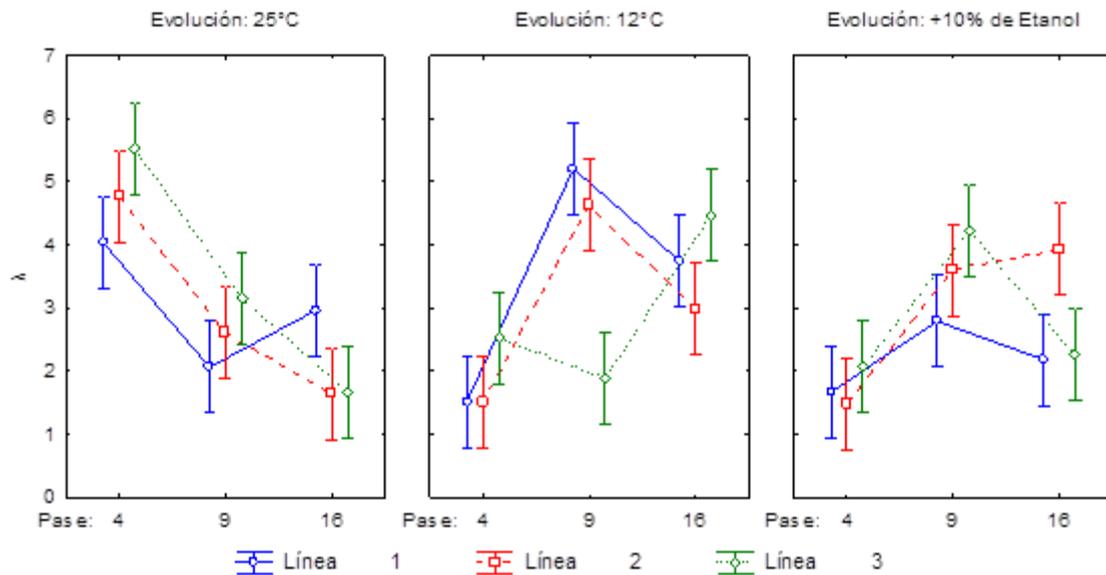


Figura 3.53. Fase de latencia (λ) de los híbridos estabilizados en los pases 4, 9 y 16, para las tres líneas de evolución y para cada estrés utilizado en la evolución (25°C, 12°C, 10% etanol) crecidos en mosto sintético a 25°C.

3.2 Conclusiones

En este capítulo construimos un híbrido interespecífico entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* mediante la técnica de *rare mating*. Posteriormente sometimos ese híbrido a un proceso de evolución artificial bajo tres condiciones diferentes, en presencia de altas concentraciones de etanol (10%), crecimiento a bajas temperaturas (12°C) y en condiciones de crecimiento de laboratorio (sin ningún estrés). A lo largo de la estabilización se realizó una caracterización molecular mediante diferentes marcadores y se determinaron que todos los híbridos presentaban el mismo patrón, observando en la mayoría de los casos una copia de cada parental. Sin embargo, resulta interesante destacar que en el cromosoma I se observa, una recombinación de manera que una parte del cromosoma tiene la secuencia de *S. cerevisiae* y otra parte de *S. kudriavzevii*. Otro dato interesante corresponde a los cromosomas V y XIII donde se obtuvieron bandas no observadas en los parentales, indicando cambios en su genoma a lo largo de la evolución.

Se puede observar como a medida que avanza el proceso evolutivo, aumenta el crecimiento máximo asintótico para los híbridos evolucionados a bajas temperaturas y disminuye para los híbridos evolucionados en condiciones

Capítulo 3

de estrés por etanol y para aquellos que fueron evolucionados sin ningún tipo de estrés.

Respecto a la tasa máxima de crecimiento (μ), se observa lo contrario que para el valor de A, a medida que avanza el proceso evolutivo, claramente disminuye la máxima tasa de crecimiento para los híbridos evolucionados en condiciones de estrés por etanol y aquellos que fueron evolucionados sin ningún tipo de estrés, mientras que para los híbridos evolucionados a 12°C existe una disminución entre el pase 4 y el 9, seguida de un aumento entre el pase 9 y el pase 16, indicando una mejora en el crecimiento a lo largo de la evolución en todos los crecimientos excepto en presencia de etanol. Respecto a la caracterización de todos los híbridos en presencia de un 10% de etanol, se observa un aumento entre el pase 4 y el pase 9 y posteriormente disminuye en el pase 16, es decir una pérdida de capacidad de crecimiento. Este resultado puede deberse al alto estrés que supone para las levaduras esta condición de crecimiento.

Por último, respecto a la fase de latencia (λ) o de adaptación fue significativamente menor para las cepas evolucionadas a baja temperatura que para las cepas evolucionadas bajo condición de estrés por etanol y sin ningún tipo de estrés. Por lo tanto, la estabilización o evolución de los híbridos a bajas temperaturas, tiene como mecanismo de adaptación una disminución de la fase de latencia en todas las condiciones de crecimiento ensayadas.

DISCUSIÓN

Discusión

En los últimos años, se han realizado muchos esfuerzos para estudiar los híbridos de levadura. Un aspecto importante de estas levaduras especiales es que han mostrado propiedades interesantes, que son útiles para usos industriales, como la vinificación. Por otra parte, la construcción de híbridos artificiales ha abierto una nueva era para generar nuevos iniciadores de levadura, ya que permite la generación de nuevas cepas no-OGM con características beneficiosas proporcionadas por los padres o para mejorar las cepas *bona fide* en aspectos débiles específicos.

A pesar de todos los estudios realizados (para una revisión ver Pérez-Torrado et al., 2017), queda una pregunta abierta: ¿Cómo interactúan los dos genomas para generar el resultado fenotípico final? En este trabajo, nos centramos en el estudio de cepas híbridas naturales *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, y su capacidad para crecer a baja temperatura. Después de analizar la activación de los genes marcadores de estrés por frío, observamos que las cepas con un μ mayor a la temperatura más baja mostraron significativamente más activación del alelo *S. kudriavzevii* en comparación con el alelo *S. cerevisiae*.

Esto sugiere que algunas cepas híbridas, aisladas de regiones de clima frío y con un origen común (Peris et al., 2012c; Peris et al., 2018), han evolucionado para adaptarse a ambientes de baja temperatura reajustando la regulación de la expresión génica de los promotores *S. kudriavzevii*, especialmente los marcadores de estrés por frío (Combina et al., 2012; Tronchoni et al., 2014). Una observación intrigante fue que, a pesar de la relación observada con la contribución del alelo *S. kudriavzevii* a μ en las cepas más criofílicas, son propensas a perder partes de *S. kudriavzevii* mientras mantienen la mayor parte del genoma de *S. cerevisiae* (Pérez-Torrado et al., 2017).

Nuestra hipótesis es que este efecto podría ser una consecuencia de las restricciones genéticas generadas durante el origen genético de los híbridos que limitan los niveles de ciertos factores de transcripción, que afectan genes

Discusión

esenciales. Otro aspecto importante de la adaptación de híbridos naturales a baja temperatura es el contenido relativo de las especies criófilas *S. kudriavzevii* en sus composiciones genómicas. Observamos una correlación negativa interesante entre λ y el porcentaje del genoma de *S. kudriavzevii* presente en la cepa híbrida, lo que indica que el genoma de *S. kudriavzevii* contribuye a una mejor adaptación al estrés por frío. Un estudio previo (Oliveira et al., 2014; Paget et al., 2014; Tronchoni et al., 2014) ha sugerido que otro mecanismo de adaptación a ambientes de baja temperatura ocurre en híbridos naturales durante su historia de vida genética.

Los híbridos que evolucionan bajo presión de estrés por frío tienden a mantener los alelos *S. kudriavzevii*, mientras que los aquellos sin estrés por frío tienden a perderlos. Una pregunta interesante es por qué la composición genómica afecta más a λ , mientras que μ depende más de la contribución de diferentes alelos a la expresión génica. Esto requerirá más investigación, pero una hipótesis inicial que proponemos es que los genes relacionados con el crecimiento, como el metabolismo central del carbono, como GPD1, necesitan una regulación ajustada para realizar una función optimizada y coordinada. Esto podría hacerse adaptando los niveles de diferentes alelos, mientras que la consecuencia presencia/ausencia de reorganización genómica es menos precisa.

Este conocimiento puede ser muy interesante para aplicaciones industriales, especialmente para optimizar y comprender una de las técnicas que ha atraído más atención en últimos años en biotecnología industrial aplicada: generación de nuevos iniciadores por hibridación artificial. Estudios recientes han sugerido que los híbridos artificiales tienden a mantener al menos una copia de cada genoma parental (Pérez-Través et al., 2014).

A la luz de nuestros datos, esto sugiere que los híbridos artificiales podrían ser más eficientes para ajustar μ en la condición deseada. Sin embargo, el proceso de estabilización utilizado para la generación artificial de híbridos se produce después de unas pocas generaciones, mientras que los híbridos naturales han evolucionado durante miles de años.

Por otro lado, en la caracterización enológica de los híbridos naturales *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* realizada en el presente trabajo mediante el análisis de las cinéticas de fermentación de los azúcares residuales, los principales metabolitos y aromas producidos, indicó que algunas de estas cepas híbridas muestran un mejor rendimiento en fermentaciones vínicas a baja temperatura y que son candidatos importantes a utilizarse como cultivos iniciadores en ciertas fermentaciones, especialmente en vinos blancos fermentados a baja temperatura (Molina et al., 2007). Además, los híbridos CECT11002 y SPG172 destacan debido al buen perfil aromático de los vinos producidos.

Debe notarse que los híbridos fueron los primeros en consumir el 50% de los azúcares presentes en el mosto sintético, en comparación con las cepas control *S. cerevisiae* T73 (representante de las levaduras vínicas) y *S. kudriavzevii* CR85 (una de las especies mejor adaptadas al crecimiento a baja temperatura) (Pérez-Torrado et al., 2018). Entre los híbridos vínicos que tardan más tiempo para terminar la fermentación, encontramos a PB7, un híbrido tetraploide aislado del norte de España (León) y AMH de Alemania, el cual, comparado con el resto de los híbridos, tiene el contenido más bajo de *S. kudriavzevii* en su genoma.

Cuando comparamos la tasa máxima de consumo de azúcares (m), observamos que la cepa más lenta fue CECT1388, una cepa que se aisló de la cerveza, presentando un valor promedio de tasa máxima de consumo de azúcares de $0.28 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. También es importante notar que las cepas *S. cerevisiae* T73 y *S. kudriavzevii* CR85 están entre las cepas con la m más baja, junto con los híbridos AMH y PB7. De la misma forma que en el caso anterior, no es posible establecer una relación entre la fuente de aislamiento y el comportamiento de este parámetro, debido a que encontramos bajas tasas de consumo de azúcares tanto para cepas vínicas como para cepas cervecera, aunque es importante el hecho de que dos cepas vínicas con baja tasa de consumo de azúcares, presentan características especiales tal como se indicó anteriormente.

Discusión

Con respecto a la fase de latencia (λ) nuestros resultados muestran una fase de latencia más corta para la mayoría de los híbridos naturales que para *S. cerevisiae* T73 y *S. kudriavzevii* CR85, indicando una mejor adaptación para fermentar a baja temperatura.

Una interesante e inesperada correlación ha sido encontrada entre los perfiles de consumo de azúcares más rápidos y la cantidad de alcoholes superiores y ésteres producidos durante la fermentación vínica a través de la ruta de Ehrlich. La formación de estos compuestos está relacionada al balance redox dentro de las células de levadura (Margalit 2004; Pretorius y Lambrechts, 2000). Por ello, una posible explicación es que las células que consumen lentamente los azúcares, tienen más tiempo para diversificar el balance redox con otras rutas compensatorias que atraen menor flujo metabólico que la ruta de Ehrlich, como la ruta de las pentosas fosfato (Cadiere et al., 2011). Será necesario realizar estudios metabólicos específicos para probar esta hipótesis y revelar la base metabólica de este hallazgo.

CONCLUSIONES

1. Los resultados mostraron diferencias significativas en la adaptación a bajas temperaturas de los híbridos naturales *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, observando las mayores diferencias en el crecimiento a 8°C, estando los híbridos vínicos mejor adaptados que los no vínicos.
2. Los híbridos naturales presentan a bajas temperaturas menores tasas de crecimiento (μ) que el parental *S. kudriavzevii*, pero mayor que el parental *S. cerevisiae*. No se pudo observar una correlación entre este valor y la fuente de aislamiento, vínico o cervecero.
3. También respecto a la fase de latencia (λ), los híbridos requieren un mayor tiempo de adaptación a bajas temperaturas (8 y 12 °C) que el parental *S. kudriavzevii*. Por lo tanto los datos indican que esta especie está mejor adaptada a fermentar a bajas temperaturas que los híbridos. Tampoco la fase de latencia se relaciona con el origen de aislamiento. Los híbridos que mostraron menor λ fueron dos aislados vínicos suizos, SPG319 y SPG14-91, y uno cervecero, CECT1103.
4. Sin embargo, en los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* sí se ha observado una correlación entre la adaptación a las bajas temperaturas y el contenido genómico proveniente del parental *S. kudriavzevii*, lo que confirma la importante contribución del parental *S. kudriavzevii* en la adaptación a bajas temperaturas de estos híbridos.
5. Nuestros resultados mostraron que las cepas con una mayor tasa de crecimiento a 8°C presentaban una mayor relación de expresión de los alelos *S. kudriavzevii* que de los alelos *S. cerevisiae* para los genes *NSR1*, *GPD1* y *GUT2*, marcadores de estrés por frío en la especie *S. kudriavzevii*.
6. La caracterización enológica en fermentaciones con mosto sintético a baja temperatura, mostró un mejor comportamiento de los híbridos naturales *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* que sus parentales, tanto en lo que respecta a la cinética de consumo de azúcares como en la menor fase de latencia.
7. Entre los híbridos, los que más tiempo requirieron para finalizar la fermentación se encuentran los no vínicos, pero curiosamente también

Conclusiones

los aislados vínicos AMH y PB7. Cabe destacar que el híbrido AMH, es un híbrido tetraploide que presenta el menor contenido en su genoma de la especie *S. kudriavzevii*, y que PB7 también es un híbrido tetraploide, que además pertenece a un linaje único, diferente a los de los restantes híbridos vínicos.

8. En la presente tesis, se puso a punto con éxito una nueva metodología de obtención de híbridos artificiales basada en la utilización de plásmidos de resistencia a antibióticos como marcadores de selección. Una vez obtenidos los híbridos se forzó la pérdida de los plásmidos, por lo que los híbridos resultantes no presentan ningún tipo de mutación marcadora.
9. Los híbridos artificiales se estabilizaron y evolucionaron en las condiciones de estrés en las que sus parentales presentan ventajas: en presencia de etanol, por la tolerancia aportada por el parental *S. cerevisiae*, y a baja temperatura, a la que está adaptado el parental *S. kudriavzevii*.
10. Los híbridos artificiales evolucionados a baja temperatura se adaptaron mejor que los evolucionados en etanol o los evolucionados sin estrés. Así, presentaron una mayor tasa máxima de crecimiento y una menor latencia en la mayoría de las condiciones de crecimiento ensayadas.
11. También, se pudo observar como a medida que avanza el proceso de evolución aumenta el crecimiento máximo asintótico para los híbridos evolucionados a bajas temperaturas, pero disminuye para los restantes híbridos, los evolucionados en presencia de etanol y los evolucionados sin ningún tipo de estrés.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, J., Randez-Gil, F., Prieto, J.A., 2007. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: New functions for old mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 327-341. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00066.x
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 17-22.
- 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. *Mol. Ecol.* 24, 5412-5427. doi:10.1111/mec.13341
- Almeida, P., Gonçalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., Durrrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., Todd Hittinger, C., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., 2014. A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nat. Commun.* 5, 4044. doi:10.1038/ncomms5044
- Alonso-del-Real, J., Contreras-Ruiz, A., Castiglioni, G.L., Barrio, E., Querol, A., 2017a. The Use of Mixed Populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* to Reduce Ethanol Content in Wine: Limited Aeration, Inoculum Proportions, and Sequential Inoculation. *Front. Microbiol.* 8, 2087. doi:10.3389/fmicb.2017.02087
- Alonso-del-Real, J., Lairón-Peris, M., Barrio, E., Querol, A., 2017b. Effect of Temperature on the Prevalence of *Saccharomyces Non cerevisiae* Species against a *S. cerevisiae* Wine Strain in Wine Fermentation: Competition, Physiological Fitness, and Influence in Final Wine Composition. *Front. Microbiol.* 8, 150. doi:10.3389/fmicb.2017.00150
- Amerine, M.A., Berg, P., Kunkee, R.E., Ough, C.S., Singleton, V.L., Webb, A.D., 1980. The technology of wine making 794.
- Antunovics, Z., Nguyen, H., Gaillardin, C., Sipiczki, M., 2005. Gradual genome stabilisation by progressive reduction of the genome in an interspecific hybrid with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 5, 1141-1150. doi:10.1016/j.femsyr.2005.04.008
- Arroyo-López, F.N., Orlić, S., Querol, A., Barrio, E., 2009. Effects of temperature, pH

Bibliografía

- and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 120-127. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035
- Arroyo-López, F.N., Pérez-Torrado, R., Querol, A., Barrio, E., 2010. Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. *Food Microbiol.* 27, 628-637. doi:10.1016/j.fm.2010.02.001
- Attfield, P. V., Bell, P.J.L., 2003. Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 17-55. doi:10.1007/3-540-37003-X_2
- Bakalinsky, A.T., Snow, R., 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 367-382. doi:10.1002/yea.320060503
- Bardwell, L., 2005. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 26, 339-350. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2004.10.002
- Barre, P., Blondin, B., Dequin, S., Feuillat, M., Sablayrolles, J.M., Salmon, J.M., 1998. La levure de fermentation alcoolique., en: Flanzy, C. (Ed.), *Oenologie: Fondements scientifiques et technologiques*. Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 454-497.
- Barre, P., Vézinhel, F., Dequin, S., Blondin, B., 1993. Genetic improvement of wine yeast, en: Fleet G.H., E. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Singapore, pp. 421-447.
- Barrio, E., González, S.S., Arias, A., Belloch, C., Querol, A., 2006. Molecular Mechanisms Involved in the Adaptive Evolution of Industrial Yeasts, en: *Yeasts in Food and Beverages*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 153-174. doi:10.1007/978-3-540-28398-0_6
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E., Querol, A., 2008. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 188-195. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.083
- Belloch, C., Pérez-Torrado, R., González, S.S., Pérez-Ortín, J.E., García-Martínez, J.,

- Querol, A., Barrio, E., 2009. Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2534-44. doi:10.1128/AEM.02282-08
- Beltran, G., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2007. Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 809-815. doi:10.1007/s11274-006-9302-6
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A., 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287-293. doi:10.1078/0723-2020-00097
- Bely, M., Rinaldi, A., Dubourdieu, D., 2003. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 507-512. doi:10.1016/S1389-1723(04)70141-3
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E., 1996. *Principles and Practices of Winemaking*. Springer US.
- Boynton, P.J., Greig, D., 2014. The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast* 31, n/a-n/a. doi:10.1002/yea.3040
- Bui, K., Dick, R., Moulin, G., Galzy, P., 1986. A Reverse Osmosis for the Production of Low Ethanol Content Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 297-300.
- Butler, G., 2010. Fungal sex and pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* doi:10.1128/CMR.00053-09
- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C., Wolfe, K.H., 2004. Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 1632-1637. doi:10.1073/pnas.0304170101
- Cadière, A., Ortiz-Julien A., Camarasa, C., Dequin, S., 2011. Evolutionary Engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. *Metab Eng* 13: 263-271.
- Cadière, A., Aguera, E., Caillé, S., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2012. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution. *Food Microbiol.* 32, 332-337. doi:10.1016/j.fm.2012.07.010

Bibliografía

- Carrasco, P., Querol, A., Del Olmo, M., 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch. Microbiol.* 175, 450-457.
- Catarino, M., Mendes, A., 2011. Dealcoholizing wine by membrane separation processes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12, 330-337. doi:10.1016/J.IFSET.2011.03.006
- Chambers, P.J., Bellon, J.R., Schmidt, S.A., Varela, C., Pretorius, I.S., 2009. Non-Genetic Engineering Approaches for Isolating and Generating Novel Yeasts for Industrial Applications, en: *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 433-457. doi:10.1007/978-1-4020-8292-4_20
- Coloretti, F., Zambonelli, C., Tini, V., 2006. Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiol.* 23, 672-676. doi:10.1016/j.fm.2005.11.002
- Conant, G.C., Wolfe, K.H., 2007. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 3, 129. doi:10.1038/msb4100170
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C., 2014. Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1670-1678. doi:10.1128/AEM.03780-13
- Cosma, M.P., 2004. Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO Rep.* 5, 953-7. doi:10.1038/sj.embor.7400251
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D., 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 130-135. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.016
- Daudt, C.E., Ough, C.S., 1980. A Method for Detecting Volatile Amines in Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 31, 356-359.
- de Barros Lopes, M., Bellon, J.R., Shirley, N.J., Ganter, P.F., 2002. Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res.* 1, 323-31.
- Degre, R., 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria, en:

- Fleet, G.H.E. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic., Chur, Switzerland, pp. 421-447.
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J.-L., Le Jeune, C., 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1140-1148. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02394.x
- Dequin, S., Barre, P., 1994. Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH. *Biotechnology*. (N. Y). 12, 173-7.
- Diban, N., Arruti, A., Barceló, A., Puxeu, M., Urriaga, A., Ortiz, I., 2013. Membrane dealcoholization of different wine varieties reducing aroma losses. Modeling and experimental validation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 20, 259-268. doi:10.1016/J.IFSET.2013.05.011
- Diban, N., Athes, V., Bes, M., Souchon, I., 2008. Ethanol and aroma compounds transfer study for partial dealcoholization of wine using membrane contactor. *J. Memb. Sci.* 311, 136-146. doi:10.1016/J.MEMSCI.2007.12.004
- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., Zhang, K., 2009. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 253-263. doi:10.1007/s00253-009-2223-1
- Dujon, B., 2010. Yeast evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet.* 11, 512-524. doi:10.1038/nrg2811
- Dujon, B., 2005. Homing Endonucleases and the Yeast Mitochondrial ω Locus — A Historical Perspective, en: *Homing Endonucleases and Inteins*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 11-31. doi:10.1007/3-540-29474-0_2
- Dunn, B., Paulish, T., Stanbery, A., Piotrowski, J., Koniges, G., Kroll, E., Louis, E.J., Liti, G., Sherlock, G., Rosenzweig, F., 2013. Recurrent Rearrangement during Adaptive Evolution in an Interspecific Yeast Hybrid Suggests a Model for Rapid Introgression. *PLoS Genet.* 9, e1003366. doi:10.1371/journal.pgen.1003366
- Dunn, B., Sherlock, G., 2008. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res.* 18, 1610-23. doi:10.1101/gr.076075.108

Bibliografía

- Erny, C., Raoult, P., Alais, A., Butterlin, G., Delobel, P., Matei-Radoi, F., Casaregola, S., Legras, J.L., 2012. Ecological Success of a Group of *Saccharomyces cerevisiae*/*Saccharomyces kudriavzevii* Hybrids in the Northern European Wine-Making Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3256-3265. doi:10.1128/AEM.06752-11
- Fabre, E., Muller, H., Therizols, P., Lafontaine, I., Dujon, B., Fairhead, C., 2005. Comparative Genomics in Hemiascomycete Yeasts: Evolution of Sex, Silencing, and Subtelomeres. *Mol. Biol. Evol.* 22, 856-873. doi:10.1093/molbev/msi070
- Fay, J.C., Benavides, J.A., 2005. Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1, e5. doi:10.1371/journal.pgen.0010005
- Feldmann, H., Branduardi, P., 2012. *Yeast: molecular and cell biology*. Wiley-Blackwell.
- Fernandez-Espinar, M.T., Lopez, V., Ramon, D., Bartra, E., Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 1-10.
- Fisher, K.J., Lang, G.I., 2016. Experimental evolution in fungi: An untapped resource. *Fungal Genet. Biol.* 94, 88-94. doi:10.1016/J.FGB.2016.06.007
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y., Postlethwait, J., 1999. Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations. *Genetics* 151.
- Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., Belloch, C., 2013. Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1405-1414. doi:10.1111/jam.12126
- Gangl, H., Batusic, M., Tscheik, G., Tiefenbrunner, W., Hack, C., Lopandic, K., 2009. Exceptional fermentation characteristics of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *N. Biotechnol.* 25, 244-251. doi:10.1016/j.nbt.2008.10.001
- García-Martín, N., Perez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., Mihnea, M., González-Sanjosé, M.L., Palacio, L., Prádanos, P., Hernández, A., 2010. Sugar reduction in musts with nanofiltration membranes to obtain low

- alcohol-content wines. Sep. Purif. Technol. 76, 158-170. doi:10.1016/J.SEPPUR.2010.10.002
- Gardner, N., Rodrigue, N., Champagne, C.P., 1993. Combined Effects of Sulfites, Temperature, and Agitation Time on Production of Glycerol in Grape Juice by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 2022-2028.
- Gómez-Plaza, E., López-Nicolás, J., López-Roca, J., Martínez-Cutillas, A., 1999. Dealcoholization of Wine. Behaviour of the Aroma Components during the Process. J. Food Eng. 32, 384-386. doi:10.1006/FSTL.1999.0565
- 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. doi:10.1016/J.TIFS.2012.06.015
- González, S.S., Barrio, E., Gafner, J., Querol, A., 2006. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. FEMS Yeast Res. 6, 1221-1234. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00126.x
- González, S.S., Barrio, E., Querol, A., 2008. Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2314-2320. doi:10.1128/AEM.01867-07
- González, S.S., Gallo, L., Climent, M.D., Barrio, E., Querol, A., 2007. Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. Int. J. Food Microbiol. 116, 11-18. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.10.047
- Greetham, D., Wimalasena, T.T., Leung, K., Marvin, M.E., Chandelia, Y., Hart, A.J., Phister, T.G., Tucker, G.A., Louis, E.J., Smart, K.A., 2014. The genetic basis of variation in clean lineages of *Saccharomyces cerevisiae* in response to stresses encountered during bioethanol fermentations. PLoS One 9, e103233. doi:10.1371/journal.pone.0103233
- Greig, D., 2002. Hybrid Speciation in Experimental Populations of Yeast. Science (80). 298, 1773-1775. doi:10.1126/science.1076374
- Groth, C., Hansen, J., Pi5kur, J., 1999. A natural chimeric yeast containing genetic

Bibliografía

- material from three species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1933-1.
- Guijo, S., Mauricio, J.C., Salmon, J.M., Ortega, J.M., 1997. Determination of the Relative Ploidy in Different *Saccharomyces cerevisiae* Strains used for Fermentation and 'Flor' Film Ageing of Dry Sherry-type Wines. *Yeast* 13, 101-117. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199702)13:2<101::AID-YEA66>3.0.CO;2-H
- Guillamon, J.M., Barrio, E., Huerta, T., Querol ' ", A., 1994. Rapid Characterization of Four Species of the *Saccharomyces Sensu Stricto* Complex According to Mitochondria1 DNA Patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 708-714.
- Guillamón, J.M., Barrio, E., Querol, A., 1996. Characterization of Wine Yeast Strains of the *Saccharomyces* Genus on the Basis of Molecular Markers: Relationships Between Genetic Distance and Geographic or Ecological Origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 122-132. doi:10.1016/S0723-2020(96)80019-1
- Gunge, N., Nakatomi, Y., 1972. Genetic Mechanisms of Rare Matings of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Heterozygous for Mating Type. *Genetics* 70, 41-58.
- Hammond, J., 2003. *Yeast Genetics*, en: I, C. (Ed.), Priest FG. New York, pp. 67-112.
- Heitman, J., Kronstad, J.W., Taylor, J.W., Casselton, L.A., 2007. Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications. *Sex fungi Mol. Determ. Evol. Implic.*
- Henriques, D., Alonso-del-Real, J., Querol, A., Balsa-Canto, E., 2018. *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* Synthetic Wine Fermentation Performance Dissected by Predictive Modeling. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00088
- Heresztyn, T. (1987), 1987. Conversion of glucose to gluconic acid by glucose oxidase enzyme in Muscat Gordo juice. *Aust. Grapegrow. Winemak.* 25-27.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., Cabezudo, M.D., 1990. The Influence of the Yeast and Type of Culture on the Volatile Composition of Wines Fermented Without Sulfur Dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 41.
- Herskowitz, I., 1989. A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* 342, 749-757. doi:10.1038/342749a0

- Herskowitz, I., 1988. Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 536-553.
- Honigberg, S.M., Purnapatre, K., 2003. Signal pathway integration in the switch from the mitotic cell cycle to meiosis in yeast. *J. Cell Sci.* 116, 2137-2147.
- Hughes, T.R., Roberts, C.J., Dai, H., Jones, A.R., Meyer, M.R., Slade, D., Burchard, J., Dow, S., Ward, T.R., Kidd, M.J., Friend, S.H., Marton, M.J., 2000. Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat. Genet.* 25, 333-337. doi:10.1038/77116
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., Jimenez, J., 1997. American journal of enology and viticulture., *American Journal of Enology and Viticulture*. American Society of Enologists.
- Johnson, A.D., 1995. Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 552-8.
- Jones, S.K., Bennett, R.J., 2011. Fungal mating pheromones: Choreographing the dating game. *Fungal Genet. Biol.* 48, 668-676. doi:10.1016/J.FGB.2011.04.001
- Kellis, M., Birren, B.W., Lander, E.S., 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428, 617-624. doi:10.1038/nature02424
- Knop, M., 2011. Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. *C. R. Biol.* 334, 599-606. doi:10.1016/J.CRVI.2011.05.007
- Knop, M., 2006. Evolution of the hemiascomycete yeasts: on life styles and the importance of inbreeding. *BioEssays* 28, 696-708. doi:10.1002/bies.20435
- Kozul, R., Dujon, B., Fischer, G., 2006. Stability of Large Segmental Duplications in the Yeast Genome. *Genetics* 172, 2211-2222. doi:10.1534/genetics.105.048058
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., Gibson, B., 2017. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 65-78. doi:10.1007/s00253-016-8007-5
- Kurtzman, C.P., 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new

Bibliografía

- genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Res.* 4, 233-245. doi:10.1016/S1567-1356(03)00175-2
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 1998. *The yeasts: a taxonomic study*, 4th ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kutyna, D.R., Varela, C., Stanley, G.A., Borneman, A.R., Henschke, P.A., Chambers, P.J., 2012. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1175-1184. doi:10.1007/s00253-011-3622-7
- 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 Sci. Technol.* 42, 1390-1395. doi:10.1016/J.LWT.2009.03.008
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma -A Review. *South African J. Enol. Vitic.* 21, 97-129.
- Le Jeune, C., Lollier, M., Demuyter, C., Erny, C., Legras, J.-L., Aigle, M., Masneuf-Pomarède, I., 2007. Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Res.* 7, 540-549. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00207.x
- 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. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x
- Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14539-44. doi:10.1073/pnas.1105430108
- 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.T., van Oudenaarden, A., Barton, D.B.H., 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*

458, 337-41. doi:10.1038/nature07743

Llorente, B., Durrens, P., Malpertuy, A., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M., Bon, E., Brottier, P., Casaregola, S., Dujon, B., de Montigny, J., Lépingle, A., Neuvéglise, C., Ozier-Kalogeropoulos, O., Potier, S., Saurin, W., Tekaia, F., Toffano-Nioche, C., Wésolowski-Louvel, M., Wincker, P., Weissenbach, J., Souciet, J., Gaillardin, C., 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 20. Evolution of gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 487, 122-33.

Loira, I., Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J.A., 2012. Selection of Glycolytically Inefficient Yeasts for Reducing the Alcohol Content of Wines from Hot Regions. *Food Bioprocess Technol.* 5, 2787-2796. doi:10.1007/s11947-011-0604-9

Lopandic, K., Gangl, H., Wallner, E., Tscheik, G., Leitner, G., Querol, A., Borth, N., Breitenbach, M., Prillinger, H., Tiefenbrunner, W., 2007. Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res.* 7, 953-965. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00240.x

Lopes, C.A., Barrio, E., Querol, A., 2010. Natural hybrids of *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* share alleles with European wild populations of *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res.* 10, 412-421. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00614.x

López-Malo, M., García-Rios, E., Melgar, B., Sanchez, M.R., Dunham, M.J., Guillamón, J.M., 2015. Evolutionary engineering of a wine yeast strain revealed a key role of inositol and mannoprotein metabolism during low-temperature fermentation. *BMC Genomics* 16, 537. doi:10.1186/s12864-015-1755-2

Lynch, M., Force, A., 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154, 459-73.

Madhani, H., 2007. *From a to Alpha: Yeast as a Model for Cellular Differentiation*. New York. Cold Spring Harb. Lab. Press.

Malherbe, D.F., Toit, M., Cordero Otero, R.R., Rensburg, P., Pretorius, I.S., 2003. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces*

Bibliografía

- cerevisiae and its potential applications in wine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 502-511. doi:10.1007/s00253-002-1208-0
- Margalit, Y., 2004. *Concepts in Wine Chemistry* (2da ed.). (J. Crum, Ed.) San Francisco: The wine Appreciation Guild.
- Martínez, P., Codón, A.C., Pérez, L., Benítez, T., 1995. Physiological and molecular characterization of flor yeasts: Polymorphism of flor yeast populations. *Yeast* 11, 1399-1411. doi:10.1002/yea.320111408
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., 2010. Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 79-86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.038
- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., Dubourdieu, D., 1998. New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3887-92.
- Massot, A., Mietton-Peuchot, M., Peuchot, C., Milisic, V., 2008. Nanofiltration and reverse osmosis in winemaking. *Desalination* 231, 283-289. doi:10.1016/J.DESAL.2007.10.032
- Merlini, L., Dudin, O., Martin, S.G., 2013. Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol.* 3, 130008. doi:10.1098/rsob.130008
- Michnick, S., Roustan, J.-L., Remize, F., Barre, P., Dequin, S., 1997. Modulation of Glycerol and Ethanol Yields During Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressed or Disrupted for GPD1 Encoding Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase. *Yeast* 13, 783-793. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199707)13:9<783::AID-YEA128>3.0.CO;2-W
- Molina, A., Swiegers, J., Varela, C., Pretorius, I., Agosin, E. 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:675-687.
- Mortimer, R.K., 2000. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* 10, 403-9.
- Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M., 1994. Genome renewal: A new

- phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10, 1543-1552. doi:10.1002/yea.320101203
- Mouret, J.R., Cadiere, A., Aguera, E., Rollero, S., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., 2014. Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 32, n/a-n/a. doi:10.1002/yea.3028
- Moyad, M.A., 2007. Brewer ' s / Baker ' s Yeast And Preventive Medicine : Part I. *Urol. Nurs.* 27, 560-561.
- Naseeb, S., James, S.A., Alsammar, H., Michaels, C.J., Gini, B., Nueno-Palop, C., Bond, C.J., McGhie, H., Roberts, I.N., Delneri, D., 2017. *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2046-2052. doi:10.1099/ijsem.0.002013
- Naumov, G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J., Roberts, I.N., 2000. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1931-1942. doi:10.1099/00207713-50-5-1931
- Naumova, E.S., Naumov, G.I., Masneuf-Pomarède, I., Aigle, M., Dubourdieu, D., 2005. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast* 22, 1099-1115. doi:10.1002/yea.1298
- Navarro-Tapia, E., Querol, A., Pérez-Torrado, R., 2018. Membrane fluidification by ethanol stress activates unfolded protein response in yeasts. *Microb. Biotechnol.* 11, 465-475. doi:10.1111/1751-7915.13032
- Neiman, A.M., 2011. Sporulation in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 189, 737-765. doi:10.1534/genetics.111.127126
- Nevoigt, E., 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 379-412. doi:10.1128/MMBR.00025-07
- Nevoigt, E., Stahl, U., 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 231-41.
- Nguyen, H., Gaillardin, C., 2005. Evolutionary relationships between the former species

Bibliografía

- and the hybrids and ; reinstatement of (Beijerinck) as a distinct species. FEMS Yeast Res. 5, 471-483. doi:10.1016/j.femsyr.2004.12.004
- Nishino, H., Miyazaki, S., Tohjo, K., 1985. Effect of Osmotic Pressure on the Growth Rate and Fermentation Activity of Wine Yeasts. Am. J. Enol. Vitic. 36, 170-174.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., 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. 106, 16333-16338. doi:10.1073/pnas.0904673106
- Novo, M.T., Beltran, G., Torija, M.J., Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J.M., Mas, A., 2003. Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. Int. J. Food Microbiol. 86, 153-61.
- Oliveira, B.M., Barrio, E., Querol, A., Pérez-Torrado, R., 2014. Enhanced enzymatic activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii*. PLoS One 9, e87290. doi:10.1371/journal.pone.0087290
- Origone, A.C., Rodríguez, M.E., Oteiza, J.M., Querol, A., Lopes, C.A., 2018. *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces uvarum* hybrids generated under different conditions share similar winemaking features. Yeast 35, 157-171. doi:10.1002/yea.3295
- Ortiz-Tovar, G., Pérez-Torrado, R., Adam, A.C., Barrio, E., Querol, A., 2018. A comparison of the performance of natural hybrids *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* at low temperatures reveals the crucial role of their *S. kudriavzevii* genomic contribution. Int. J. Food Microbiol. 274, 12-19. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.002
- Ough, C.S., 1991. Winemaking basics. Food Products Press.
- Ough, C.S., Amerine, M.A., 1988. Methods for analysis of musts and wines, 2th ed. J. Wiley.
- Ough, C.S., Crowell, E.A., 1980. Nitrate Determination in California Musts and Wines. Am. J. Enol. Vitic. 31, 344-346.

- Paget, C.M., Schwartz, J.M., Delneri, D., 2014. Environmental systems biology of cold-tolerant phenotype in *Saccharomyces* species adapted to grow at different temperatures. *Mol. Ecol.* 23, 5241-5257. doi:10.1111/mec.12930
- Pavlik, P., Simon, M., Schuster, T., Ruis, H., 1993. The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Curr. Genet.* 24, 21-25. doi:10.1007/BF00324660
- 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. doi:10.1101/gr.436602
- Pérez-Torrado, R., Barrio, E., Querol, A., 2018. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1-11. doi:10.1080/10408398.2017.1285751
- Pérez-Torrado, R., González, S.S., Combina, M., Barrio, E., Querol, A., 2015. Molecular and enological characterization of a natural *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* hybrid. *Int. J. Food Microbiol.* 204, 101-110. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.012
- Pérez-Través, L., Lopes, C.A., Barrio, E., Querol, A., 2012. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 102-111. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.008
- Pérez-Través, L., Lopes, C.A., González, R., Barrio, E., Querol, A., 2015. Physiological and genomic characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* hybrids with improved fermentation performance and mannoprotein release capacity. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 30-40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.004
- Pérez-Través, L., Lopes, C.A., Querol, A., Barrio, E., 2014. On the Complexity of the *Saccharomyces bayanus* Taxon: Hybridization and Potential Hybrid Speciation. *PLoS One* 9, e93729. doi:10.1371/journal.pone.0093729
- Peris, D., Belloch, C., Lopandić, K., Álvarez-Pérez, J.M., Querol, A., Barrio, E., 2012a. The molecular characterization of new types of *Saccharomyces cerevisiae* × *S. kudriavzevii* hybrid yeasts unveils a high genetic diversity. *Yeast* 29, 81-91. doi:10.1002/yea.2891

Bibliografía

- Peris, D., Lopes, C.A., Arias, A., Barrio, E., 2012b. Reconstruction of the Evolutionary History of *Saccharomyces cerevisiae* x *S. kudriavzevii* Hybrids Based on Multilocus Sequence Analysis. *PLoS One* 7, e45527. doi:10.1371/journal.pone.0045527
- Peris, D., Lopes, C.A., Belloch, C., Querol, A., Barrio, E., 2012c. Comparative genomics among *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* natural hybrid strains isolated from wine and beer reveals different origins. *BMC Genomics* 13, 407. doi:10.1186/1471-2164-13-407
- Peris, D., Pérez-Torrado, R., Hittinger, C.T., Barrio, E., Querol, A., 2018. On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *Yeast* 35, 51-69. doi:10.1002/yea.3283
- 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, 339-344. doi:10.1038/s41586-018-0030-5
- Phaff, H.J., Miller, M.W., Mrak, E.M., 1977. *Life of Yeasts.*, Second. ed. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Pickering, G.J., 2000. Low - and Reduced - alcohol Wine : A Review. *J. Wine Res.* 11, 129-144. doi:10.1080/09571260020001575
- Piekarska, I., Rytka, J., Rempola, B., 2010. Regulation of sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim. Pol.* 57, 241-50.
- 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. doi:10.1016/j.tig.2006.02.002
- Poulter, R.T.M., Goodwin, T.J.D., Butler, M.I., 2007. The nuclear-encoded inteins of fungi. *Fungal Genet. Biol.* 44, 153-179. doi:10.1016/j.fgb.2006.07.012
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729. doi:10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B

- Pretorius y Lambrechts, M., 2000. Yeast and its importance to wine aroma: a review. *South African Journal of Enology and Viniculture* 21 (special issue), 97-129.
- Pretorius, I.S., Høj, P.B., 2005. Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 83-108. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00281.x
- Pretorius, L.S., van der Westhuizen, T.J., 1991. The Impact of Yeast Genetics and Recombinant DNA Technology on the Wine Industry - A Review. *South African J. Enol. Vitic.* 12, 3-31. doi:10.21548/12-1-2220
- Pronk, J.T., Yde, H., And, S., Van Dijkent, J.P., 1996. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST* 12, 1607-1633.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D., 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-53.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 315-323. doi:10.1016/0168-1605(94)90061-2
- Querol, A., Belloch, C., Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E., 2003a. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. *Int. Microbiol.* 6, 201-205. doi:10.1007/s10123-003-0134-z
- Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., del Olmo, M., Barrio, E., 2003b. Adaptive evolution of wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 3-10. doi:10.1016/S0168-1605(03)00244-7
- 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. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024
- Redžepovi, S., Orli, S., Sikora, S., Majdak, A., Pretorius, I.S., 2002. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 305-310.
- Remize, F., Barnavon, L., Dequin, S., 2001. Glycerol Export and Glycerol-3-phosphate

Bibliografía

- Dehydrogenase, but Not Glycerol Phosphatase, Are Rate Limiting for Glycerol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 3, 301-312. doi:10.1006/mben.2001.0197
- Remize, F., Cambon, B., Barnavon, L., Dequin, S., 2003. Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to Gpd1p and is only partially controlled by the HOG pathway. *Yeast* 20, 1243-1253. doi:10.1002/yea.1041
- Remize, F., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., 2000. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *J. Appl. Microbiol.* 88, 371-8.
- Remize, Roustan, Sablayrolles, Barre, Dequin, 1999. Glycerol overproduction by engineered *saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in By-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 143-9.
- Rep, M., Albertyn, J., Thevelein, J.M., Prior, B.A., Hohmann, S., 1999. Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145, 715-727. doi:10.1099/13500872-145-3-715
- Ribéreau-Gayon, J., Darriet, P., Ballestra, P., Dols-Laffargue, M., Geny, L., Lonvaud, A., Lucas, P., Marchal, A., Masneuf, I., Thibon, C., Bély, M., Donèche, B., Teissèdre, P.-L., 2017. *Traité d'œnologie. Tome 1, Microbiologie du vin, vinifications*, 7th ed. Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon, P., 2006. *Handbook of enology*. John Wiley.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2006. *The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, en: Ltd, J.W.& S. (Ed.), *Handbook of enology*. Vol. 2. Wiley, England.
- Ribéreau-Gayon, J., 1975. *Trattato di enologia*.
- Röcker, J., Schmitt, M., Pasch, L., Ebert, K., Grossmann, M., 2016. The use of glucose oxidase and catalase for the enzymatic reduction of the potential ethanol content in wine. *Food Chem.* 210, 660-670. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.04.093

- Rojas, V., Gil, J. V, Piñaga, F., Manzanares, P., 2001. Studies on acetate ester production by non-Saccharomyces wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 283-289. doi:10.1016/S0168-1605(01)00552-9
- Rønnow, B., Kielland-Brandt, M.C., 1993. GUT2, a gene for mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9, 1121-1130. doi:10.1002/yea.320091013
- Ruderfer, D.M., Pratt, S.C., Seidel, H.S., Kruglyak, L., 2006. Population genomic analysis of outcrossing and recombination in yeast. *Nat. Genet.* 38, 1077-1081. doi:10.1038/ng1859
- Ruiz-Herrera, J., Victoria Elorza, M., Valentín, E., Sentandreu, R., 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 6, 14-29. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x
- Ruiz-Rodriguez, A., Fornari, T., Hernández, E.J., Señorans, F.J., Reglero, G., 2010. Thermodynamic modeling of dealcoholization of beverages using supercritical CO₂: Application to wine samples. *J. Supercrit. Fluids* 52, 183-188. doi:10.1016/J.SUPFLU.2009.12.011
- 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. doi:10.1016/S0922-338X(97)80988-9
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Guillamón, J.M., Salazar, G., Querol, A., Barrio, E., 2011. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2292-302. doi:10.1128/AEM.01861-10
- Sampaio, J.P., Gonçalves, P., 2008. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with Oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2144-2152. doi:10.1128/AEM.02396-07
- Scannell, D.R., Zill, O.A., Rokas, A., Payen, C., Dunham, M.J., Eisen, M.B., Rine, J., Johnston, M., Hittinger, C.T., 2011. The Awesome Power of Yeast Evolutionary Genetics: New Genome Sequences and Strain Resources for the *Saccharomyces sensu stricto* Genus. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 1, 11-25.

Bibliografía

doi:10.1534/g3.111.000273

Schacherer, J., Shapiro, J. a, Ruderfer, D.M., Kruglyak, L., 2009. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 458, 342-345. doi:10.1038/nature07670

Sharf, R., Margalith, P., 1983. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 311-313. doi:10.1007/BF00508027

Sipiczki, M., 2008. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Res.* 8, 996-1007. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00369.x

Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., 1997. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. *J. Clin. Lab. Anal. J. Clin. Lab. Anal* 11.

Stoddard, B.L., 2006. Homing endonuclease structure and function. *Q. Rev. Biophys.* 38, 49. doi:10.1017/S0033583505004063

Stribny, J., Gamero, A., Pérez-Torrado, R., Querol, A., 2015. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 41-46. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.003

Takács, L., Vatai, G., Korány, K., 2007. Production of alcohol free wine by pervaporation. *J. Food Eng.* 78, 118-125. doi:10.1016/J.JFOODENG.2005.09.005

Thomas, D.S., Hossack, J.A., Rose, A.H., 1978. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 117, 239-45.

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, 2623-32. doi:10.1128/AEM.03710-13

Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, 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. doi:10.1016/S0168-1605(02)00506-8
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 47-53. doi:10.1016/S0168-1605(02)00144-7
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., 2009. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 237-243. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.004
- Tronchoni, J., Guillamón, J., Querol, A., Pérez-Torrado, R., 2014. Transcriptomics of cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii* reveals the key role of gene translation efficiency in cold stress adaptations. *BMC Genomics* 15, 432. doi:10.1186/1471-2164-15-432
- Tronchoni, J., Guillamón, J.M., Querol, A., Pérez-Torrado, R., Guillamón, J.M., Querol, A., Pérez-Torrado, R., 2017. Transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids during low temperature winemaking. *F1000Research* 6, 679. doi:10.12688/f1000research.11550.1
- Tronchoni, J., Rozès, N., Querol, A., Guillamón, J.M., 2012. Lipid composition of wine strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 191-198. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.004
- Tsai, I.J., Bensasson, D., Burt, A., Koufopanou, V., 2008. Population genomics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*: Quantifying the life cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4957-62. doi:10.1073/pnas.0707314105
- Tubb, R., Searle, B., Goodey, A., Brown, A., 1981. Rare mating and transformation for construction of novel brewing yeasts.
- Varavuth, S., Jiraratananon, R., Atchariyawut, S., 2009. Experimental study on dealcoholization of wine by osmotic distillation process. *Sep. Purif. Technol.* 66, 313-321. doi:10.1016/J.SEPPUR.2008.12.011
- Villettaz, J.C., 1987. A new method for the production of low alcohol wines and better balanced wines., en: T. Lee (ed.) (Ed.), *Proceedings of the 6th Aust. Wine Ind.*

Bibliografía

- Tech. Conf. Australian Industrial Publishers, Adelaide, pp. 125-128.
- Villettaz, J.C., 1986. Method for production of a low alcoholic wine and agent for performance of the method. European Patent no: EP 0 194 043 A1.
- Wagner, A., 1998. The fate of duplicated genes: loss or new function? *BioEssays* 20, 785-788. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199810)20:10<785::AID-BIES2>3.0.CO;2-M
- 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, 5404-17. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05732.x
- Wang, S.-A., Bai, F.-Y., 2008. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 510-514. doi:10.1099/ijs.0.65331-0
- Weisman, L.S., Bacallao, R., Wickner, W., 1987. Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle. *J. Cell Biol.* 105, 1539-47.
- Wimalasena, T.T., Greetham, D., Marvin, M.E., Liti, G., Chandelia, Y., Hart, A., Louis, E.J., Phister, T.G., Tucker, G.A., Smart, K.A., 2014. Phenotypic characterisation of *Saccharomyces* spp. yeast for tolerance to stresses encountered during fermentation of lignocellulosic residues to produce bioethanol. *Microb. Cell Fact.* 13, 47. doi:10.1186/1475-2859-13-47
- Wolfe, K., 2004. Evolutionary Genomics: Yeasts Accelerate beyond BLAST. *Curr. Biol.* 14, R392-R394. doi:10.1016/J.CUB.2004.05.015
- Wolfe, K.H., Shields, D.C., 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708-713. doi:10.1038/42711
- Xie, X., Lipke, P.N., 2010. On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast* 27, 479-88. doi:10.1002/yea.1787
- Yalcin, S.K., Yesim Ozbas, Z., 2008. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Braz. J. Microbiol.* 39, 325-32. doi:10.1590/S1517-838220080002000024

- You, K.M., Rosenfield, C.-L., Knipple, D.C., 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1499-503. doi:10.1128/AEM.69.3.1499-1503.2003
- Zeyl, C., 2009. The role of sex in fungal evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 592-598. doi:10.1016/J.MIB.2009.09.011
- Zimmer, A., Durand, C., Loira, N., Durrens, P., Sherman, D.J., 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. doi:10.1371/journal.pone.0086298
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875-81.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA