

■ TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en  
Biomedicina y Biotecnología

CARACTERIZACIÓN  
BIOQUÍMICA DE  
**LEVADURAS VÍNICAS  
NO-*SACCHAROMYCES***  
Y ADAPTACIÓN  
TECNOLÓGICA DE SU  
PRODUCCIÓN  
INDUSTRIAL COMO  
LEVADURA SECA ACTIVA

**Max Torrellas Marcó**

Valencia, Julio de 2020



# Caracterización bioquímica de levaduras vínicas no-*Saccharomyces* y adaptación tecnológica de su producción industrial como levadura seca activa



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Valencia, Julio de 2020

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Tesis doctoral presentada por Max Torrellas Marcó para optar al grado de Doctor  
por la Universitat de València

**Directores:** Dra. Emilia Matallana Redondo

Dr. Agustín Aranda Fernández





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



INSTITUTE FOR  
INTEGRATIVE  
SYSTEMS BIOLOGY

EMILIA MATALLANA REDONDO, doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València y AGUSTÍN ARANDA FERNÁNDEZ, doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ambos en calidad de directores de tesis,

**CERTIFICAN** que la presente Tesis Doctoral, titulada '**Caracterización bioquímica de levaduras vínicas no-Saccharomyces y adaptación tecnológica de su producción industrial como levadura seca activa**' realizada por el graduado en Biotecnología MAX TORRELLAS MARCÓ, ha sido realizada bajo la dirección de EMILIA MATALLANA y AGUSTÍN ARANDA en el Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio, Universitat de València-CSIC), autorizando mediante este escrito la presentación de la misma para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

Y para que así conste a los efectos oportunos y en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado:

Valencia. Julio de 2020

Directora: Emilia Matallana

Director: Agustín Aranda



## **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda predoctoral FPI BES-2015-073542 concedida por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades dentro del proyecto AGL2014-52984-R.

Gracias a Emilia y Agustín por darme la oportunidad de realizar un trabajo tan interesante en su grupo. Por todo el apoyo que me ofrecieron incluso antes de incorporarme al laboratorio. Por toda su atención, ayuda y por todo lo que he aprendido a lo largo de estos años.

Gracias a toda la gente que ha formado parte del laboratorio, tanto en nuestra etapa en el IATA como ahora en el I2SysBio, que han hecho que estos cuatro años de tesis fueran en un ambiente inmejorable. A Esther porque, aunque cuando empecé la tesis ya no estaba, su ayuda fue imprescindible durante mi etapa como estudiante de TFG y al arrancar la tesis. A las Maripilis, por haberme recibido con los brazos abiertos, por haber hecho que el ambiente en el laboratorio fuera inmejorable y por todo lo que he aprendido de vosotras. A Ceci por animarnos el laboratorio cada día, por todas las películas que me recomendó, sus sesiones de DJ que hicieron que nos acabase gustando Izal y todo lo que aprendí de ti en el tiempo que compartimos. A Marta, por todo su trabajo, energía y buen rollo, aún no sé cómo conseguimos que el laboratorio siguiera funcionando cuando se fue. A Nubia, porque ha sido la mejor compañera de trabajo posible, por todos los consejos y conocimiento que ha compartido conmigo. A Bea por toda ayuda y consejos, por su capacidad de superación y todas las recomendaciones de Netflix. A María, por sus constantes visitas que la convirtieron en una más del laboratorio, por su forma de ser y su buen rollo. A Víctor porque su llegada, aunque haya sido al final, ha renovado las energías del laboratorio. Gracias también a los alumnos de TFG que han estado conmigo y han 'sufrido' el trabajo con las no-*Saccharomyces* y sobretodo esas medidas de glutatión que nunca querían salir. Sergio, Carlos, Maya y Marina, parte de este trabajo también es vuestro.

A Nicolas Rozès por toda la ayuda prestada para hacer posible el análisis de lípidos. A Angela Capece y Patrizia Romano, por recibirme en su laboratorio en Potenza y hacerme sentir como en casa durante 3 meses. Gracias en especial a Rocchina por su ayuda constante en el trabajo diario y con el que quedó pendiente de acabar. Gracias al resto de miembros del laboratorio: Angela, Gabriella, Georgia, Grazia y Rossana por toda su ayuda y por el buen ambiente de trabajo del que disfruté durante mi tiempo allí.

Gracias a Paco Madueño, por sus consejos y apoyo cuando me iniciaba en esto de investigar en mi etapa de estudiante de Máster en el IBMCP.

Gracias a Gust Solana por el magnífico diseño de portada.

A Dani, porque después de quién sabe cuántas horas de clases y prácticas, aún nos quedan ganas de juntarnos y pasar tardes entre cervezas, cine, fútbol y lágrimas de risa. Sin todas esas tardes estoy seguro que nuestras tesis se nos habrían hecho mucho más largas. Espero que podamos seguir cantando muchos más goles de Messi juntos.

A David, Mike, Javi, David y Pau por su amistad, por estar siempre ahí desde hace tantos años, por nuestras cenas los fines de semana permiten desconectar del trabajo de la semana, algún día encontraremos la hamburguesa perfecta. Gracias por todos los grandes momentos que hemos pasado y que nos quedan por pasar.

A mis padres y a mis hermanos, porque sin ellos no habría llegado hasta aquí. Gracias por todo.

A Lena, por todos estos años que he compartido a tu lado, por todo lo que nos queda por vivir: Por conseguir aguantarme durante todo este tiempo, porque aunque no entiendas muy bien de qué te hablo cuando te cuento las cosas del laboratorio siempre escuchas mis rollos. Por sacarme a pasear con Huggsy y Kira todos los días. Te quiero.

Gracias a todos.

## **Índice**

---



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. El vino	3
2. Levaduras vínicas	4
2.1 El papel de las levaduras en la producción del vino	6
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y la bioquímica de la fermentación	7
2.3 Papel de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en la producción del vino	10
3. Producción industrial de levaduras vínicas como Levadura Seca Activa	17
3.1 Medio de crecimiento	17
3.2 Etapas de propagación industrial de biomasa	18
3.3 Deshidratación y rehidratación	20
4. Estrés en levaduras	22
4.1 Respuesta a estrés en <i>S. cerevisiae</i>	22
4.2 Estrés oxidativo	25
4.3 Papel del glucógeno y la trehalosa en la respuesta a estrés	30
4.4 Papel de la membrana celular en la adaptación a condiciones de estrés	32
4.5 Estrés durante el proceso de propagación de biomasa	35
4.6 Estrés durante la vinificación	37
5. Antioxidantes como herramienta biotecnológica	38
5.1 Compuestos antioxidantes	38
5.2 Aceites vegetales como fuente de antioxidantes	41
5.2.1 Aceite de argán	42
<b>OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
1. Materiales	51
1.1 Cepas de microorganismos	51
1.2 Oligonucleótidos	51
2. Medios y condiciones de cultivo	52
2.1 Condiciones de cultivo a escala de laboratorio	52
2.2 Condiciones industriales de producción de biomasa	53
2.3 Deseccación mediante lecho fluidizado y rehidratación de la biomasa	54
2.4 Deseccación mediante <i>Spray-Dryer</i>	54
2.5 Análisis de respuesta a estrés	55
2.5.1 Estrés por temperatura	55
2.5.2 Estrés osmótico	55
2.5.3 Estrés oxidativo	55
2.5.4 Estrés por etanol	55
2.6 Ensayos de microvinificación	56

## Índice

3.	Manipulación y análisis de ácidos nucleicos	57
3.1	Extracción de DNA	57
3.2	Reacción en cadena de la polimerasa	57
3.3	Reacción con endonucleasas	57
3.4	Electroforesis de DNA en geles de agarosa	58
4.	Métodos de obtención y análisis de proteínas	58
4.1	Obtención de extractos celulares	58
4.2	Determinación de actividades enzimáticas	58
4.2.1	Actividad catalasa	58
4.2.2	Actividad glutatión reductasa	59
4.2.3	Actividad invertasa	59
5.	Análisis de parámetros bioquímicos	60
5.1	Análisis de parámetros enológicos	60
5.1.1	Determinación de azúcares reductores	60
5.1.2	Determinación de glucosa por el método glucosa oxidasa/peroxidasa	60
5.1.3	Determinación de sacarosa	61
5.1.4	Determinación de etanol	61
5.1.5	Perfil analítico de vinos experimentales	61
5.1.6	Cromatografía de gases	61
5.2	Análisis de parámetros redox de tolerancia a estrés	62
5.2.1	Cuantificación de la peroxidación de lípidos	62
5.2.2	Cuantificación de trehalosa	62
5.2.3	Cuantificación de glutatión	63
5.3	Análisis de composición lipídica total	64
5.3.1	Determinación de ácidos grasos	64
5.3.2	Determinación de esteroides	64
6.	Análisis de parámetros tecnológicos	65
6.1	Medida de viabilidad	65
6.2	Medida de rendimiento	65
6.3	Capacidad fermentativa	65
7.	Tratamiento estadístico de los datos	66
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
1.	Caracterización fisiológica de especies no- <i>Saccharomyces</i> en condiciones de producción de levadura seca activa	69
1.1	Identificación de especies no- <i>Saccharomyces</i>	70
1.2	Crecimiento en melaza	71
1.3	Análisis del consumo de sacarosa y de la actividad invertasa	74
1.4	Análisis de la viabilidad tras la deshidratación	79
1.5	Análisis de la capacidad fermentativa	83
1.5.1	Capacidad fermentativa en biomasa fresca	83

1.5.2 Capacidad fermentativa en biomasa deshidratada	85
1.6 Análisis de crecimiento en condiciones de estrés	89
1.6.1 Estrés térmico	89
1.6.2 Estrés osmótico	91
1.6.3 Estrés oxidativo	92
1.6.4 Estrés por etanol	93
1.7 Discusión general	95
2. Caracterización bioquímica de mecanismos de respuesta a estrés oxidativo de especies de levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	98
2.1 Determinación del daño oxidativo sobre lípidos	99
2.2 Determinación de actividades enzimáticas de defensa antioxidante	101
2.2.1 Actividad catalasa	101
2.2.2 Actividad glutatión reductasa	105
2.3 Determinación de metabolitos intracelulares de protección frente a estrés	107
2.3.1 Niveles de trehalosa	107
2.3.2 Niveles de glutatión	114
2.4 Análisis comparativo de especies no- <i>Saccharomyces</i>	118
2.5 Análisis de composición lipídica total	120
2.5.1 Determinación de ácidos grasos totales	120
2.5.2 Determinación de esteroides totales	122
2.6 Discusión general	125
3. Efecto de la adición de aceites vegetales al medio de cultivo en la eficiencia tecnológica de levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	128
3.1 Efecto del tratamiento con aceite de argán sobre el crecimiento y la viabilidad de la biomasa de levadura no- <i>Saccharomyces</i>	129
3.2 Análisis de la capacidad fermentativa de la biomasa cultivada en presencia de aceite de argán	131
3.3 Determinación del daño oxidativo sobre los lípidos en células cultivadas en presencia de aceite de argán	134
3.4 Determinación de actividades enzimáticas de defensa antioxidante en células cultivadas en presencia de aceite de argán	136
3.4.1 Actividad catalasa	136
3.4.2 Actividad glutatión reductasa	139
3.5 Determinación de moléculas protectoras frente a estrés en células cultivadas en presencia de aceite de argán	141
3.5.1 Niveles de trehalosa	141
3.5.2 Niveles de glutatión	143
3.6 Análisis global del efecto del aceite de argán sobre los parámetros redox	146
3.7 Análisis de composición lipídica total en presencia de aceite de argán	148
3.8 Cultivo en presencia de aceites alternativos en cepas de <i>S. cerevisiae</i>	152

## Índice

3.9 Crecimiento y viabilidad de distintas cepas de <i>S. cerevisiae</i> cultivadas en presencia de aceites alternativos	153
3.10 Capacidad fermentativa de distintas cepas de <i>S. cerevisiae</i> en presencia de aceites alternativos	157
3.11 Efecto del tratamiento con aceites alternativos sobre parámetros redox de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	160
3.11.1 Daño oxidativo en lípidos en presencia de aceites alternativos	160
3.11.2 Actividades enzimáticas de defensa antioxidante en presencia de aceites alternativos	163
3.11.3 Niveles de trehalosa en presencia de aceites alternativos	167
3.11.4 Niveles de glutatión en presencia de aceites alternativos	169
3.12 Discusión general	173
4. Adaptación del proceso de propagación de la biomasa de levadura para la mejora de su eficiencia tecnológica	177
4.1 Análisis de diferencias de crecimiento debidas a la fuente de carbono	177
4.2 Adaptación del medio de propagación de biomasa mediante la hidrólisis ácida de la melaza	179
4.3 Adaptación del medio de propagación de biomasa mediante dilución de la melaza	184
4.4 Adaptación del proceso de deshidratación mediante <i>spray dryer</i>	190
4.5 Discusión general	193
5. Validación de la propagación de biomasa en cultivos en fermentador	197
5.1 Propagación de <i>S. cerevisiae</i> a escala de biorreactor	198
5.2 Propagación de <i>H. vineae</i> a escala de biorreactor	204
5.3 Propagación de <i>M. pulcherrima</i> a escala de biorreactor	209
5.4 Discusión general	213
6. Vinificaciones mixtas con Levadura Seca Activa en mosto natural	217
6.1 Vinificaciones mixtas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Hanseniaspora vineae</i>	218
6.2 Vinificaciones mixtas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Metschnikowia pulcherrima</i> cultivada en diversas condiciones	225
6.3 Vinificaciones mixtas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivada en presencia de aceite de argán y <i>Metschnikowia pulcherrima</i> en diversas condiciones	232
6.4 Análisis comparativo de los vinos producidos en fermentaciones mixtas	240
6.5 Discusión general	244
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>249</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>253</b>

## **Abreviaturas**

---



<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de varianza)
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos)
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>EDTA</b>	Sal sódica del ácido etilen diamino tetraacético
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>ITS</b>	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaciador interno transcrito)
<b>LSA</b>	Levadura Seca Activa
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotín adenín dinucleótido oxidado
<b>NADH</b>	Nicotín adenín dinucleótido reducido
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado
<b>NADPH</b>	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnoly Information</i> (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKA</b>	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
<b>rDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas del oxígeno)
<b>STRE</b>	<i>Stress Response Elements</i> (Elementos de respuesta a estrés)

## Abreviaturas

<b>TOR</b>	<i>Target of Rapamycin</i> (Diana de rapamicina)
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminoetano
<b>U</b>	Unidades
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>v/v</b>	volumen/volumen

# **Introducción**

---

## Introducción

## 1. El vino

La producción de bebidas y alimentos fermentados como el pan, el vino o la cerveza, ha jugado un papel clave en el desarrollo de la sociedad humana, debido a su importancia cultural y económica. Las primeras evidencias arqueológicas de la producción de vino se encontraron en vasijas que datan de los años 6000 AC y 3000 AC, en las regiones ahora ocupadas por Irán y Egipto, respectivamente (McGovern et al., 1997). El cultivo de la vid y la producción de vino se expandieron desde la antigua Mesopotamia al resto del mundo, y hacia el año 500 AC ya se producía vino en prácticamente toda la cuenca del Mediterráneo. La expansión del Imperio Romano extendió su producción a partes del norte de Europa (Robinson y Harding, 2015). Con toda seguridad, los primeros vinos se produjeron gracias a fermentaciones espontáneas en el interior de los recipientes donde se almacenaban los mostos por la acción de microorganismos (hongos, levaduras y bacterias) presentes en la superficie de las materias primas o introducidos de forma inadvertida por el ser humano.

En el siglo XVII, Antoine van Leeuwenhoek desarrolló lentes que le permitieron observar células de levadura por primera vez. Más tarde, en 1863, Louis Pasteur identificó la enorme actividad microbiana que tiene lugar durante la fermentación del vino y demostró, basándose en las observaciones de van Leeuwenhoek, que las levaduras eran el principal responsable de la fermentación del vino, gracias a la transformación de los azúcares presentes en el mosto en etanol y CO<sub>2</sub> (Barnett, 2000). Este conocimiento permitió a Hermann Müller la introducción del concepto de la inoculación del mosto con cultivos puros de levadura en 1890 y, como resultado, la calidad y la cantidad de la producción enológica aumentó considerablemente (Pretorius, 2000).

En la actualidad, la producción anual de vino se estimó en 263 millones de hectolitros en el año 2019, siendo Italia, Francia y España los tres países con mayor producción a nivel global. Entre los tres concentran el 46.7 % de la producción mundial, según datos de la Organización Internacional de la Vid y el Vino ([www.oiv.int](http://www.oiv.int)). Solo en España, con una producción media anual de 40 millones de hectolitros y una facturación de 6500 millones de €, la industria enológica representa alrededor del 1 % del PIB ([www.fev.es](http://www.fev.es)), lo cual refleja la importancia económica a nivel global y estatal de este sector.

## **2. Levaduras vínicas**

Las levaduras son hongos unicelulares distribuidos en una gran cantidad de ambientes y que se reproducen principalmente de forma asexual por gemación o fisión binaria y sexualmente por producción de esporas (ascosporas o basidiosporas) que no están encerradas en cuerpos fructíferos. Se dividen en dos grandes grupos filogenéticos: ascomicetos y basidiomicetos (Kurtzman et al., 2011). El filo *Ascomycota*, caracterizado por la formación de ascosporas, está a su vez compuesto de tres subfilos: *Saccharomycotina*, *Pezizomycotina* y *Taphrinomycotina* (Kurtzman y Robnett, 1994). Las principales levaduras aisladas de ambientes vínicos, pertenecen al subfilo *Saccharomycotina*. Recientemente, Shen et al., (2016) presentaron una reconstrucción filogenética de este subfilo, que muestra las relaciones entre las diferentes especies de levaduras (Figura I.1).

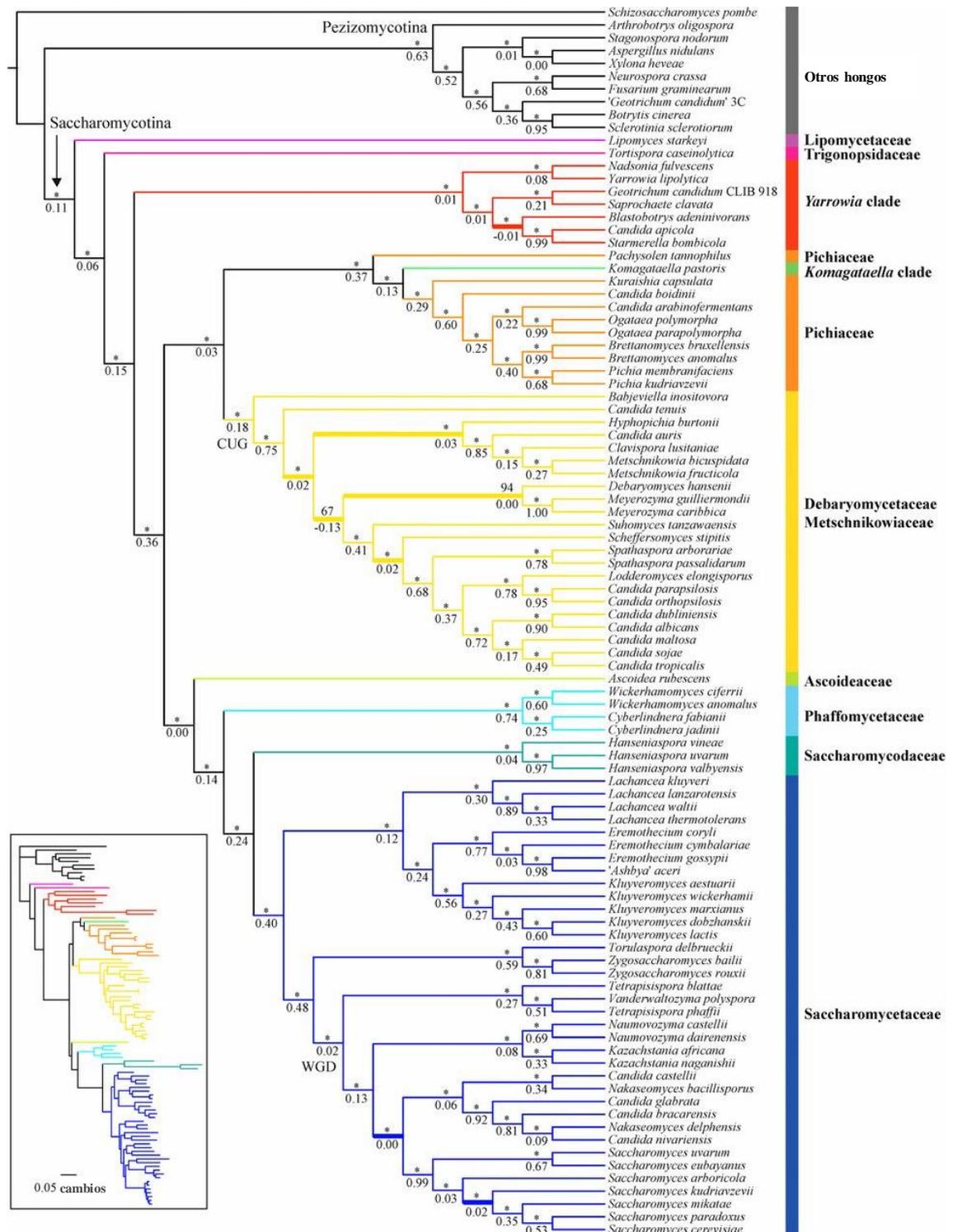


Figura I.1: Relaciones filogenéticas de las levaduras *Saccharomycotina*. Adaptada de Shen et al., (2016).

## 2.1 El papel de las levaduras en la producción del vino

La fermentación del mosto de uva es un proceso microbiológicamente complejo que implica interacciones entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Fleet, 2007). Desde el punto de vista bioquímico el principal proceso metabólico que tiene lugar durante la producción del vino es la fermentación alcohólica, llevada a cabo por algunas especies de levaduras, que consiste en la transformación de las hexosas (glucosa y fructosa) presentes en el mosto en etanol y dióxido de carbono, además de producir otros metabolitos secundarios que influyen en las propiedades organolépticas del vino.

Tradicionalmente, la producción de vino se ha llevado a cabo utilizando inadvertidamente las levaduras presentes en la superficie de las uvas y en los utensilios, recipientes y en el ambiente de las bodegas. Se conoce desde hace tiempo que en el jugo de uva recién extraído se puede encontrar una gran diversidad de especies de levadura, principalmente de los géneros *Hanseniaspora* (anamorfo *Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*. Ocasionalmente, también se encuentran otros géneros como *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Dekkera* o *Schizosaccharomyces* (Fleet, 2008). Por otro lado, la microbiota asociada al equipamiento de las bodegas está mayoritariamente compuesta de *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet, 2007). Numerosas de estas especies no-*Saccharomyces*, especialmente de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia*, son capaces de iniciar la fermentación espontánea del mosto. En las etapas iniciales de la fermentación vínica, y en especial en aquellas fermentaciones que no han sido inoculadas con *S. cerevisiae*, predominan las especies no-*Saccharomyces*. No obstante, a pesar de su abundancia, desaparecen rápidamente en las etapas iniciales de la fermentación y se ven sustituidas por *S. cerevisiae* (Fleet et al., 1984). El principal factor a la hora de determinar la supervivencia de las levaduras no-*Saccharomyces* a medida que avanza la fermentación es el aumento de los niveles de etanol, pero también influyen las condiciones de crecimiento anaeróbico, la actividad antimicrobiana del SO<sub>2</sub> que se añade en las vinificaciones, el bajo pH y la depleción de los nutrientes del medio (Bagheri et al., 2015; Fleet, 2007, Querol et al., 2018). *S. cerevisiae* es la especie dominante en las etapas medias y finales de la fermentación y la responsable última de la finalización de la fermentación alcohólica del mosto (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Aunque la adición de levaduras al mosto de cerveza y la masa de pan era una práctica común desde finales del s. XIX, en la industria enológica no se extendió hasta los años 1950 en regiones con menor tradición enológica, como EEUU o Australia, para

pasar posteriormente a Europa. Esta práctica permite acortar la fase de latencia y asegura una fermentación rápida y completa del mosto, además de ayudar a obtener un producto final con una calidad reproducible entre fermentaciones y cosechas diferentes (Bauer y Pretorius, 2000). Debido a que los primeros estudios poblacionales propusieron a *S. cerevisiae* y a la especie entonces denominada *Saccharomyces bayanus* como las principales levaduras en el proceso fermentativo, estas fueron las especies en torno a las que se desarrolló la tecnología de cultivos iniciadores (Reed y Nagodawithana, 1988). En la actualidad existe una gran diversidad de cepas *S. cerevisiae* (dentro de la cual se agrupa en la actualidad *S. bayanus*) seleccionadas para su uso como inóculos comerciales.

## 2.2 *Saccharomyces cerevisiae* y la bioquímica de la fermentación

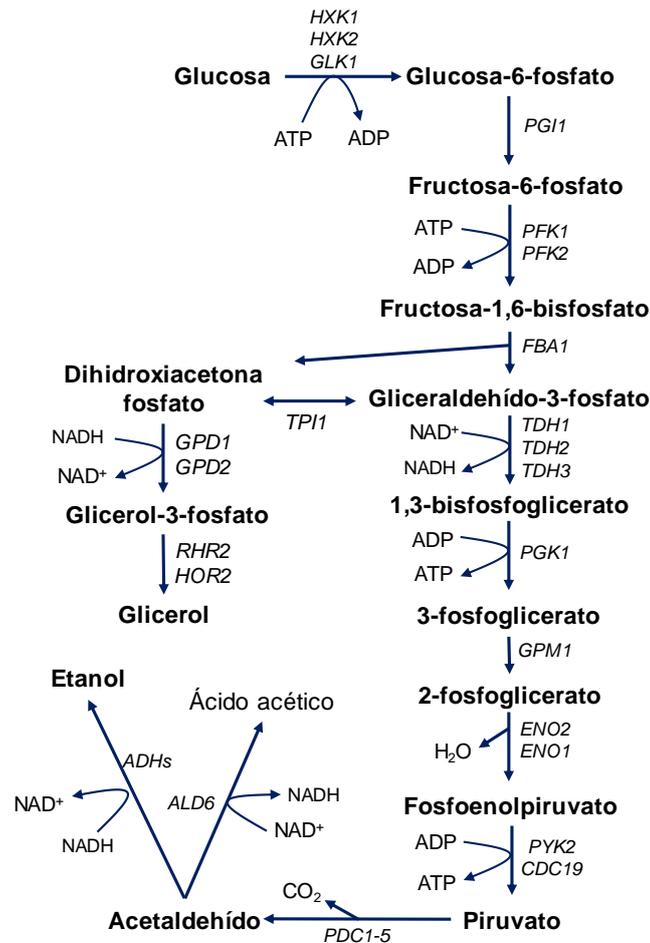
*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más empleada en fermentaciones alimentarias. Desde el punto de vista taxonómico, *S. cerevisiae* pertenece al reino *Fungi* subreino *Dikarya*, filo *Ascomycota*, subfilo *Saccharomycotina*, clase *Saccharomycetes*, subclase *Saccharomycetidae*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae* y género *Saccharomyces*. Dentro del género *Saccharomyces* se encuentran otras siete especies: *S. kudriavzevii*, *S. uvarum*, *S. paradoxus*, *S. jurei*, *S. mikatae*, *S. arboricola*, y *S. eubayanus* (Borneman y Pretorius, 2015; Naseeb et al., 2017). Además, las especies puras han dado lugar a híbridos, formados a partir de múltiples eventos de hibridación, normalmente asociados a procesos biotecnológicos. Este es el caso de *S. pastorianus* (*S. cerevisiae* x *S. eubayanus*), ampliamente extendida en la producción de cerveza tipo lager, de *S. bayanus* (*S. cerevisiae* x *S. uvarum*) y los híbridos entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, aislados en vino (Peris et al., 2018; Querol et al., 2018).

Las cepas industriales de *S. cerevisiae* que se emplean en las fermentaciones del vino proceden de dos nichos ecológicos asociados a la actividad humana: el viñedo y fermentaciones espontáneas en bodega (Fleet, 2008). A lo largo del tiempo, las cepas industriales de levadura se han ido seleccionando atendiendo a propiedades de interés en la industria, como la capacidad de hacer frente a las condiciones de estrés propias de la producción de vino, la capacidad fermentativa o la producción de compuestos aromáticos (Pizarro et al., 2007).

*S. cerevisiae* es la principal encargada de la transformación del mosto de uva en vino. Los procesos bioquímicos que tienen lugar durante la fermentación alcohólica han sido objeto de estudio de múltiples trabajos (Boulton et al., 1996; Rose y Harrison, 1991). Desde el punto de vista metabólico, el principal proceso que tiene lugar durante la

## Introducción

producción del vino es la fermentación alcohólica, la ruta catabólica que causa la transformación de las hexosas, glucosa y fructosa en el caso del mosto, en etanol y  $\text{CO}_2$ , obteniendo energía en el proceso (Figura 1.2). Además, a partir de intermediarios metabólicos del proceso se generan numerosos compuestos fundamentales para las propiedades organolépticas del vino, como aldehídos y ésteres. La fermentación alcohólica sigue la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, descrita hacia 1940 por estos investigadores y conocida también como glicólisis. Dicha ruta consiste en 10 reacciones, las cinco primeras corresponden a la fase de inversión de energía, en la que los azúcares se activan por fosforilación dependiente de ATP para dar fructosa-1,6-bisfosfato, que sufre una escisión para formar dos triosas fosfato. En la segunda fase, de generación de energía, las triosas fosfato sufren una nueva activación que conduce a dos compuestos con un alto potencial de transferencia de fosfato, el 3-fosfoglicerato y el fosfoenolpiruvato. Cada uno de estos compuestos transfiere su fosfato al ADP, proporcionando así ATP. La fermentación alcohólica concluye con dos reacciones adicionales sobre el producto final de la glicólisis, el piruvato. En la primera, las piruvato descarboxilasas catalizan la conversión del piruvato en acetaldehído y  $\text{CO}_2$ . En la segunda, el acetaldehído es reducido a etanol por las alcohol deshidrogenasas, recuperando el equilibrio redox.



**Figura I.2:** Esquema de la conversión de glucosa en etanol durante la fermentación alcohólica por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Desde el punto de vista enológico, el metabolismo de las levaduras no es solo necesario para la transformación de los azúcares en etanol y  $\text{CO}_2$ . El aroma del vino es fruto de una serie de compuestos aromáticos y volátiles, algunos de los cuales proceden de la propia uva y son los responsables del aroma varietal. Sin embargo, muchos de ellos surgen de la fermentación y dependen del metabolismo de las levaduras y de las condiciones de fermentación (Pretorius, 2016). Los principales grupos compuestos aromáticos comprenden ésteres, alcoholes superiores, compuestos carbonílicos, ácidos grasos volátiles y compuestos azufrados (que derivan del metabolismo de carbohidratos y aminoácidos). Algunos de estos compuestos volátiles producidos por la levadura, como el acetaldehído, el ácido acético o el acetato de etilo, tienen repercusión negativa para la calidad del vino cuando se superan ciertos umbrales, mientras que otros, como los ésteres acetato de 2-feniletilo y caproato de etilo tienen un efecto positivo (Swiegers

et al., 2005). No obstante, la combinación y proporción de estos metabolitos es lo que imprime carácter a cada vino.

### 2.3 Papel de las levaduras no-*Saccharomyces* en la producción del vino

Tradicionalmente las levaduras no-*Saccharomyces* se han considerado levaduras alterantes, ya que solían ser aisladas de fermentaciones lentas, paradas o en vinos con perfiles organolépticos anómalos (Amerine, 1980). Aunque en algunos casos se conocía que la presencia de levaduras no convencionales confería a los vinos metabolitos beneficiosos, su influencia positiva se vio anulada por los altos niveles de acidez volátil y de compuestos indeseados detectados en vinos en los que abundaban levaduras no-*Saccharomyces*, lo que llevó a una aversión generalizada hacia la presencia de dichas levaduras en el vino (Jolly et al., 2014).

A pesar de correr un mayor riesgo de sufrir alteraciones, el perfil organoléptico de los vinos fermentados espontáneamente difiere sustancialmente de aquellos producidos usando cultivos iniciadores puros de *S. cerevisiae*, ya que suelen poseer características mejoradas, como una mayor complejidad organoléptica o textura (Varela et al., 2009). La mayor complejidad de los vinos fermentados espontáneamente llevó a una reevaluación del papel de las levaduras no-*Saccharomyces* en el vino, que proporcionó evidencias del papel beneficioso de la presencia de estas levaduras (Ciani et al., 2010; Comitini et al., 2011; Esteve-Zarzoso et al., 1998; Lambrechts y Pretorius, 2000). En la actualidad, el término no-*Saccharomyces* hace referencia a todas aquellas especies de levadura, a excepción de las del género *Saccharomyces*, que se encuentran en el vino, con la condición de que solo se incluyen aquellas con un papel positivo en su producción, por lo que quedan fuera levaduras alterantes como *Dekkera/Brettanomyces*.

Con el objetivo de proveer perfiles organolépticos más complejos o novedosos, numerosos investigadores han explorado el uso de cultivos iniciadores de levaduras no-*Saccharomyces*. La mayoría de las levaduras no-convencionales no son capaces de completar la fermentación alcohólica, por lo que deben ir acompañadas de una cepa vínica de *S. cerevisiae* para que la termine. Típicamente, las levaduras no-*Saccharomyces* se han empleado en fermentaciones con inoculación secuencial, lo que permite su crecimiento durante horas o días hasta que se inocula *S. cerevisiae* (Ciani et al., 2010). La investigación sobre el uso de levaduras no-*Saccharomyces* en viticultura ha crecido enormemente en los últimos años y se ha centrado principalmente en tres propiedades muy buscadas en la industria enológica: la reducción del contenido en

etanol, la mejora del perfil organoléptico y el uso como agentes de biocontrol (Aranda, 2019; Morata, 2019).

En la actualidad, existe una demanda creciente de vinos con un menor grado alcohólico, lo que ha dirigido la investigación para encontrar estrategias que permitan la producción de vinos con menor contenido en etanol (Varela et al., 2015). *S. cerevisiae* produce etanol de manera muy eficiente durante la fermentación vínica, de hecho, la producción de etanol es comparable entre diferentes cepas empleando el mismo mosto (Ciani et al., 2016). Diversas especies no-*Saccharomyces* han mostrado potencial en la producción de vinos con menor contenido alcohólico, ya sea por una menor eficiencia en la producción de etanol durante la fermentación, por la formación de otros subproductos, o porque, a diferencia de *S. cerevisiae*, en presencia de aireación algunas levaduras no-*Saccharomyces* son capaces de respirar las hexosas del mosto (Ciani et al., 2016; Contreras et al., 2015; Quirós et al., 2014). Aunque el potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para la reducción de etanol parece evidente, se requieren estudios en profundidad acerca del efecto del uso de estos inóculos en el perfil sensorial del vino (Varela, 2016).

Como ya se ha mencionado, el impacto de las levaduras no-*Saccharomyces* sobre el perfil organoléptico del vino se conoce desde hace tiempo. La inoculación del mosto con especies no-*Saccharomyces* seleccionadas tiene un impacto en la producción de numerosos metabolitos que afectan a la calidad del vino final, gracias a las diferencias en el metabolismo y a la producción de enzimas que permiten la liberación de metabolitos de interés a partir de precursores presentes en el mosto (Manzanares et al., 2011). Entre otros, al comparar vinos producidos mediante fermentaciones mixtas con levaduras no-*Saccharomyces* con vinos producidos únicamente con *S. cerevisiae* se han observado cambios en las concentraciones de glicerol, ésteres, alcoholes superiores, ácidos grasos de cadena media, tioles, terpenos y manoproteínas, aunque el impacto de la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* no es siempre necesariamente positivo sobre la calidad del vino (Varela, 2016). Es importante destacar que, debido a la pobre capacidad fermentativa de la mayoría de especies no-*Saccharomyces*, el régimen de inoculación de *S. cerevisiae* (co-inoculación o inoculación secuencial) tiene un impacto considerable en el perfil volátil del vino (Renault et al., 2016, 2015).

Evitar la proliferación de levaduras alterantes, especialmente *Brettanomyces bruxellensis*, es clave para asegurar la calidad y un correcto perfil aromático del vino. Tradicionalmente, la presencia de levaduras alterantes se ha controlado usando dióxido

de azufre (SO<sub>2</sub>). Sin embargo, en base a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (Scientific Comitee for Food, 1996), en los últimos años se busca reducir el uso de SO<sub>2</sub> en productos alimentarios. Son numerosas las levaduras no-*Saccharomyces* con actividad *killer* frente a levaduras alterantes, y su uso en las primeras etapas de la fermentación resulta una buena estrategia para inhibir la proliferación de estos organismos alterantes (Mannazzu et al., 2019; Meinhardt y Klassen, 2009). Además de la actividad *killer*, algunas levaduras presentan mecanismos de control alternativos, como la producción de péptidos antimicrobianos, en el caso de *Candida intermedia* (Peña et al., 2019) o de pigmentos en el caso de *Metschnikowia pulcherrima* (Morata et al., 2019; Oro et al., 2014).

El uso de levaduras no-*Saccharomyces* no se limita a la producción de vino. Se conoce la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* en fermentaciones espontáneas de mosto de cerveza (Bokulich et al., 2012; Spitaels et al., 2014) y existen trabajos que han explorado el uso de levaduras no-*Saccharomyces* como inóculos para la producción de cervezas con menor contenido en etanol y mejoras en el perfil organoléptico (Canonico et al., 2016; Michel et al., 2016). Diferentes levaduras no-*Saccharomyces* también se han probado en la producción de bebidas alcohólicas hechas a partir de otras materias primas, como sidras, vinos de arroz, de cereza y de otras frutas tropicales (revisado en Varela, 2016). También se ha detectado una gran variedad de levaduras no-*Saccharomyces* en diversas bebidas tradicionales o chichas de comunidades indígenas de América del Sur, que podrían ser seleccionadas para su uso como cultivos iniciadores (Grijalva-Vallejos et al., 2020; Resende et al., 2018).

Aunque la mayoría de trabajos con inóculos de especies no-*Saccharomyces* en la producción de vino se han realizado a escala de laboratorio, ya existen diversos inóculos comerciales de las especies *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia fructicola*, *Pichia kluveri*, *Starmerella bacillaris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Kluyveromyces wickerhamii* y *Wickerhamomyces anomalus*, comercializados por diversas empresas productoras de biomasa como Lallemand Inc., Christian Hansen, Laffort, Enartis o AEB, cuyo uso está indicado para la mejora de parámetros organolépticos y/o el biocontrol (Roudil et al., 2020). A continuación, se exponen las principales especies y géneros de levaduras vínicas no-*Saccharomyces*, así como una breve descripción de sus principales características de interés en la producción de vino.

***Hanseniaspora spp.*** Las levaduras apiculadas del género *Hanseniaspora* son las principales levaduras presentes sobre la superficie de las uvas en el mosto (Jolly et al.,

2014). Dentro de este género se encuentran hasta diez especies, algunas de las cuales se han estudiado por su potencial para la producción de vino en los últimos años, como *H. uvarum*, *H. guillermondii* o *H. vineae*. Las principales características de este grupo son una pobre capacidad fermentativa (a excepción de *H. vineae*), la producción de compuestos volátiles de interés como acetatos de ésteres y terpenoides, y en algunos casos, y como contrapartida negativa, la producción de altos niveles de acidez volátil (Martin et al., 2018). En el caso particular de *H. vineae* su interés reside en sus actividades enzimáticas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa, que podrían permitir la liberación de compuestos aromáticos de interés (Hu et al., 2016; López et al., 2015), y en su ya mencionada elevada capacidad fermentativa (Martin et al., 2018). Vinos producidos con *H. vineae* presentan una mayor concentración de compuestos volátiles de interés como acetato de 2-feniletilo, lactato de etilo o  $\alpha$ -terpineol, lo que resulta en vinos con mayores puntuaciones en paneles de cata (Lleixà et al., 2016; Viana et al., 2011, 2009).

***Kluyveromyces* spp.** Las principales especies de este género, aisladas de ambientes vínicos y con interés en enología, son *K. lactis*, *K. marxianus* y *K. wickerhamii*. *K. lactis* ha sido empleada para la reducción de los niveles de etanol por respiración (Rodrigues et al., 2016). Por su parte, vinos producidos con *K. marxianus* presentan perfiles de compuestos volátiles diferentes a vinos control, gracias a la actividad pectinasa de esta especie (Rollero et al., 2018). Por último, el interés en *K. wickerhamii* radica principalmente en la producción de una toxina *killer* frente a *Dekkera/Brettanomyces* (Comitini y Ciani, 2011). Existe un inóculo comercial de *K. wickerhamii* producido por Enartis indicado para su uso como agente de biocontrol frente a microorganismos alterantes en vino (Roudil et al., 2020).

***Lachancea* spp.** Aunque las tres especies *L. thermotolerans*, *L. kluyveri* y *L. lanzarotensis* se han asociado con vino o uva, la mayoría de la investigación en este campo se ha centrado en *L. thermotolerans*, de la que existen diversos inóculos comerciales indicados para la mejora del aroma y el sabor en vino (Roudil et al., 2020). La inoculación del mosto con *L. thermotolerans* ha resultado efectiva para la reducción de etanol, debido a su baja eficiencia fermentativa, y en la modificación del perfil organoléptico del vino, entre otros motivos por una reducción del contenido en ácido acético, un incremento del glicerol y de la producción de compuestos volátiles que potencian el carácter floral del aroma del vino (revisado en Porter et al., 2019a, 2019b)

***Metschnikowia* spp.** *M. pulcherrima* es la principal especie de este género asociada a la producción de vino, de la cual existen ya inóculos comerciales de Lallemand Inc, Laffort y Lamothe-Abiet indicados para su uso como agentes de biocontrol, (Roudil et

al., 2020). No obstante, el interés de *M. pulcherrima* en la producción de vino es muy amplio. Investigaciones en laboratorio han demostrado su utilidad no solo como agente de biocontrol frente a levaduras de los géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Brettanomyces/Dekkera* por la producción de un pigmento, la pulcherrimina, que actúa secuestrando el hierro presente en el medio (Morata et al., 2019; Oro et al., 2014). Existen numerosos ejemplos del uso de *M. pulcherrima* en la producción de vinos con perfiles aromáticos complejos que difieren de vinos producidos únicamente con *S. cerevisiae* (Benito et al., 2015; Ruiz et al., 2018; Seguinot et al., 2020). Además de su papel en la modulación del perfil organoléptico, también se ha empleado en fermentaciones mixtas para la reducción del contenido de etanol en el vino (Contreras et al., 2014; Puškaš et al., 2020; Quirós et al., 2014), generalmente gracias a que la aireación de los mostos provoca una respiración de los azúcares en la fase inicial de la fermentación, debido al carácter *Crabtree* negativo de esta especie (Schnierda et al., 2014), aunque esta técnica puede tener un impacto negativo en el perfil sensorial del vino (Tronchoni et al., 2018).

Otra representante de este género empleada en la producción de vinos es la especie *M. fructicola*, muy cercana filogenéticamente a *M. pulcherrima*, y que ha sido tradicionalmente considerada como una levadura de biocontrol (Kurtzman y Droby, 2001). Existe un inóculo comercial de esta especie, de Lallemand Inc., indicado para la protección frente a levaduras alterantes (Roudil et al., 2020). Aunque escasos, también existen trabajos recientes que investigan el efecto de fermentaciones mixtas con *M. fructicola* en el vino, revelando que la presencia de esta especie produce vinos con perfiles aromáticos diferentes, debido a un alto contenido en ésteres, acetatos y terpenos (Boscaino et al., 2019; Castrillo et al., 2019).

***Pichia spp.*** A pesar de que varios miembros de este género se han relacionado con la producción de vino, *P. kluyveri* ha sido la especie en la que se ha centrado la investigación. Vinos producidos con *P. kluyveri* presentan una mejora en el aroma y el sabor (Benito et al., 2015; Jolly et al., 2014). Además, la producción de una toxina *killer* permite su uso como agente de biocontrol frente a levaduras alterantes en vino. Una propiedad que se aprovecha en el inóculo comercial disponible de esta especie, producido por Hansen e indicado para el biocontrol y la mejora del perfil organoléptico del vino (Roudil et al., 2020).

***Schizosaccharomyces spp.*** Las especies del género *Schizosaccharomyces* son capaces de degradar ácidos orgánicos, como el ácido málico o glucónico, una propiedad que se ha aplicado a nivel práctico para la desacidificación del mosto (revisado en Jolly

et al., 2014). La principal representante de este género, *S. pombe*, se ha empleado en fermentaciones mixtas para la reducción de los niveles de ácido málico y de acidez total, aunque a costa del incremento de compuestos no deseables como acetaldehído o propanol (Benito et al., 2013). En la actualidad, existen dos inóculos comerciales de *S. pombe* indicados para la desacidificación del vino, comercializados por BioEnología y Proenol (Roudil et al., 2020).

***Starmerella bacillaris*** (sinónimo *Candida zemplinina*, Duarte et al., 2012). Es una levadura fructofílica, acidogénica, osmotolerante y con cepas resistentes a etanol, cuyo rendimiento en etanol durante la fermentación es bajo comparado con *S. cerevisiae* (revisado en Englezos et al., 2017). Estas características han resultado útiles para la reducción del contenido de ácido acético en vinos dulces (Rantsiou et al., 2012) y del contenido en etanol (Englezos et al., 2016; Rolle et al., 2018). Las fermentaciones mixtas con *S. bacillaris* tienen un claro impacto sobre la composición de metabolitos volátiles, como un aumento del glicerol y reducción del acetaldehído (Binati et al., 2020), aunque no siempre es positivo, ya que en algunos casos se observa un menor contenido en ésteres beneficiosos respecto de los vinos producidos únicamente con *S. cerevisiae* (revisado en Englezos et al., 2017). Además de su papel sobre el perfil organoléptico del vino, *S. bacillaris* es capaz de reducir la proliferación del hongo *Botrytis cinerea* en la superficie de uvas y otras frutas como manzanas, por la producción de compuestos orgánicos volátiles (Lemos Junior et al., 2020, 2016).

***Torulaspota delbrueckii***: El papel de *T. delbrueckii* en la modulación del aroma y sabor del vino se conoce desde hace tiempo. De hecho, en 2004, se inició la comercialización de un consorcio de *T. delbrueckii* junto a *K. thermotolerans* y *S. cerevisiae*. Cinco años más tarde se convirtió en la primera levadura no-*Saccharomyces* comercializada individualmente, por Hansen (Benito, 2018; Roudil et al., 2020). Gran parte del potencial biotecnológico de esta especie deriva de su elevada capacidad fermentativa, lo que en algunas cepas de esta especie se traduce en una producción de etanol cercana al 9 % (Bely et al., 2008). El uso de *T. delbrueckii* en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* ha resultado en la obtención de vinos con numerosas propiedades de interés, como un menor contenido en alcohol (Belda et al., 2017), en ocasiones gracias a la aireación del mosto (Contreras et al., 2014). Generalmente, los vinos producidos con *T. delbrueckii* poseen numerosas diferencias respecto a los producidos únicamente con *S. cerevisiae* en lo que respecta a su composición, debido a variaciones en el acetaldehído, los ácidos acético, málico y succínico, el glicerol o los ésteres volátiles (revisado en Benito, 2018), que en general se traducen en una mayor

puntuación en cualidades positivas como la intensidad y la calidad del aroma, el color y los atributos sensoriales del vino (Belda et al., 2015; Renault et al., 2015).

***Wickerhamomyces anomalus***. Es otra de las especies que se han estudiado en fermentaciones mixtas para la obtención de vinos con perfiles aromáticos complejos, dando lugar a vinos con mayor contenido en ésteres, algunos alcoholes superiores y acetato (Domizio et al., 2011; Padilla et al., 2018). Otra característica desde el punto de vista enológico es su producción de enzimas glicosidasas, como  $\beta$ -D-glucosidasa o  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, que permiten la liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores presentes en la uva (Padilla et al., 2018; Sabel et al., 2014). Aunque quizás es su capacidad de actuar como levadura de biocontrol lo que la hace más interesante. De hecho, la cepa comercial disponible, producida por Enartis, está indicada para el control del crecimiento de microorganismos alterantes en vino (Roudil et al., 2020). *W. anomalus* produce toxinas *killer* efectivas para el control del crecimiento de *Brettanomyces/Dekkera* (Fredlund et al., 2002; Padilla et al., 2018).

***Zygosaccharomyces bailii***. Las especies del género *Zygosaccharomyces* han estado tradicionalmente asociadas a la alteración de productos con altos niveles de azúcar, como zumos de fruta, caramelos, miel, conservas e incluso vinos dulces (Kurtzman y James, 2006). En este género, la especie más destacada es *Z. bailii*, capaz de crecer en condiciones usualmente perjudiciales para el crecimiento de microorganismos, como medios con alta presión osmótica, altos niveles de etanol o pH muy ácido. Estas características permiten que suela encontrarse en numerosos alimentos y vinos contaminados. No obstante, la actividad de algunas cepas de esta especie ha sido descrita como beneficiosa para la mejora de las propiedades organolépticas del vino, por una reducción de la acidez volátil o una mayor liberación de compuestos fenólicos, como antocianinas y estilbenos (Domizio et al., 2011; Escribano-Viana et al., 2019). *Z. bailii* también se ha empleado para la obtención de vinos con menor contenido en etanol, aunque la aireación necesaria causa la acumulación de alcoholes superiores y ácidos volátiles a niveles más elevados de los deseados en vino (Canónico et al., 2019; Contreras et al., 2015).

### **3. Producción industrial de levaduras vínicas como Levadura Seca Activa**

La competitividad dentro del sector enológico hace que las bodegas reclamen la disponibilidad de inóculos comerciales de levaduras que aseguren una fermentación del mosto completa y sin paradas, y que produzca un vino característico, diferenciable y cuyas propiedades organolépticas se mantengan constantes año tras año. Además, el carácter estacional y la elevada producción a nivel mundial de vino hacen necesaria la producción de grandes cantidades de biomasa lista para ser usada tras la vendimia, lo que se consigue gracias a la producción de inóculos en forma de levadura seca activa (LSA), que asegura un producto con una capacidad fermentativa aceptable y una alta estabilidad durante el almacenaje (Pérez-Torrado et al., 2015).

#### **3.1 Medio de crecimiento**

La propagación de biomasa de levadura a nivel industrial se lleva a cabo empleando como sustrato melazas procedentes del refinamiento de azúcar de caña o de remolacha. Las melazas se seleccionaron como sustrato para la propagación de biomasa en base a su elevado contenido en azúcares y su bajo precio, al tratarse de un subproducto de la industria alimentaria. Las melazas contienen un porcentaje de azúcares de entre el 65 y el 75 %, principalmente sacarosa (Hongisto y Laakso, 1978). Las levaduras son capaces de hidrolizar la sacarosa extracelularmente en sus dos monómeros, la glucosa y la fructosa por la acción de la enzima invertasa, posteriormente son transportadas e incorporadas al metabolismo celular como fuentes de carbono. Sin embargo, las melazas son deficientes en otros compuestos esenciales para el crecimiento, como el nitrógeno (que supone menos del 3%). Por ello, es necesario suplementar la melaza con alguna fuente de nitrógeno fácilmente asimilable por la levadura, como el amonio o la urea. Otros compuestos, como el fósforo o el magnesio, también son suplementados mediante la adición de sales. Por último, es necesaria la suplementación con los compuestos vitamínicos biotina, tiamina y ácido pantoténico, por estar en muy baja concentración en la melaza (Oura, 1974; Woehrer y Roehr, 1981). Otro aspecto negativo que puede afectar al crecimiento de las levaduras es la presencia de productos tóxicos como metales pesados, fertilizantes, insecticidas o herbicidas provenientes del cultivo de la materia prima (Reed y Nagodawithana, 1988; Teclu et al., 2009). Para evitar este efecto, una práctica común en la industria es la mezcla de diferentes lotes de melaza para minimizar los efectos negativos. En los últimos años, el precio de la melaza ha aumentado, debido a su uso en otras aplicaciones industriales, como la alimentación animal o la producción de bioetanol (Akbas y Stark, 2016; Senthilkumar et al., 2016), lo

que ha dado lugar a la búsqueda de sustratos alternativos, como el licor de maíz (Vu y Kim, 2009) o el uso de bagazo de manzana (Bravo et al., 2019).

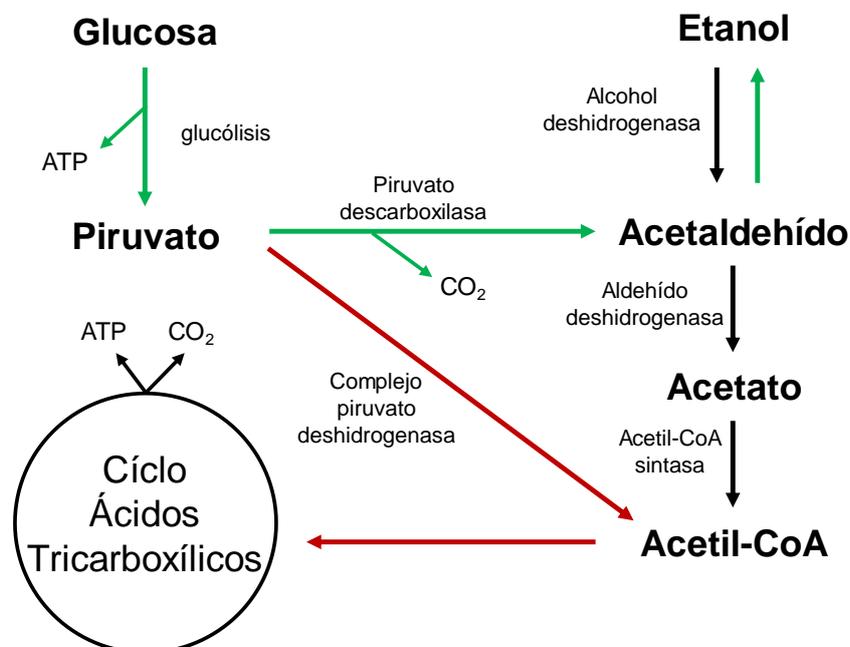
### 3.2 Etapas de propagación industrial de biomasa

Las primeras empresas que comercializaron levaduras vínicas fueron empresas productoras de levadura panadera. De hecho, hoy en día, la producción de LSA en sus primeras fases sigue siendo un proceso muy similar al de la producción de levadura prensada usada en panadería. El proceso está diseñado de manera que consta de una secuencia de 5-6 fermentaciones de volumen creciente, empezando por un cultivo inicial puro (F1) en matraz con la cepa seleccionada. Este cultivo inicial se emplea para inocular el primer fermentador y las células crecen en un cultivo en *batch* durante las primeras etapas (F2–F4) y posteriormente en *fed-batch* (F5-F6), en fermentadores de tamaño creciente inoculados con la biomasa producida en la etapa anterior (Degre, 1993; Reed y Nagodawithana, 1991).

En la primera etapa del proceso, la denominada fase *batch*, las levaduras se inoculan en pequeños tanques en cuyo interior se encuentra la melaza, previamente esterilizada, con el pH ajustado a 4.5-5 y a la que se han añadido todos los nutrientes necesarios. Una vez se inocula la levadura en el fermentador los únicos parámetros controlables son la temperatura y la aireación. La biomasa obtenida al final del crecimiento se emplea para inocular tanques de tamaño creciente. El proceso de producción de biomasa se lleva a cabo en condiciones aeróbicas, con dos objetivos fundamentales: obtener el mayor rendimiento de biomasa posible y permitir a las levaduras producir esteroides. Además, la propagación de biomasa sin aireación resulta en una reducción drástica del crecimiento celular y un incremento del estrés oxidativo interno (Pérez-Torrado et al., 2009)

La oxidación incompleta de la glucosa que tiene lugar durante la fermentación conlleva un menor rendimiento energético que la respiración (Verduyn, 1991). Para minimizar el metabolismo fermentativo de azúcares y maximizar la respiración es necesario mantener la aireación. Sin embargo, a pesar de la aireación adecuada, en *S. cerevisiae* y otras levaduras tiene lugar el denominado efecto *Crabtree*. Esta característica metabólica hace que, aún en condiciones aeróbicas, cuando la concentración de glucosa excede un umbral generalmente muy bajo, el azúcar consumido se destina a la producción de etanol mediante la vía fermentativa, independientemente de la presencia de oxígeno (De Dekken, 1966). El efecto *Crabtree* es contrario al efecto Pasteur, que consiste en la respiración de azúcares en presencia

de oxígeno. En la Figura I.3 se recogen los principales flujos metabólicos que tienen lugar cuando se produce el efecto *Crabtree*. A pesar del rendimiento subóptimo en biomasa que tiene lugar durante la fase *batch*, a lo largo de ésta las levaduras se adaptan a las grandes cantidades de azúcares y etanol presentes en el tanque de fermentación. Esta adaptación asegura el comportamiento fermentativo óptimo de la biomasa recuperada al final del proceso, gracias a la acumulación de metabolitos de reserva que serán utilizados en la fase *fed-batch* (Pérez-Torrado et al., 2009). En la fase *batch*, cuando se agotan los azúcares del medio se produce una reorganización del metabolismo y las levaduras pasan a metabolizar el etanol producido por respiración, tras el llamado cambio diáuxico. Una vez se metaboliza por completo el etanol y se inicia la alimentación, empieza la fase *fed-batch*.



**Figura I.3:** Flujos metabólicos en *S. cerevisiae* cuando tiene lugar el efecto *Crabtree*. En **verde** se representa el flujo asociado a la fermentación alcohólica y en **rojo** a la respiración (adaptado de González et al., 2011).

En la fase *fed-batch* de la propagación industrial, el principal objetivo es maximizar la producción de biomasa. Durante esta fase, con el objetivo de minimizar el efecto *Crabtree* y asegurar el mayor rendimiento posible por respiración de los azúcares, se realiza un cultivo con alimentación controlada, para mantener la concentración de glucosa a niveles bajos. Generalmente, la tasa de crecimiento durante esta fase está

controlada por la velocidad de alimentación (Beudeker et al., 1990). Para optimizar la alimentación generalmente se emplean sistemas de control *feedback*. En estos sistemas la adición de melaza está controlada por el cociente respiratorio (moles de CO<sub>2</sub> producido por moles de O<sub>2</sub> consumido) (Aiba et al., 1976; Cooney et al., 1977). Para ello se analizan el flujo y la composición de los gases a la entrada y a la salida del fermentador y se regula el aporte de sustrato en función de estos. Para obtener el mayor rendimiento de biomasa posible también resulta importante la optimización de la aireación (Blanco et al., 2008). Por lo tanto, el cultivo con aireación y limitación de azúcares permite el crecimiento respiratorio de *S. cerevisiae*, consiguiéndose un rendimiento de biomasa mucho mayor que en la fase *batch* (Postma et al., 1989). Por último, es importante controlar otros parámetros que tienen un impacto sobre el metabolismo celular, como el pH y la temperatura. El pH se mantiene en torno a 4.5 mediante la adición de soluciones ácido/base, mientras que la temperatura se mantiene alrededor del óptimo de crecimiento de 30 °C.

Al final del proceso de producción tiene lugar una fase de maduración que puede durar entre 1 y 5 días, y en la que se detiene la alimentación y se produce una leve aireación (Oura, 1974). Durante esta etapa, se permite el consumo completo del sustrato, de este modo las células entran en estado estacionario lo que permite que sean más estables y se evite la autólisis, debido a un reforzamiento de la pared celular (Herman, 2002). Durante esta fase también se acumulan metabolitos de reserva, como el glucógeno, y de protección, como la trehalosa, que tienen un papel clave en la supervivencia a la posterior fase de deshidratación (França et al., 2007; Garre et al., 2010).

### **3.3 Deshidratación y rehidratación**

A diferencia de lo que ocurre con las levaduras panaderas o cerveceras, el carácter estacional de la producción de vino hace necesaria la producción de inóculos secos estables. Al final del proceso de propagación de biomasa las células se recuperan y deshidratan para obtener levadura seca activa (Degre, 1993; González et al., 2011; Pérez-Torrado et al., 2015). Después de la fase de maduración, las levaduras se recuperan por centrifugación y son sometidas a una serie de lavados para eliminar sólidos que puedan afectar durante la deshidratación y la fermentación. La crema de levadura obtenida se filtra mediante filtros rotativos en vacío o de prensa, obteniéndose una crema de levadura con un 35 % de materia seca. A continuación, la crema de levadura se extrusiona en filamentos finos (2-4 mm de diámetro) que se pasan a un

deshidratador de lecho fluidizado donde se secan hasta alcanzar una humedad relativa de aproximadamente el 8 %. En este tipo de deshidratadores, los más extendidos en la industria, se pasa aire desde la parte inferior lo que mantiene a las levaduras en suspensión y permite una deshidratación homogénea (Law y Mujumdar, 2006). El secado produce la rotura de los filamentos en pequeños gránulos que se almacenan al vacío en presencia de algún gas inerte o CO<sub>2</sub>, para reducir la oxidación. La LSA se puede conservar durante largos periodos (3-4 años) en refrigeración. La deshidratación de las levaduras afecta severamente a la viabilidad celular (Dupont et al., 2014), por lo que se ha buscado la optimización de las condiciones industriales de secado para maximizar la supervivencia celular (Akbari et al., 2012). Aunque la LSA es el formato más extendido en la industria, los inóculos comerciales de levaduras vínicas, tanto *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces*, pueden ser usados en otros formatos que varían en el porcentaje de materia seca, como son la Levadura Congelada Activa (40 – 85 %), la Levadura Prensada (30 - 35 %) o la Crema de Levadura (18 – 25%), tal y como indica la Organización Internacional de la Vid y el Vino en su *International Oenological Codex* (2019).

Para su uso en la producción de vino, la LSA debe ser rehidratada. Aunque es posible inocular directamente el mosto de uva, normalmente se recurre a una fase previa de rehidratación. La alternativa más utilizada es el uso de agua tibia, aunque hay que evitar tiempos de rehidratación prolongados debido a las condiciones hiposmóticas. Otras alternativas son mezclas de agua con mosto o azúcar, que proporcionan una fuente de carbono a las levaduras y mantienen una presión osmótica compatible con la recuperación de la viabilidad (González et al., 2011). La optimización del medio de rehidratación tiene un claro impacto en la viabilidad y vitalidad de las levaduras (Rodríguez-Porrata et al., 2008).

#### 4. Estrés en levaduras

A lo largo de su ciclo vital, las levaduras, y en especial las utilizadas en la obtención industrial de productos de interés, se ven sometidas a numerosos ambientes desfavorables y cambiantes, que difieren de sus condiciones óptimas de crecimiento. Todos estos cambios fisicoquímicos pueden provocar un estrés celular, que afecta al metabolismo, perjudica el crecimiento y tiene como consecuencia última una pérdida de la eficiencia tecnológica de la levadura (Matallana y Aranda, 2016).

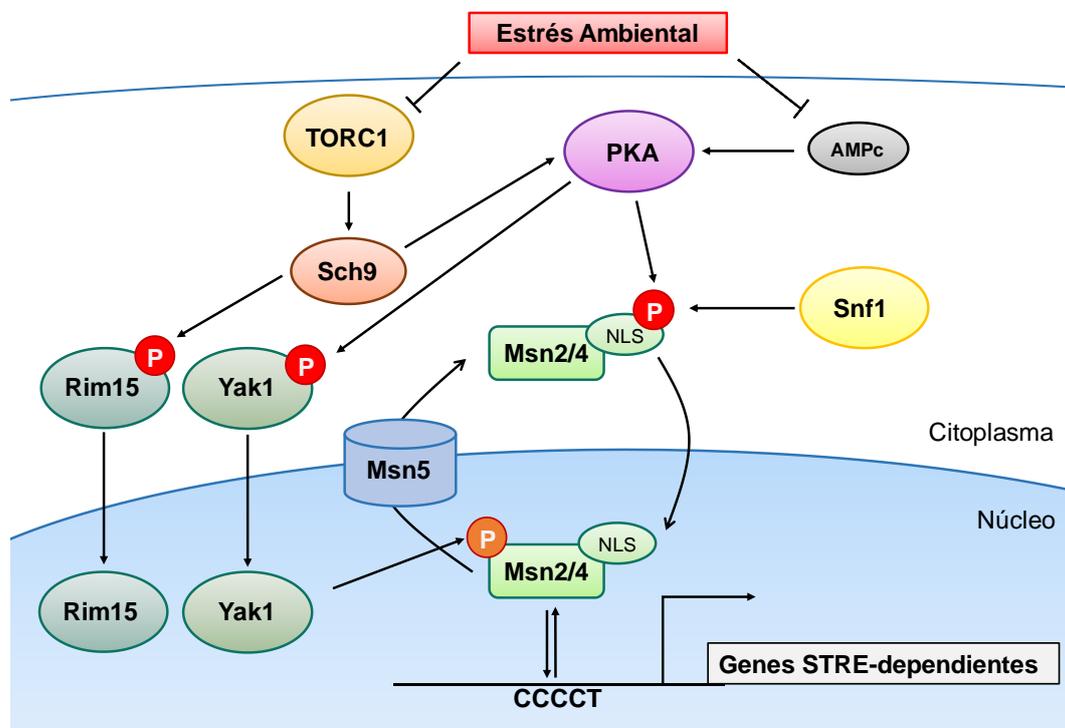
##### 4.1 Respuesta a estrés en *S. cerevisiae*

Las levaduras han desarrollado una serie de mecanismos de respuesta y adaptación para minimizar el efecto nocivo sobre su supervivencia de las condiciones de estrés a las que deben hacer frente a lo largo de su ciclo vital. La respuesta a estrés en levaduras es un proceso complejo en el que participan numerosas rutas, que han sido estudiadas extensamente en cepas y condiciones de laboratorio (Hohmann y Mager, 2003). La mayoría de estas rutas basan su regulación en proteína quinasas que remodelan la expresión de genes a través de factores de transcripción específicos de cada tipo de estrés.

Una característica destacable de la respuesta a estrés en *S. cerevisiae* es la capacidad de producir una protección cruzada, de manera que cuando la célula está sometida a un tipo determinado de estrés, es capaz de adquirir resistencia y tolerancia a un estrés diferente. Esta respuesta interconectada permite a la célula una disminución del gasto energético en presencia de estrés. Los genes cuya inducción está mediada por distintos tipos de estrés tienen en su promotor unas secuencias conocidas como Elementos de Respuesta a Estrés (STRE, *Stress Response Elements*) y son propios de los genes de la respuesta general a estrés, cuya expresión es capaz de conferir esa protección cruzada.

Existe una interconexión entre la respuesta a estrés y las rutas de señalización por nutrientes (Conrad et al., 2014; Matallana y Aranda, 2016; Orozco et al., 2019). Esta conexión se debe a que el crecimiento celular es antagónico con la respuesta a estrés, por lo que la inhibición de las rutas de señalización por nutrientes por ayuno suele causar una parada del ciclo celular y un aumento de la tolerancia a estrés. Cuando hay disponibilidad de nutrientes en el medio, las rutas de la proteína quinasa A (PKA), AMPK Snf1 y TOR/Sch9 promueven el crecimiento y la división celular e inhiben la transcripción de los factores de transcripción de respuesta general a estrés Msn2/4p. Estos factores

de transcripción, identificados en respuesta a diferentes tipos de estrés (Martínez-Pastor et al., 1996), se unen a los elementos STRE e inducen la transcripción de la batería de genes que contiene dicha secuencia. La ruta PKA responde a la presencia de azúcares fermentables en el medio, mientras que la ruta TOR responde a la presencia de nitrógeno, tanto en forma de amonio como aminoácidos. La ruta Snf1 se activa para consumir fuentes de carbono no fermentables. Cuando los nutrientes escasean, estas rutas reordenan la fisiología celular para entrar en fase estacionaria (Winderickx et al., 2003). La inactivación de estas rutas, ya sea por ayuno de nutrientes o en condiciones de estrés, promueve la activación de Msn2/4p a través de las quinasas Yak1p y Rim15p, y de la pérdida de la fosforilación de su región de señal de localización nuclear (Figura I.4).



**Figura I.4:** Respuesta general a estrés mediada por Msn2/4p. En ausencia de estrés, Msn2/4p se encuentran en el citoplasma y su activación y translocación al núcleo están inhibidas por las rutas de señalización de nutrientes PKA, Snf1 y TOR. Las quinasas PKA y Snf1p fosforilan la región de señal de localización nuclear (NLS) de Msn2/4p. PKA también inhibe la localización nuclear de Yak1p mediante fosforilación. TOR controla algunas de las dianas de PKA vía Sch9p que, además, fosforila a Rim15p, inactivándola e inhibiendo su localización nuclear. Rim15p y Yak1p fosforilan y promueven la activación de Msn2/4p. En condiciones de estrés o ayuno, la ruta TOR se inhibe, y los niveles de cAMP disminuyen, por lo que se reduce la actividad de PKA, lo que promueve la translocación de Msn2/4p al núcleo donde activan la transcripción de los genes de respuesta a estrés. Adaptado de Conrad et al., (2014); Lee et al., (2013); Morano et al., (2012).

Además de la respuesta general a estrés, las levaduras han desarrollado respuestas específicas a cada tipo de estrés, que dependen de rutas de señalización específicas. En condiciones de **estrés osmótico** se activa la ruta de respuesta de glicerol a elevada osmolaridad (HOG, *High Osmolarity Glycerol*) (Hohmann, 2015). Esta ruta depende de la proteína quinasa Hog1p. Cuando las células se ven sometidas a un choque hiperosmótico, producen glicerol como osmolito compatible. Las enzimas encargadas de su producción dependen de la ruta HOG. Hog1p activa al factor de transcripción Hot1p, que a su vez activa la síntesis de glicerol a partir del intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato, mediante la inducción de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (*GPD1*) y de los genes de la glicerol fosfatasa (*GPP1/2*) (ver Figura I.2). Además, Hog1p induce una bomba, Slt1p, que introduce glicerol del medio, y bloquea a Fps1p, que causa el eflujo de glicerol al exterior celular.

En condiciones de **estrés térmico**, a temperaturas superiores a 36 – 37 °C, se induce la síntesis de las llamadas proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Proteins*) (Morano et al., 2012; Verghese et al., 2012). El principal modulador de la respuesta a estrés térmico es el factor de transcripción Hsf1p, que induce la expresión de las HSP mediante su unión en los llamados Elementos de Choque Térmico (HSE, *Heat Shock Element*). En *S. cerevisiae*, Hsf1p actúa de forma conjunta con Msn2/4p para llevar a cabo la respuesta a estrés térmico, ya que múltiples genes de HSPs contienen regiones STRE en sus promotores. La mayoría de HSPs tienen actividad chaperona (Hsp100p, Hsp90p, Hsp70p, Hsp60p y HSPs pequeñas), y se encuentran incluso a temperaturas óptimas de crecimiento.

En las levaduras empleadas en fermentaciones vínicas, uno de los estreses más característicos es el **estrés por etanol**, causado por su elevada concentración alcanzada durante la vinificación (Auesukaree, 2017). Su principal diana en la célula es la membrana plasmática, donde se intercala en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica, resultando en una pérdida de integridad estructural y aumentando la permeabilidad de la membrana, lo que induce el influjo pasivo de iones, particularmente protones, al interior celular. Para compensar la pérdida de integridad de membrana se induce la expresión de genes de síntesis de ácidos grasos insaturados y ergosterol. Además, se activa la expresión de *PMA1* y *PMA2*, los genes de la bomba de protones de la membrana plasmática, y de los genes de la ATPasa vacuolar, para la desacidificación citosólica (Auesukaree, 2017). Elevadas concentraciones de etanol pueden afectar la estructura de algunas proteínas, por lo que una respuesta típica a este

estrés es la expresión de proteínas de choque térmico y la síntesis de trehalosa (Alexandre et al., 2001). Ya se ha mencionado que una buena tolerancia al etanol es vital para una adecuada eficiencia fermentativa, no en vano, la sensibilidad de las levaduras no-*Saccharomyces* al etanol es, probablemente, el factor determinante en su muerte a medida que prolifera *S. cerevisiae* durante la vinificación. No obstante, no se conocen apenas datos sobre esta respuesta a nivel molecular en tales levaduras.

#### 4.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una de las consecuencias más importantes del metabolismo celular. En todos los organismos, el metabolismo aeróbico supone la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) debido principalmente a la actividad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Aunque el oxígeno molecular es relativamente poco reactivo, puede sufrir una reducción parcial para formar una serie de ROS, entre las que se incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que son capaces de reaccionar con iones metálicos y producir el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), altamente reactivo. La acumulación de ROS en el interior celular no ocurre solo como una consecuencia del metabolismo celular, la presencia de agentes pro-oxidantes en el medio, como el propio  $H_2O_2$  o metales pesados puede promover la acumulación intracelular de ROS. Cuando los niveles de ROS superan la capacidad de respuesta de los mecanismos de defensa celulares se produce un estrés oxidativo, que provoca daños a diferentes niveles: peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daños genéticos a través de la modificación del DNA.

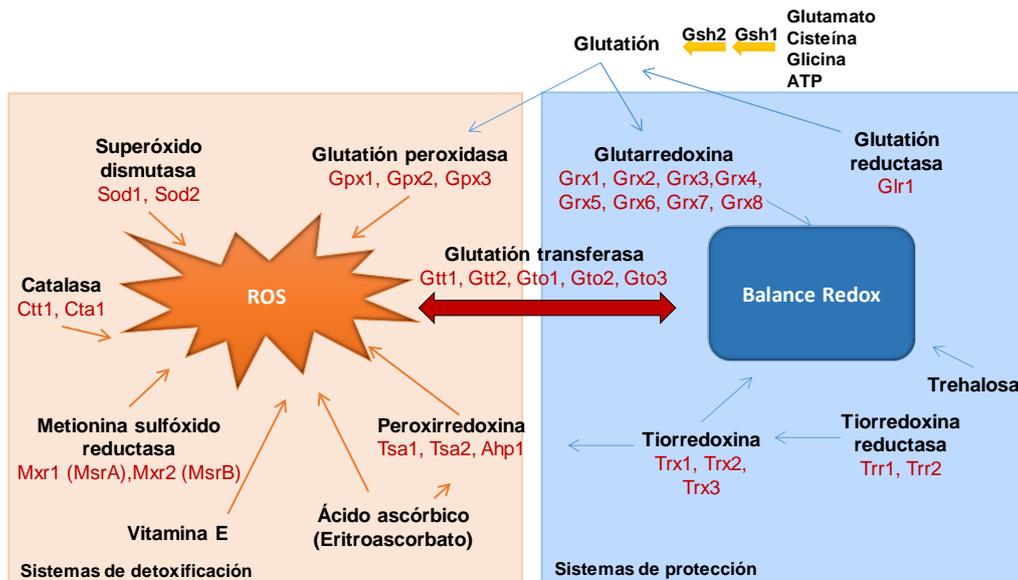
La forma protonada del anión superóxido y el radical hidroxilo generalmente inician el proceso autocatalítico de **peroxidación lipídica**. El proceso de peroxidación lipídica produce numerosos productos oxidados, principalmente hiperóxidos de lípidos (LOOH). El malondialdehído (MDA) es el principal subproducto de la peroxidación lipídica y parece poseer una elevada capacidad mutagénica (Esterbauer et al., 1990). El MDA se ha empleado durante años como biomarcador de peroxidación lipídica gracias a que su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBAR) genera un producto coloreado fácilmente detectable (Ayala et al., 2014). A nivel celular, la peroxidación lipídica produce un aumento de la fluidez de membrana, un eflujo de solutos citosólicos y una pérdida de actividad de las proteínas de membrana, que de forma última pueden llevar a una desintegración de la membrana y a la muerte celular (revisado en Avery, 2011).

Los mecanismos de **oxidación proteica** y su impacto en la estructura y función de las proteínas han sido ampliamente estudiados (Cecarini et al., 2007). Algunas proteínas

son más susceptibles que otras a la oxidación mediada por ROS, en función de su contenido en residuos aminoacídicos sensibles a oxidación (como la cisteína), su localización subcelular y su conformación. El principal producto de la oxidación proteica es la producción de grupos carbonilo. Los grupos carbonilo se pueden formar por la reacción con subproductos de la peroxidación lipídica. La consecuencia más relevante de la formación de grupos carbonilo es su posible reacción con los grupos  $\alpha$ -amino de los residuos de lisina, que lleva a la formación de uniones intra e intermoleculares, que pueden promover la formación de agregados proteicos que se acumulan en el interior celular y promueven una función anormal de los mecanismos celulares (Cecarini et al., 2007).

El radical hidroxilo y el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) son los principales causantes de **oxidación del DNA** mediada por ROS. Aunque la detección de daños en el DNA es común durante el estrés oxidativo, no está del todo claro que este daño sea el principal causante de la muerte celular asociada a ROS, especialmente en células eucariotas (Avery, 2011).

La mayoría de los estudios sobre el estrés oxidativo en levaduras se han llevado a cabo mediante la inducción de estrés empleando un único compuesto, como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, dado que las células son capaces de responder a las ROS mediante respuestas específicas a cada tipo de agente oxidante, no se puede considerar a ningún compuesto como representante general de estrés oxidativo (Temple et al., 2005). Las levaduras, como todos los organismos, han desarrollado múltiples sistemas de defensa frente al daño oxidativo, que se pueden diferenciar en dos grandes grupos: el primero actúa directamente eliminando las ROS, mientras que el segundo actúa como regulador redox y se encarga de mantener el balance redox en el interior celular y de proteger a los componentes celulares de la oxidación (Figura 1.5). Ambos sistemas operan conjuntamente, para asegurar la máxima protección celular (Herrero et al., 2008; Morano et al., 2012). A continuación, se describen los principales mecanismos de defensa antioxidante en *S. cerevisiae*.



**Figura I.5:** Sistemas de defensa antioxidante en *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Herrero et al., 2008).

Las **catalasas** son las enzimas encargadas de la dismutación del  $H_2O_2$  en agua y oxígeno. En *S. cerevisiae* encontramos dos catalasas, la catalasa peroxisomal A, codificada por *CTA1*, y la catalasa citosólica T, codificada por *CTT1*. La expresión de *CTA1* está coordinada con el metabolismo peroxisomal de ácidos grasos, lo que sugiere que Cta1p podría tener un papel en la detoxificación del  $H_2O_2$  generado en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Hiltunen et al., 2003). Ctt1p tiene un papel más general en la respuesta a estrés oxidativo, ya que la expresión de *CTT1* se induce en numerosas situaciones de estrés, entre las que se incluyen el estrés térmico, osmótico, por ayuno o por  $H_2O_2$ , de manera dependiente de la respuesta general de estrés (Martínez-Pastor et al., 1996). Ctt1p juega un papel importante en la resistencia a la deshidratación, manteniendo el equilibrio redox intracelular por la eliminación de  $H_2O_2$  (França et al., 2005). Durante la propagación industrial de *S. cerevisiae*, una elevada actividad catalasa basal, así como su inducción durante el proceso de secado, están relacionadas con una mayor viabilidad de la LSA (Gamero-Sandemetro et al., 2014).

Las **superóxido dismutasas** (SODs) convierten el anión superóxido en peróxido de hidrógeno, que es reducido por las catalasas y las peroxirredoxinas. En levaduras encontramos la superóxido dismutasa citoplasmática (Cu,Zn-SOD), codificada por *SOD1*, y la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD), codificada por *SOD2*. Sod1p está implicada en la eliminación de  $O_2^-$  del citoplasma, del espacio intermembrana mitocondrial y probablemente del peroxisoma (revisado en Morano et al., 2012). Sod2p

tiene un papel principal durante la fase estacionaria, seguramente debido a la formación de  $O_2^-$  por respiración mitocondrial (Longo et al., 1996).

Las **metionina sulfóxido reductasas** (MSRs) son las enzimas encargadas de revertir la oxidación del sulfóxido de metionina en metionina. La metionina es particularmente susceptible a la oxidación y las MSRs se encargan de su protección mediante la reducción dependiente de tiol de los residuos de metionina oxidados, lo que es importante ya que significa que la oxidación de la metionina es reversible y puede participar en la detoxificación de ROS (Morano et al., 2012).

Respecto a los sistemas de control del estado redox, *S. cerevisiae*, como la mayoría de organismos eucariotas, contiene uno denominado **sistema tiorredoxina**. Las tiorredoxinas son pequeñas proteínas oxidoreductasas que contienen dos residuos de cisteína implicados en la reducción de grupos tiol. Este sistema comprende dos tiorredoxinas (*TRX1* y *TRX2*) y una tiorredoxina reductasa (*TRR1*) que obtiene el poder reductor del NADPH (Gan, 1991). Las tiorredoxinas son utilizadas como sustrato de oxidación por las **peroxirredoxinas** y son reducidas directamente gracias al poder reductor de Trr1p. Bajo condiciones de estrés oxidativo, los tioles de las cisteínas son dianas susceptibles a oxidación y pueden sufrir modificaciones reversibles y/o irreversibles que produzcan cambios en su actividad. Las peroxirredoxinas poseen residuos de Cys que emplean para reducir peróxidos, y se dividen en dos grupos, en función del número de residuos de Cys catalíticas: 1-Cys y 2-Cys. Durante su proceso catalítico, las cisteínas catalíticas de las peroxirredoxinas se oxidan y deben ser recicladas por la actividad de las tiorredoxinas. En levaduras se han encontrado tres peroxirredoxinas citoplasmáticas (Tsa1p, Tsa2p y Ahp1p), una nuclear (Dot5p) y una mitocondrial (Prx1p) (revisado en Herrero et al., 2008; Morano et al., 2012). Los niveles de Prx1p, Ahp1p y Tsa1p aumentan a lo largo del proceso de propagación de biomasa, como respuesta al estrés oxidativo al que se ven sometidas las levaduras durante el proceso (Gómez-Pastor et al., 2010a). Simulaciones a escala de laboratorio del proceso de propagación industrial de biomasa han demostrado que la sobreexpresión de *TRX2* aumenta el rendimiento en biomasa y provoca una disminución del daño por oxidación en lípidos y proteínas (Gómez-Pastor et al., 2010b). Además, la sobreexpresión de Trx2p correlaciona con una mejora de la capacidad fermentativa de la LSA, debida a una mayor tolerancia al estrés oxidativo (Gómez-Pastor et al., 2012). En condiciones de vinificación, el mutante *trx1Δ trx2Δ* presenta crecimiento reducido y una baja capacidad fermentativa (Picazo et al., 2019), lo que resalta la importancia de los sistemas de protección antioxidante a lo largo de todo el proceso de producción de vino.

El **glutati3n** (GSH) es un trip3ptido (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina) de presencia ubicua en procariotas y eucariotas que tiene funciones directas e indirectas en numerosos procesos biol3gicos, como la s3ntesis de prote3nas, la s3ntesis de DNA, la modulaci3n de actividades enzim3ticas, la protecci3n celular o el metabolismo de ROS (Schafer y Buettner, 2001). El glutati3n es, generalmente, el compuesto sulfhidrilo de bajo peso molecular m3s abundante en la mayor3a de organismos. La s3ntesis de GSH depende de los genes *GSH1* ( $\gamma$ -glutamilciste3na sintetasa) y *GSH2* (glutati3n sintetasa) (Grant et al., 1997). El glutati3n es el principal agente de control redox en levaduras, requerido como agente reductor incluso en condiciones 3ptimas de crecimiento. El glutati3n reducido es capaz de reaccionar con diferentes ROS, contribuyendo al control del balance redox intracelular, de forma que dos mol3culas de glutati3n reducido se oxidan y se unen mediante un puente disulfuro formando una mol3cula de glutati3n oxidado (GSSG) (Morano et al., 2012). La forma m3s abundante en el interior celular es la forma reducida, gracias a la acci3n de la glutati3n reductasa, descrita a continuaci3n. El glutati3n participa activamente en la resistencia a la deshidrataci3n. Tras este proceso se observa un aumento de la acumulaci3n de este metabolito (Gamero-Sandemetro et al., 2014). De hecho, la deleci3n de *GSH1* o *GSH2* origina mutantes hipersensibles a deshidrataci3n (Espindola et al., 2003).

El uso de glutati3n como agente de control redox es posible gracias, no solo a la s3ntesis *de novo* de glutati3n reducido, sino tambi3n al reciclaje del glutati3n oxidado. La **glutati3n reductasa** (*GLR1*) es una oxidorreductasa dependiente de NADPH que cataliza la conversi3n de GSSG en GSH. Glr1p tiende a acumularse en regiones celulares con un elevado flujo de electrones, en las que se generan ROS (revisado en Couto et al., 2016). Tras la deshidrataci3n, se produce una inducci3n de la actividad glutati3n reductasa, en respuesta al estr3s oxidativo generado en estas condiciones (Gamero-Sandemetro et al., 2014).

Las **glutarredoxinas** (Grx) son peque3as oxidorreductasas dependientes del glutati3n. La glutati3n reductasa transfiere electrones desde el NADPH a las glutarredoxinas v3a glutati3n. En levadura se han descrito ocho glutarredoxinas diferentes (Grx1-8) con papeles en numerosos procesos celulares, incluidos el plegamiento de prote3nas, el metabolismo del azufre y la protecci3n frente a ROS. Grx1p y Grx2p tienen, ambas, funci3n de oxidorreductasas dependientes de GSH, pero parecen tener funciones celulares diferentes. *GRX1* responde al estr3s oxidativo inducido por  $O_2^-$ , mientras que *GRX2* es sensible al  $H_2O_2$  (revisado en Herrero et al., 2010; Morano et al., 2012). En *S. cerevisiae*, encontramos dos glutati3n transferasas (Gtt1p y Gtt2p) que cooperan con Grx1/2p en la protecci3n frente a hidroper3xidos y

compuestos xenobióticos. Por último, las **glutación peroxidadas** (Gpx) participan en la defensa enzimática frente al estrés oxidativo causado por hidroperóxidos. Reducen el  $H_2O_2$  y otros hidroperóxidos orgánicos, como hidroperóxidos de ácidos grasos, usando el poder reductor del GSH (Michiels et al., 1994).

### 4.3 Papel del glucógeno y la trehalosa en la respuesta a estrés

El glucógeno y la trehalosa son los depósitos de glucosa más importantes en *S. cerevisiae*. El glucógeno es un polisacárido formado por cadenas ramificadas de glucosa, sintetizado por la glucógeno sintasa, codificada principalmente por el gen *GSY2* (Farkas et al., 1991). La degradación del glucógeno depende de la glucógeno fosforilasa (Gph1p), que permite la utilización de la glucosa como fuente de carbono. La actividad de Gsy2p y Gph1p está regulada por la ruta PKA, de forma que en presencia de glucosa se inhibe la síntesis de glucógeno por fosforilación de estas dos enzimas (François y Parrou, 2001). La principal función del glucógeno en la levadura es la de actuar como reserva de fuente de carbono, necesaria para el correcto funcionamiento de la célula cuando esta se agota en el medio. La acumulación de glucógeno tiene lugar durante el cambio diáuxico y su degradación tiene lugar durante la fase estacionaria del crecimiento (François y Parrou, 2001).

La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil (1-1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un disacárido ampliamente distribuido en la naturaleza. Las funciones que desempeña son diversas y dependen del organismo analizado. Por ejemplo, sirve como fuente de energía en algunos insectos, actúa como componente estructural de la pared celular en algunas bacterias, participa en la regulación del crecimiento de plantas y en el control del flujo glicolítico en levaduras. Además, en numerosos organismos, incluida la levadura, actúa como molécula de protección frente a estrés (Argüelles, 2000; Eleutherio et al., 2015).

En *S. cerevisiae*, la síntesis de la trehalosa tiene lugar en el citosol en dos reacciones secuenciales. En la primera la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (Tps1p) cataliza la síntesis del intermediario trehalosa-6-fosfato (T6P) a partir de glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa. En la segunda reacción, la T6P es desfosforilada por acción de la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tps2p) para la formación de trehalosa. Tps1p y Tps2p forman parte del complejo multienzimático trehalosa sintasa junto con otras dos subunidades, Tsl1p y Tps3p (revisado en Eleutherio et al., 2015). Es interesante mencionar el papel regulador de la T6P. Células deficientes en Tps1p son incapaces de crecer en glucosa, a pesar de que las enzimas glicolíticas están activas. La T6P regula la glicólisis a través de la inhibición de las hexoquinas Hxk1p y Hxk2p (Blázquez et al., 1993; François y

Parrou, 2001). Tps1p es indispensable para un correcto crecimiento en azúcares fermentables, dado que la T6P promueve la fermentación y la represión por glucosa (Vicente et al., 2018). Por otro lado, la hidrólisis de la trehalosa depende de las trehalasas. En *S. cerevisiae* se encuentran dos actividades diferentes: la trehalasa neutra (Nth1p y Nth2p) y ácida (Ath1p). Nth1p se localiza en el citoplasma y tiene su actividad máxima a pH 7.0 (Elbein et al., 2003). Nth2p, es un parálogo de Nth1p, para el que no se ha descrito actividad trehalasa y se ha propuesto como un posible regulador de Nth1p (Eleutherio et al., 2015). Ath1p se localiza en la vacuola y tiene su actividad máxima a pH 4.5 (Huang et al., 2007). Se ha descrito que Nth1p es la principal responsable de la degradación y reciclaje de la trehalosa endógena (Nwaka et al., 1995), mientras que Ath1p participa en la utilización de la trehalosa exógena (Nwaka et al., 1996). Sin embargo, la delección de los genes *ATH1* y *NTH1* mejora la capacidad de supervivencia a la deshidratación, ya que la inhibición de la degradación y movilización de este metabolito permite aumentar sus niveles intracelulares (Garre et al., 2009).

Las levaduras industriales acumulan una gran cantidad de trehalosa, que puede alcanzar hasta un 15 – 20 % del peso seco de la célula (Degre, 1993; Garre et al., 2010). Numerosos estudios han resaltado la importancia de la trehalosa en la supervivencia a la deshidratación (revisado en Dupont et al., 2014; Rapoport et al., 2019). Durante la deshidratación, la trehalosa actúa reemplazando moléculas de agua, formando puentes de hidrógeno con el grupo fosfato de los lípidos. Este reemplazo permite el mantenimiento de la integridad de membrana al mantener la separación necesaria entre los fosfolípidos de membrana cuando las levaduras están en estado seco (Crowe et al., 1992). La otra gran propiedad de protección a nivel molecular de la trehalosa reside en su capacidad para prevenir la agregación de proteínas, ya que ayuda a mantener la conformación nativa de las proteínas cuando se produce pérdida de agua (Elbein et al., 2003).

En levaduras la acumulación de trehalosa se produce en condiciones de limitación de fuente de carbono, tanto durante el cambio diáuxico como durante la fase estacionaria. Además, las levaduras en crecimiento exponencial pueden acumular grandes cantidades de trehalosa cuando se ven sometidas a un estrés leve, como tratamientos a 37 °C. En condiciones de propagación de biomasa se observa una clara inducción de la acumulación de trehalosa como consecuencia de la deshidratación (Gamero-Sandemetro et al., 2014). Tratamientos con trehalosa exógena previos a la deshidratación permiten una mayor supervivencia de las levaduras al proceso (Eleutherio et al., 2015, 1993).

#### 4.4 Papel de la membrana celular en la adaptación a condiciones de estrés

Las membranas biológicas conforman la primera línea de separación entre el interior celular y el medio exterior. Están principalmente formadas por proteínas y fosfolípidos, siendo estos últimos, el principal elemento estructural de las membranas. Los fosfolípidos están compuestos por una molécula de alcohol (glicerol o esfingosina), a la que se unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato que se une mediante un enlace fosfodiéster a otras moléculas. La diversidad de fosfolípidos depende de las diferentes combinaciones posibles de ácidos grasos (revisado en Klug y Daum, 2014). A su vez, los ácidos grasos son moléculas lipídicas formadas por cadenas hidrocarbonadas lineales de diferente longitud, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Son las moléculas básicas a partir de las cuales se construyen los lípidos complejos. La composición de ácidos grasos de la membrana de *S. cerevisiae* es sencilla, los más abundantes son el ácido palmitoleico y el ácido oleico (C16:1 y C18:1), seguidos del ácido palmítico y el ácido esteárico (C16:0 y C18:0), y en considerablemente menor proporción otros como el ácido mirístico y el ácido cerótico (C14: y C26:0) (Daum et al., 1998; Viljoen et al., 1986). Aunque la composición puede variar en función de la cepa y las condiciones de crecimiento (Díaz-Hellín et al., 2014), los ácidos grasos predominantes tienen una cadena de 16 o 18 carbonos, son monoinsaturados y no se producen ácidos grasos poliinsaturados (Stukey et al., 1990). La síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el citosol y la mitocondria, seguida de un proceso de elongación y desaturación en el retículo endoplasmático. El primer paso de la síntesis está catalizado por la acetil-CoA-carboxilasa (*ACC1*), que forma malonil-CoA a partir de acetil-CoA. En el citosol, la síntesis de ácidos grasos a partir del malonil-CoA es llevada a cabo por el complejo hexamérico ácido graso sintasa (*FAS*, *Fatty Acid Synthase*), formado por 6 subunidades Fas1p y 6 subunidades Fas2p. En la mitocondria, el complejo ácido graso sintasa está formado por seis proteínas diferentes, cada una con una actividad diferente: Acp1p, Cem1p, Oar1p, Htd2p, Etr1p y Ppt2p. La elongación de los ácidos grasos es llevada a cabo por las elongasas codificadas por *ELO1*, *ELO2* y *ELO3*. La desaturación de todos los ácidos grasos la lleva a cabo Ole1p, la única desaturasa del genoma de *S. cerevisiae*. Además de la síntesis *de novo*, las levaduras también pueden tomar ácidos grasos del ambiente, gracias a la acción de las acil-CoA sintasas Fat1p, Faa1p, Faa2p, Faa3p y Faa4p. Los ácidos grasos internalizados y activados con coenzima A pueden ser empleados para la síntesis de lípidos complejos, almacenados en partículas lipídicas o degradados por  $\beta$ -oxidación (revisado en Klug y Daum, 2014).

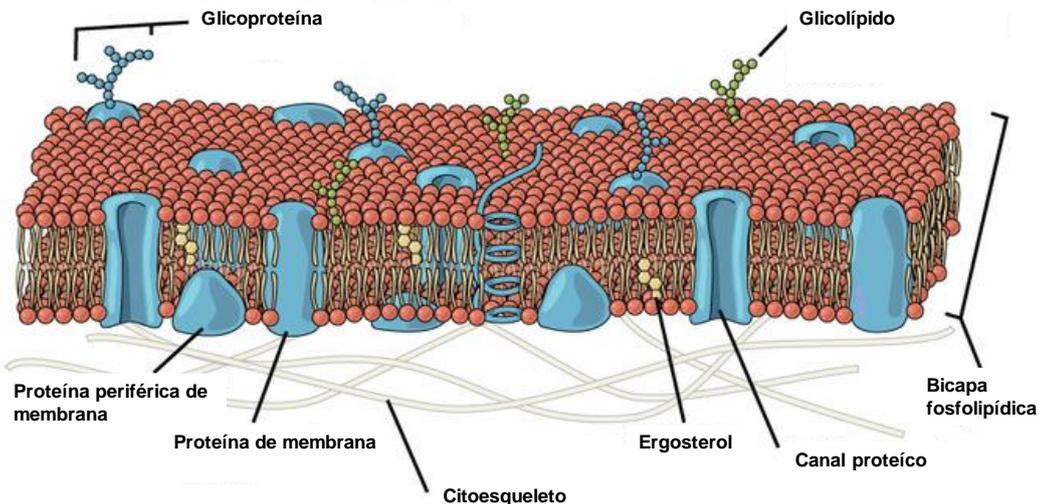
Otro grupo esencial de lípidos para mantener la integridad de membrana y la viabilidad celular son los esteroides, que juegan un papel determinante en la tolerancia a etanol. El principal esteroide en levaduras es el ergosterol (Daum et al., 1998). Desde el punto de vista estructural, el ergosterol está formado por tres anillos hexagonales y uno pentagonal, una cadena lateral de 8 o más átomos de carbono en el carbono 17 y un grupo alcohol o hidroxilo (-OH) en el carbono 3 que facilita su inserción en membranas celulares. La biosíntesis del ergosterol es un proceso complejo, en el que están involucradas hasta 30 enzimas, conocidas como proteínas Erg (Klug y Daum, 2014). Como se ha mencionado anteriormente, la biosíntesis de esteroides requiere oxígeno, por lo que los genes involucrados en esta ruta ven inducida su transcripción en presencia de oxígeno, mientras que en condiciones de ausencia de oxígeno, se induce la expresión de genes (*AUS1* y *PDR11*) que codifican proteínas implicadas en la toma de esteroide del ambiente (Zavrel et al., 2013).

Como se ha mencionado con anterioridad, una producción excesiva de ROS puede sobrepasar la capacidad de los mecanismos celulares de defensa y causar daños directos en los lípidos de membrana. Los fosfolípidos de membrana son particularmente susceptibles al daño oxidativo mediado por ROS, debido a su contenido en ácidos grasos insaturados. La peroxidación lipídica implica una pérdida de la integridad estructural de la membrana, que puede desencadenar la muerte celular (Avery, 2011). No obstante, el estrés oxidativo no es la única situación medioambiental que tiene un efecto adverso sobre la membrana citoplasmática. Diferentes tipos de estrés ambiental, como el térmico y el osmótico, causan alteraciones en las propiedades físicas de las membranas. La modificación de las propiedades físicas de los lípidos de membrana puede tener un efecto directo sobre la función de las proteínas de membrana y, de forma similar, los cambios físicos en la membrana se consideran el *input* que inicia la respuesta frente al estrés y que afecta a la expresión de genes que participan en la aclimatación de las células a condiciones de estrés (revisado en Beney y Gervais, 2001; Los y Murata, 2004).

Los fosfolípidos de membrana tienen relativa libertad de movimiento dentro de la misma, por lo que tradicionalmente se ha descrito a la membrana como un 'mosaico fluido' (Singer y Nicolson, 1972) (Figura I.6). El desorden molecular y la capacidad de movilidad molecular dentro de la bicapa lipídica se conocen como fluidez de membrana. La fluidez de membrana depende del grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, de la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados y del contenido en ergosterol (Ballweg y Ernst, 2017; Beney y Gervais, 2001; Bossie y Martin, 1989). El efecto de diferentes tipos de estrés sobre la fluidez de membrana se

## Introducción

conoce desde hace tiempo. En *S. cerevisiae*, existe una correlación entre una mayor fluidez de membrana, por un mayor grado de insaturación, y una mayor resistencia a ciertos tipos de estrés, como estrés por etanol o por frío (Beltran et al., 2008; Casey e Ingledew, 1986).



**Figura I.6:** Modelo de mosaico fluido. Modificado de *OpenStax Biology* (openstax.org).

A temperaturas bajas, la fluidez de membrana disminuye, mientras que temperaturas elevadas tienen el efecto opuesto, causando una fluidización de la membrana que puede llevar a la desintegración de la bicapa lipídica (revisado en Los y Murata, 2004). El estrés hiperosmótico provoca una disminución de la fluidez de membrana, de forma similar al estrés por frío (Laroche et al., 2001). El efecto del estrés hipoosmótico sobre la membrana no se ha estudiado en profundidad, aunque se ha sugerido que pueda tener un efecto de fluidización de la membrana similar al estrés térmico (Los y Murata, 2004). Las perturbaciones en las condiciones de crecimiento que afectan a la membrana celular generalmente pueden ser compensadas por la célula, que es capaz de mantener una fluidez de membrana adecuada principalmente mediante la biosíntesis *de novo* de lípidos de membrana y mediante la remodelación de la cadena de los ácidos grasos (Ballweg y Ernst, 2017; Ernst et al., 2016) Estos procesos requieren de periodos relativamente largos de tiempo, de manera que es un proceso de adaptación a largo plazo y no una respuesta a estrés inmediata.

La composición de la membrana plasmática tiene un papel muy importante en la supervivencia a las condiciones de deshidratación. La deshidratación resulta en una pérdida de la fluidez de membrana por la formación de una fase sólida (gel) en la

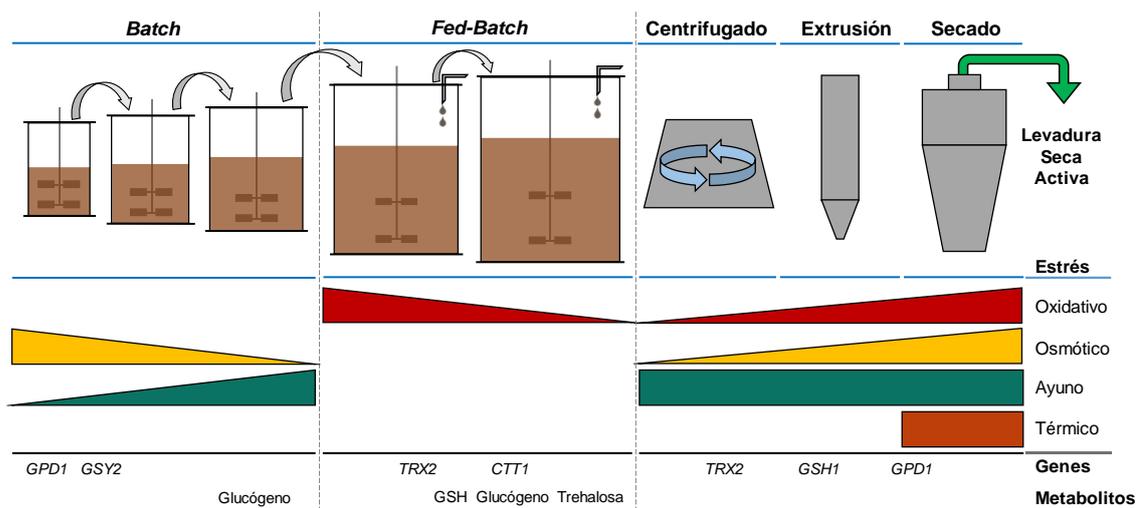
membrana, debida a las interacciones de van der Waal's entre las cadenas acilo de los fosfolípidos, al disminuir la distancia entre estos (revisado en Rapoport et al., 2019). El daño que sufre la membrana depende directamente de la cinética de deshidratación y rehidratación. En particular, se ha observado que una deshidratación rápida conlleva una pérdida de la integridad de membrana, por la formación de vesículas que se mueven al interior celular (Dupont et al., 2010), mientras que una deshidratación lenta promueve una reorganización espacial de los componentes de la membrana (Lemetais et al., 2012). Empleando biomasa deshidratada de levaduras vínicas, Redón et al., (2008) observaron que existe una correlación entre una mayor fluidez de membrana y una resistencia a la deshidratación, ya que la biomasa deshidratada de aquellas levaduras con un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados presentó una mayor viabilidad.

Como se ha mencionado, *S. cerevisiae* solo posee una desaturasa de ácidos grasos, Ole1p, y no es capaz de producir ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, en otras levaduras se han encontrado hasta tres desaturasas diferentes ( $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  y  $\Delta 15$ ), como es el caso de *Kluyveromyces lactis* (Kainou et al., 2006; Santomartino et al., 2017). La presencia de estas desaturasas en levaduras no convencionales explica la habilidad de estas para acumular los ácidos grasos poliinsaturados linoleico (C18:2) y  $\gamma$ -linoleico (C18:3), una característica común a múltiples especies de levaduras vínicas, entre las que se incluyen *T. delbrueckii*, *S. pombe*, *Z. bailii*, *K. lactis*, *M. pulcherrima* o *W. anomalus* (Murakami et al., 1995; Rozès et al., 1992). Recientemente, la acumulación de ácidos grasos insaturados por parte de *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* ha ayudado a explicar la mayor resistencia a estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de estas especies en comparación con *S. cerevisiae* (Vázquez et al., 2019).

#### **4.5 Estrés durante el proceso de propagación de biomasa**

Durante su propagación industrial, las levaduras se ven sometidas a numerosos cambios metabólicos y fluctuaciones en las condiciones físico-químicas de cultivo que resultan en situaciones de estrés (Figura I.7). Como ya se ha mencionado, la propagación de biomasa se lleva a cabo en condiciones de cultivo aeróbicas, en dos fases de crecimiento, *batch* y *fed-batch*, empleando melaza como medio de cultivo (Pérez-Torrado et al., 2015).

## Introducción



**Figura I.7:** Representación esquemática de las diferentes fases de producción de LSA. Se muestran las principales condiciones de estrés y los cambios en estas a lo largo del proceso. Se indican los genes relacionados con la tolerancia a estrés empleados como marcadores, junto con los principales metabolitos protectores. Adaptado de Matallana y Aranda (2016).

En la fase *batch*, el principal estrés que se produce al inicio del cultivo, debido a la alta concentración de azúcares, es un estrés hiperosmótico, lo que promueve la síntesis del osmolito compatible glicerol, mediante la inducción de la expresión del gen implicado en su síntesis *GPD1*. El control de otros parámetros de cultivo, principalmente pH y temperatura, permite mantenerlos dentro de los valores óptimos para el crecimiento de las levaduras. Al final de la fase *batch*, a medida que se agotan los nutrientes del medio, se produce estrés por ayuno. Las condiciones aeróbicas de cultivo, necesarias para la adecuada producción de biomasa, causan un estrés oxidativo interno a lo largo del proceso, pero especialmente en la transición al metabolismo respiratorio impuesto en la fase *fed-batch*, pero que se inicia antes, cuando las levaduras agotan la sacarosa y pasan a respirar el etanol producido (Pérez-Torrado et al., 2005). Análisis transcriptómicos en simulaciones del crecimiento industrial han mostrado que se inducen numerosos genes de respuesta a estrés oxidativo, especialmente durante el cambio diáuxico que tiene lugar cuando se agotan los azúcares (Gómez-Pastor et al., 2010a). De forma similar, en estudios proteómicos se observa una mayor acumulación de proteínas con un papel en la protección frente a estrés oxidativo (Gómez-Pastor et al., 2010a). Además, durante el final de la fase *fed-batch* se produce la acumulación de metabolitos de protección y reserva, como el glutatión (Pérez-Torrado et al., 2005), la trehalosa y el glucógeno (Pérez-Torrado y Matallana, 2015).

La deshidratación produce la parada del crecimiento celular y daños severos en membranas, proteínas y estructuras celulares, que suponen una pérdida de viabilidad y vitalidad celular (Dupont et al., 2014; Rapoport et al., 2019). Durante el proceso de deshidratación las temperaturas empleadas hacen que las levaduras se vean sometidas a un estrés térmico. La pérdida de agua causa también un choque hiperosmótico y estrés oxidativo (França et al., 2007; Pérez-Torrado et al., 2015). Durante la deshidratación, se ha observado el aumento de marcadores de daño oxidativo, como un aumento de los niveles de peroxidación lipídica y de glutatión oxidado, y la inducción de genes con función antioxidante, como la tiorredoxina reductasa *TRR1* (Garre et al., 2010). Todo esto parece indicar que el daño oxidativo causado por radicales libres es el principal motivo por el cual las levaduras sufren una pérdida de viabilidad durante la deshidratación (Dupont et al., 2014). De hecho, existe una estrecha relación entre una adecuada defensa antioxidante durante el proceso de propagación de biomasa y una buena eficiencia tecnológica de la LSA obtenida al final del mismo (Gamero-Sandemetro et al., 2019, 2014).

#### **4.6 Estrés durante la vinificación**

Durante la fermentación alcohólica las levaduras también se ven sometidas a condiciones de estrés, que varían durante el proceso (revisado en Auesukaree, 2017; Orozco et al., 2019). Al inicio de la fermentación, la elevada concentración de azúcares en el mosto supone una elevada presión osmótica. Aunque *S. cerevisiae* está adaptada al bajo pH (3.0 – 3.5) al que se suele llevar a cabo la fermentación, este afecta a la toxicidad del SO<sub>2</sub> que se suele añadir a los mostos como desinfectante y antioxidante. La temperatura de fermentación se suele controlar para el correcto crecimiento de las levaduras, pero en algunos casos, la fermentación se realiza a temperaturas por debajo de 15 °C, por lo que la respuesta a estrés por frío puede llegar a parar la fermentación. A medida que avanza la fermentación se consume el oxígeno disuelto en el mosto, lo que crea una situación de crecimiento en condiciones limitantes de oxígeno que impide el crecimiento de las levaduras aeróbicas. Durante la vinificación, las levaduras entran en un estado quiescente, similar a la fase estacionaria (Virgilio, 2011), cuando la concentración de azúcares todavía es elevada. En este estado mantienen un catabolismo fermentativo de los azúcares y no se produce el cambio diáuxico. La causa de esta parada en el crecimiento es probablemente la disponibilidad de nitrógeno, que resulta el factor limitante para el crecimiento de las levaduras en condiciones de vinificación. Los mostos naturales son pobres en nitrógeno, por lo que usualmente

deben ser suplementados (Ribéreau-Gayon et al., 2006). A medida que la vinificación avanza se produce una acumulación de etanol. *S. cerevisiae* tiene una relativa tolerancia a este compuesto en comparación con otras levaduras que pierden su viabilidad más rápidamente. A pesar de esta resistencia, el estrés por etanol es el más prevalente al final de la fermentación, junto al estrés por ayuno. Bajo estas condiciones, al final de la fermentación, las levaduras empiezan a envejecer y a morir (Aranda et al., 2019).

## 5. Antioxidantes como herramienta biotecnológica

### 5.1 Compuestos antioxidantes

En su definición del término, Halliwell y Gutteridge (1989) indicaron que un antioxidante es toda aquella sustancia que, cuando se encuentra presente a concentraciones bajas en comparación con un sustrato oxidable, inhibe o retrasa significativamente la oxidación de dicho sustrato. Esta definición incluye tanto a compuestos de naturaleza no enzimática como aquellos de naturaleza enzimática, aunque esta sección se centra en los primeros, ya habiéndose descrito anteriormente las enzimas que eliminan ROS. Aunque en algunos casos un antioxidante puede poseer más de un mecanismo de acción, los antioxidantes se pueden clasificar en tres grandes grupos en base a su mecanismo de acción:

- Primarios: aquellos que impiden la formación de radicales libres.
- Secundarios: interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres, por inactivación o desplazamiento de estos.
- Terciarios: son compuestos que reparan el daño oxidativo en moléculas o se encargan de eliminar aquellas que han sido degradadas.

Todos los organismos vivos producen antioxidantes. Entre otras, las principales moléculas antioxidantes naturales son: tioles, melatonina, coenzima Q,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides y ácidos grasos (Pisoschi y Pop, 2015).

Los **tioles** interaccionan con prácticamente todos los oxidantes fisiológicos. Los principales tioles celulares, el glutatión y las tioredoxinas han sido descritos en el apartado 4.2.

La **melatonina** es una hormona sintetizada a partir del triptófano ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrada en bacterias, eucariotas unicelulares, algas,

hongos, plantas y animales (Tan et al., 2010). Aunque a lo largo de la evolución los organismos pluricelulares han adoptado a la melatonina para una gran diversidad de funciones, su primera función biológica en organismos unicelulares fue la de protección frente a estrés oxidativo (revisado en Tan et al., 2010). La melatonina y sus metabolitos tienen capacidad de detoxificar ROS como el radical hidroxilo o el anión superóxido (Poeggeler et al., 1994). Además de su acción directa sobre radicales libres, la melatonina tiene otros papeles en la defensa frente a estrés. Se ha descrito que la melatonina es capaz de interactuar con receptores de membrana y su efecto involucra la estimulación de sistemas celulares de defensa antioxidante, como las superóxido dismutasas o las glutatión peroxidasas (revisado en Reiter et al., 2018).

La **coenzima Q** es un lípido esencial que además de ser el principal portador de electrones en la cadena de transporte electrónico, ha demostrado ser útil en la protección frente a radicales libres (Beyer, 1992). Tiene un papel antioxidante fundamental, ya que se encarga de la protección frente a la peroxidación lipídica y del mantenimiento de la forma reducida de la vitamina E (Bentinger et al., 2007).

El  **$\alpha$ -tocoferol** (vitamina E) es un lípido isoprenoide sustituido. Su actividad es la primera defensa de las células para evitar la peroxidación de los lípidos de membrana. Las diferentes formas de la vitamina E actúan interrumpiendo la reacción de cadena con radicales libres como resultados de su capacidad de transferir el hidrógeno fenólico a un radical peroxilo libre (Jiang, 2014). Las formas naturales de la vitamina E son producidas por plantas, generalmente en semillas, aunque se han encontrado en también en frutos. Esto hace que la vitamina E sea prevalente en numerosos aceites vegetales (Chun et al., 2006).

El **ácido ascórbico** (vitamina C) es uno de los antioxidantes hidrosolubles más extendidos. El ácido ascórbico actúa detoxificando directamente los radicales hidroxilo, superóxido y peroxilo donando un electrón. La oxidación del ascorbato resulta en la producción del radical ascorbato, que es relativamente estable y se puede reducir de nuevo a ascorbato mediante reductasas dependientes de NADPH. (revisado en Du et al., 2012). Una característica muy importante del papel antioxidante de la vitamina C reside en su interacción sinérgica con la vitamina E. Como se ha mencionado, la vitamina E es liposoluble, y su producto de oxidación, el radical  $\alpha$ -tocoperoxil, puede ser reducido por el ascorbato, lo que permite mantener los niveles de  $\alpha$ -tocoferol e inhibir la oxidación lipídica (Du et al., 2012; Golumbic y Mattill, 1941). Las plantas y la mayoría de animales son capaces de sintetizar ascorbato a partir de la glucosa, aunque no es el caso del ser humano y otros primates, que no disponen del gen que codifica la L-

gulonolactona oxidasa (*GLO*) necesario para su síntesis (Nishikimisi et al., 1994), por lo que deben tomarlo de la dieta. *S. cerevisiae* es capaz de sintetizar un análogo del ascorbato de cinco carbonos, el eritroascorbato, que aunque ejerce cierta función antioxidante, no parece estar integrado en los sistemas de defensa antioxidante de la levadura (Spickett et al., 2000).

Los **carotenoides**, son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran en plantas y otros organismos fotosintéticos. Se han descrito más de 600 compuestos en este grupo, siendo el  **$\beta$ -caroteno** el mayoritario (Armstrong y Hearst, 1996). El papel antioxidante de los carotenoides, revisado por Jomova y Valko (2013), se basa en la reacción de estos con los radicales libres presentes en el interior celular. Sin embargo, la reacción de los carotenoides con radicales libres da lugar a la formación de epóxidos, cetonas y aldehídos que también pueden causar citotoxicidad.

Numerosos **compuestos fenólicos** poseen propiedades antioxidantes. Uno de los más relevantes es el **resveratrol**, un derivado del estilbeno. Este metabolito, se encuentra en grandes cantidades en la piel de la uva y en vinos tintos (Bavaresco et al., 2016). Se ha observado que tiene función antioxidante, que actúa como inhibidor de ciclooxigenasas, que participa en la proliferación de peroxisomas mediada por receptores y que induce la sintasa de óxido nítrico (Nakata et al., 2012; Venturini et al., 2010). Los **flavonoides**, presentes en frutas, verduras y otros alimentos de origen vegetal, se localizan en la interfase agua/membrana, donde atrapan radicales libres, formando radicales fenoxilo más estables y evitando el inicio de la peroxidación lipídica (Cotelle, 2001). El **ácido cafeico**, encontrado en todas las plantas, al tratarse de un precursor de la síntesis de la lignina, es otro compuesto fenólico con actividad antioxidante. Su derivado, el fenetil éster de ácido cafeico inhibe la peroxidación de lípidos (Kimura et al., 1985) y bloquea especies reactivas del oxígeno (Spagnol et al., 2019).

En el apartado 4.4 se ha descrito la importancia de los **ácidos grasos** y la composición de la membrana plasmática en la capacidad de responder a condiciones de estrés. En el caso particular del estrés oxidativo, se ha comprobado que la sobreacumulación de ácidos grasos poliinsaturados permite una adaptación al estrés oxidativo endógeno asociado a una mayor actividad catalasa (Cipak et al., 2008) y una mayor acumulación de glutatión (Andrisic et al., 2014). Por otro lado, se ha determinado que la suplementación con ácido oleico permite una reducción del daño oxidativo por una inducción de la actividad glutatión peroxidasa (Duval et al., 2002).

Existen numerosos ejemplos del uso de compuestos antioxidantes para mitigar el estrés oxidativo. En humanos, el consumo de alimentos y bebidas, incluido el vino, ricos en compuestos antioxidantes está asociado a la reducción del riesgo de sufrir enfermedades como la arterosclerosis, la artritis, la diabetes, el cáncer o enfermedades neurodegenerativas, debido a que estas están asociadas a una mayor acumulación de ROS (Rajendran et al., 2014). En levaduras, se ha estudiado el efecto de la suplementación de algunas de las moléculas antioxidantes citadas sobre el estrés oxidativo en levaduras de laboratorio (Amari et al., 2008; Dani et al., 2008; Lam et al., 2010; Orlandi et al., 2017). En el caso concreto de las levaduras vínicas, tratamientos con melatonina han resultado útiles para la reducción del estrés oxidativo en cepas vínicas de *S. cerevisiae* cultivadas con condiciones de laboratorio (Bisquert et al., 2018; Vázquez et al., 2017) y en levaduras vínicas de especies no convencionales (Vázquez et al., 2018). La suplementación del medio de crecimiento con ácido oleico y el ergosterol también ha resultado útil para la reducción del estrés oxidativo (Landolfo et al., 2010). Se ha observado que el uso de compuestos puros como el ácido cafeico, el tocoferol y el ácido ascórbico durante la propagación de biomasa son capaces de reducir el daño oxidativo en cepas vínicas de *S. cerevisiae*, lo que además provoca una mejora en determinados parámetros tecnológicos, como el crecimiento celular o la capacidad fermentativa (Gamero-Sandemetro et al., 2015).

En la actualidad existe una gran cantidad de conocimiento acerca del efecto de diferentes compuestos antioxidantes. El uso de compuestos químicos antioxidantes puros está muy extendido en la industria alimentaria, donde se emplean, principalmente, para alargar la vida útil de muchos alimentos (Kebede y Admassu, 2019). A pesar de que su efecto en la protección frente a estrés oxidativo en organismos vivos está descrito, la aplicación biotecnológica de antioxidantes en procesos industriales de producción de microorganismos que implican un elevado estrés oxidativo es prácticamente nula.

## **5.2 Aceites vegetales como fuente de antioxidantes**

Gran parte de los compuestos antioxidantes descritos en esta sección se encuentran de forma natural en los frutos y semillas de plantas. En todo el mundo se produce una gran variedad de aceites vegetales de diverso origen. Entre los aceites vegetales más consumidos en el mundo se encuentran los producidos a partir de palma, soja, girasol, colza y oliva. En general, la composición de los aceites vegetales se comprende de una fracción saponificable, que constituye un 98-99 % de su composición, y una fracción

insaponificable, también denominada componentes menores. La fracción saponificable está compuesta de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Entre los componentes menores encontramos una gran variedad de compuestos antioxidantes, como tocoferoles, polifenoles y carotenoides (López et al., 2010).

La capacidad antioxidante de diversos aceites vegetales ha sido estudiada mediante métodos de análisis químico (Marfil et al., 2011; Pellegrini et al., 2003; Sánchez et al., 2007; Szydłowska-Czerniak et al., 2008; Tuberoso et al., 2007). Además de su uso extendido en cocina, la capacidad antioxidante de los aceites vegetales se ha relacionado con un potencial efecto beneficioso en la prevención y tratamiento de determinadas patologías humanas (Gorzynik-Debicka et al., 2018; Lin et al., 2018; Nocella et al., 2017), por lo que su consumo en cantidades adecuadas en la dieta está recomendado. Existen numerosos estudios en modelos de mamíferos del efecto de diferentes aceites en la dieta, especialmente el aceite de oliva (Abenavoli et al., 2019; Sales et al., 2019; Si et al., 2014). Sin embargo, su potencial efecto beneficioso no se ha analizado en otros organismos.

### **5.2.1 Aceite de argán**

A partir de los frutos del árbol *Argania spinosa*, una especie endémica del suroeste de Marruecos y del oeste de Argelia, mediante un proceso que se ha mejorado en los últimos años, se extrae el aceite de argán (Guillaume y Charrouf, 2011). El aceite de argán tiene una gran importancia económica en Marruecos, con una producción anual de unas 4.000 toneladas. En su origen, el aceite de argán se ha empleado en la cocina tradicional marroquí, siendo una de las principales fuentes de grasas de la dieta. Recientemente, su comercialización se ha expandido a los mercados europeos, norteamericanos y asiáticos, como un aceite 'gourmet' que ha llegado a alcanzar precios de hasta 100 €/L (Cabrera-Vique et al., 2012). En la actualidad, además de como aceite comestible, el aceite de argán se encuentra como ingrediente en numerosos productos cosméticos debido a sus potenciales efectos beneficiosos (Guillaume y Charrouf, 2011).

El aceite de argán está caracterizado por su elevado contenido en ácidos grasos insaturados. Diversos estudios han indicado que es rico en ácido oleico (C18:1), linoleico (C18:2), esteárico (C18) y palmítico (C16), siendo el ácido oleico el predominante, con un porcentaje que oscila entre el 43 - 49 % (Cabrera-Vique et al., 2012; Charrouf y Guillaume, 2010). El contenido de ácido oleico del aceite de argán es superior al de otros aceites vegetales, como por ejemplo el aceite de girasol, soja o maíz, pero es menor que el de otros aceites como el aceite de oliva o el de cacahuete (López et al., 2010). Además de su contenido en ácidos grasos, el aceite de argán presenta

componentes minoritarios especialmente interesantes por sus propiedades antioxidantes, como polifenoles, tocoferoles (principalmente  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol), carotenoides, melatonina y coenzima Q10 (El Abbassi et al., 2014; López et al., 2013). En la revisión de Cabrera-Vique et al., (2012), se recoge una comparativa entre la capacidad antioxidante de distintos tipos de aceites, medida mediante diferentes análisis químicos y expresada como mmol de Trolox por kilogramo de aceite, una medida usada comúnmente en análisis de antioxidantes, y que permitió determinar que el aceite de argán es el aceite vegetal con una mayor capacidad antioxidante de entre los aceites analizados. En la Tabla I.1 se recogen los datos presentados en el trabajo citado.

**Tabla I.1:** Comparativa de la Capacidad Antioxidante (CA) de diferentes aceites alimentarios. Adaptado de Cabrera-Vique et al., (2012). ABTS: 2,2'-azinobis-(3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; FRAP: poder antioxidante de reducción férrica.

Método analítico	Aceite	CA (mmol Trolox/kg aceite)	Referencia
Dilución ABTS-n-hexano	Aceite virgen de argán	14.16 – 28.02	Marfil et al., (2011)
	Aceite virgen extra de oliva	1.53 – 2.69	Pellegrini et al., (2003)
	Aceite virgen extra de oliva	1.79	Pellegrini et al., (2003)
	Aceite de maíz	1.29	Pellegrini et al., (2003)
	Aceite de soja	2.20	Pellegrini et al., (2003)
	Aceite de girasol	1.17	Pellegrini et al., (2003)
	Aceite de cacahuete	0.61	Pellegrini et al., (2003)
Extracto ABTS-metanólico	Aceite virgen de argán	2.31 - 14.15	Marfil et al., (2011)
	Aceite virgen de oliva	0.78 – 2.64	Gorinstein et al., (2003)
	Aceite virgen extra de oliva	0.56 – 1.00	Sánchez et al., (2007)
Extracto DPPH-metanólico	Aceite virgen de argán	0.19 - 0.85	Marfil et al., (2011)
	Aceite de soja	0.41	Tuberoso et al., (2007)
	Aceite de oliva	0.42	Tuberoso et al., (2007)
	Aceite de maíz	0.45	Tuberoso et al., (2007)
	Aceite de cacahuete	0.08	Tuberoso et al., (2007)
	Aceite de girasol	0.16	Tuberoso et al., (2007)
	Aceite de cártamo	0.25	Tuberoso et al., (2007)
	Aceite de colza	0.26	Tuberoso et al., (2007)
	Aceite de linaza	0.19	Tuberoso et al., (2007)
	Aceite virgen extra de oliva	0.20 – 0.59	Sánchez et al., (2007)
	Aceite virgen extra de oliva	0.69 – 0.75	Gómez-Alonso et al., (2003)
Extracto FRAP-metanólico	Aceite virgen de argán	0.62 - 2.32	Marfil et al., (2011)
	Aceite refinado de cártamo	0.95 – 1.86	Szydłowska-Czerniak et al., (2008)
	Aceite virgen de cártamo	2.84 – 5.52	Szydłowska-Czerniak et al., (2008)
	Aceite de oliva	0.32 – 1.03	Szydłowska-Czerniak et al., (2008)
	Aceite virgen extra de oliva	0.62 – 1.67	Szydłowska-Czerniak et al., (2008)

## Introducción

La composición y la capacidad antioxidante del aceite de argán lo hacen especialmente interesante por su potencial efecto beneficioso en la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes e incluso cáncer (Monfalouti et al., 2010). Se ha empleado en ensayos con modelos animales, para reducir el estrés oxidativo asociado a alguna de estas patologías (Bakour et al., 2018; El Midaoui et al., 2016; Menni et al., 2019) Recientemente, el tratamiento con aceite de argán durante la propagación de biomasa de levaduras vínicas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* ha resultado en una disminución del estrés oxidativo. En concreto, el tratamiento con aceite de argán produce una disminución de la peroxidación lipídica, asociada a un aumento de la acumulación de trehalosa y de la actividad glutatión reductasa, y a una disminución de los niveles de glutatión oxidado. Todos estos cambios en parámetros redox van acompañados de una mejora de determinados parámetros tecnológicos, como el crecimiento celular o la capacidad fermentativa (Gamero-Sandemetrio et al., 2019, 2015).

## **Objetivos**

---

## Objetivos

El objetivo general de este trabajo es la caracterización fisiológica, bioquímica y tecnológica de levaduras vínicas no-*Saccharomyces* en condiciones de propagación y deshidratación de biomasa, así como la adaptación tecnológica de dichos procesos para la obtención de cultivos iniciadores de dichas levaduras en forma de levadura seca activa.

Los objetivos específicos son:

1. Caracterización a nivel fisiológico y tecnológico de especies de levaduras no-*Saccharomyces* de interés enológico en simulaciones del proceso de propagación y deshidratación de biomasa y caracterización bioquímica de la respuesta a estrés oxidativo a lo largo del mismo.
2. Análisis del efecto del tratamiento con compuestos antioxidantes naturales de grado alimentario sobre el comportamiento tecnológico y la respuesta frente a estrés oxidativo de levaduras tanto no-*Saccharomyces* como de cepas de *S. cerevisiae*.
3. Adaptación del proceso de propagación industrial para la producción de levaduras no-*Saccharomyces* mediante modificaciones del proceso de propagación y el escalado de la producción de levadura seca activa en biorreactor. Caracterización fisiológica y tecnológica del proceso.
4. Ensayo de la biomasa así obtenida en fermentaciones mixtas con levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* y estudio de los parámetros químicos de los vinos producidos.



## **Materiales y Métodos**

---



## 1. Materiales

### 1.1 Cepas de microorganismos

Las cepas de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla M.1.

**Tabla M.1:** Especies y cepas de levaduras empleadas en este trabajo.

Espece	Cepa	Origen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lalvin T73	Lallemand Inc.
	D170	Lallemand Inc.
	D301	Lallemand Inc.
<i>Hanseniaspora vineae</i>		Lallemand Inc.
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>		Lallemand Inc.
<i>Metschnikowia fructicola</i>		Lallemand Inc.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		Lallemand Inc.
<i>Starmerella bacillaris</i>		Lallemand Inc.
<i>Torulaspora delbrueckii</i>		Lallemand Inc.
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>		Lallemand Inc.
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		Lallemand Inc.

### 1.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla M.2.

**Tabla M.2:** Secuencias de oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Uso	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Amplificación región ITS1-5.8S rDNA-ITS2	Esteve-Zaroso et al., 1999
ITS4	TCCTCGCTTATTGATATGC		
NL-1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Amplificación del dominio D1/D2 26S rDNA	Kurtzman y Robnett, 1998
NL-4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		

## 2. Medios y condiciones de cultivo

### 2.1 Condiciones de cultivo a escala de laboratorio

Para el cultivo de levaduras en condiciones de laboratorio se empleó un medio derivado de la melaza que se denominó 'medio melaza'. Para su preparación, se diluyó melaza de remolacha hasta alcanzar una concentración de sacarosa del 6.1 % (p/v) que se suplementó con una concentración final de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.75 % (p/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.35 % (p/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075 % (p/v) y una solución de vitaminas (biotina 0.5 mg/L, pantotenato cálcico 1 mg/L e hidrocloreto de tiamina 1 mg/L). El pH de la melaza se ajustó a 4.5 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  42 % (v/v). La melaza y las sales se autoclavaron por separado y la solución de vitaminas se esterilizó por filtrado con filtros de 0.45  $\mu\text{m}$ . En todos los casos el cultivo de levaduras en medio líquido se realizó en matraces a 30 °C con agitación orbital (160 rpm) durante 24 horas, siguiendo el crecimiento mediante la medida de la  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ .

En los ensayos en los que las levaduras crecieron en presencia de aceites, estos se añadieron para alcanzar una concentración final de ácido oleico en melaza de 6 mg/mL (Gamero-Sandemetro et al., 2015). Para ello, la melaza se suplementó con 12.7  $\mu\text{L/mL}$  de aceite de argán (NaturGreen, España), 8.6  $\mu\text{L/mL}$  de aceite de oliva (La Masía, España), 21.4  $\mu\text{L/mL}$  de aceite de girasol (La Masía, España), 25  $\mu\text{L/mL}$  de aceite de maíz (Coosur, España) o 14.6  $\mu\text{L/mL}$  de aceite de sésamo (Sabor del Monte, España), de acuerdo con la composición en dicho ácido graso proporcionada por el fabricante y según lo descrito en Cabrera-Vique et al. (2012). En los ensayos en los que se empleó melaza hidrolizada esta fue tratada con HCl (1 % (v/v)) durante 1 hora a 80 °C, tras lo cual se ajustó el pH a 4.5 con NaOH 5 M. En los ensayos en los que se empleó melaza diluida, ésta se preparó diluyéndola hasta alcanzar una concentración de sacarosa del 2 % (p/v) y se suplementó siguiendo lo descrito anteriormente.

Los cultivos en melaza se inocularon a una  $\text{DO}_{600}$  de 0.1 a partir de precultivos cultivados toda la noche en medio YPD (glucosa 2% (p/v), peptona 2 % (p/v) y extracto de levadura 1 % (p/v)). El medio YPD se suplementó con agar 2 % (p/v) para el cultivo en placa de las levaduras. En las placas de YPS se sustituyó la glucosa por sacarosa a la misma concentración (2 % (p/v)), en este caso, la sacarosa se esterilizó por filtrado y se añadió tras el autoclavado del resto de componentes.

Para los ensayos de capacidad fermentativa se empleó el mosto sintético MS300, tal y como aparece descrito en Riou et al., (1997) y con las modificaciones introducidas por Viana et al., (2014). Se compone de glucosa 100 g/L, fructosa 100 g/L, ácido málico 3 g/L, ácido tartárico 3 g/L, ácido cítrico 0.3 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/L,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5 g/L,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.155 g/L, NaCl 0.2 g/L. Como fuente de nitrógeno se añadió NH<sub>4</sub>Cl 0.46 g/L y una mezcla que contiene los 20 aminoácidos, para alcanzar una cantidad de nitrógeno asimilable de 300 mg/L. También se añadieron 1 mL/L de una solución de oligoelementos (solución formada por MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 4 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1 g/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1 g/L y (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 1 g/L), 10 mL/L de vitaminas (de una solución formada por mioinositol 2 g/L, pantotenato de calcio 0.15 g/L, hidrocloreuro de tiamina 0.025 g/L, ácido nicotínico 0.79 mg/L, piridoxina 0.025 g/L y biotina 0.3 mg/L) y factores anaerobios 1 mL/L (de una solución formada por ergosterol 1.5 mL/100 mL de etanol puro y Tween 20 (1:1) y ácido oleico 0.5 mL/100 mL de la misma mezcla). El pH del mosto se ajustó a 3.3 con NaOH y se autoclavó tras su preparación.

## 2.2 Condiciones industriales de producción de biomasa

Los ensayos de simulación de la producción industrial de levaduras se realizaron en un biorreactor ez2-Control (Applikon Biotechnology, Países Bajos) de 5 L de capacidad máxima. En estos ensayos se empleó melaza suplementada, preparada tal y como aparece descrita en el apartado anterior. La melaza se diluyó hasta alcanzar una concentración de sacarosa del 6.1 % (p/v) en el medio para la fase *batch* y un 10 % (p/v) para el medio de alimentación en la fase *fed-batch*. Durante el crecimiento la temperatura se mantuvo constante a 30 °C mediante la ayuda de la camisa de agua del biorreactor. Se añadió antiespumante (antifoam 204, Sigma) hasta una concentración final de 0.05 % (v/v). El pH se ajustó a 4.5 y se siguió su variación a lo largo de la fase *batch*, en la fase *fed-batch* el pH se mantuvo constante en 4.5 mediante la adición de NaOH 1 M, con la ayuda del sistema de bombas peristálticas del biorreactor. La agitación del medio varió entre 300 – 500 rpm para mantener una concentración de O<sub>2</sub> en el reactor del 20 %, determinada por un electrodo de oxígeno. Se administró un caudal de aire de 4 L/min. La velocidad de alimentación se incrementó de forma discontinua de 0.5 a 1.5 mL/min. El condensador se mantuvo a 4 °C con agua refrigerada. Para el crecimiento de las especies *H. vineae* y *M. pulcherrima* en el biorreactor no fue necesario la transición a la fase *fed-batch* debido a sus características metabólicas. Se obtuvieron muestras a lo largo del proceso de producción, se lavaron varias veces con agua destilada y se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Las células se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento.

### 2.3 Desecación mediante lecho fluidizado y rehidratación de la biomasa

La biomasa procedente de los cultivos a escala de laboratorio y en biorreactor se recogió mediante un proceso de centrifugación a 4000 rpm durante 2 min y diferentes lavados con agua destilada estéril. Una vez obtenida la pasta de biomasa esta se colocó sobre discos de papel de filtro estéril para eliminar la humedad residual. Posteriormente, la biomasa se transfirió a jeringuillas estériles con la ayuda de las cuales se introdujo en forma de pequeños cilindros en un deshidratador de lecho fluidizado Tornado model 501 (Sherwood Scientific, Reino Unido). La biomasa se deshidrató con un flujo de aire de 2.5 m<sup>3</sup>/min a 37 °C hasta alcanzar una humedad relativa final del 10%. Se calculó el tiempo necesario para alcanzar dicha humedad relativa en cada cepa. Tras el secado, la biomasa se almacenó a 4 °C hasta su utilización. Para la rehidratación posterior de la biomasa la levadura seca activa se rehidrató en agua estéril a 37 °C (10 µL de agua por cada mg de biomasa), dejándola primero 10 min en estático a 37 °C, seguidos de 10 min en agitación (140 rpm).

### 2.4 Desecación mediante *Spray-Dryer*

La biomasa procedente de cultivos a escala de laboratorio en YPD y melaza se recogió mediante un proceso de centrifugación a 4700 rpm durante 8 min y se sometió a diferentes lavados con agua destilada estéril. Una vez obtenida la pasta de biomasa se resuspendió en leche desnatada 10% (p/v) y se dejó en agitación durante 30 min a 30 °C. La biomasa se secó con la ayuda de un *Spray-Dryer* (Mini Spray-dryer B-191, Buchi, Suiza).

Las condiciones de desecación fueron: temperatura de aire de entrada 120 °C, temperatura de aire de salida 50 °C. Las suspensiones de levadura fueron rociadas a través de una boquilla a presión a una cámara climática en la que se consiguió el secado gracias al flujo de aire seco. Después de la desecación la biomasa seca en forma de polvo se almacenó a 4 °C hasta su utilización. Para la rehidratación posterior de la biomasa la levadura seca activa se rehidrató en solución fisiológica (NaCl 0.85 % (p/v)) a 30 °C durante 10 min en estático, seguidos de 10 min en agitación 160 rpm.

## **2.5 Análisis de respuesta a estrés**

Para evaluar su capacidad de respuesta a estrés, las levaduras se cultivaron en medio YPD líquido durante 24 h a 30 °C con agitación (160 rpm). Posteriormente, se tomó una alícuota del cultivo y se ajustó a una  $DO_{600}$  de 1 con agua destilada. A partir de esta se realizaron diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-5}$ ) y se depositó una gota de 5  $\mu$ L de cada una sobre placas de YPD con las adiciones necesarias o que se incubaron en las condiciones apropiadas, que se indican a continuación:

### **2.5.1 Estrés por temperatura**

Para evaluar la resistencia a estrés térmico, las placas de YPD se incubaron a 30 °C (condiciones control) y a 37 °C durante 24 horas. Para evaluar la resistencia a estrés por frío, las placas se incubaron a 12 °C durante 6 días.

### **2.5.2 Estrés osmótico**

Para evaluar la resistencia a estrés osmótico, las alícuotas procedentes de cultivos en YPD líquido se depositaron sobre placas de YPD que contenían NaCl y sorbitol en las siguientes concentraciones:

- 0.7 y 1.2 M de NaCl.
- 0.9 y 1.5 M de sorbitol.

Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 3 días en el caso del NaCl y 2 días en el caso del sorbitol.

### **2.5.3 Estrés oxidativo**

Para evaluar la resistencia a estrés oxidativo, las alícuotas procedentes de cultivos en YPD líquido se depositaron sobre placas de YPD con concentraciones de  $H_2O_2$  de 2.5 mM y 3.5 mM. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 24 horas.

### **2.5.4 Estrés por etanol**

Para evaluar la resistencia al estrés por etanol, las alícuotas procedentes de cultivos en YPD líquido se depositaron sobre placas de YPD con concentraciones de etanol de 5 %, 10 % y 12 % (p/v). Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas.

## 2.6 Ensayos de microvinificación

Para los ensayos de vinificación se empleó mosto de la variedad Primitivo. El mosto se mantuvo congelado a -20 °C hasta su uso. Una vez descongelado fue esterilizado por pasteurización en autoclave (20 min a 90 °C). Los ensayos se realizaron en matraces de 150 mL de capacidad con un volumen de 100 mL de mosto tapados con tapones de algodón estéril. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 28 °C sin agitación.

Cada matraz se inoculó con  $10^7$  células viables/mL en el caso de las fermentaciones simples. En las fermentaciones mixtas los matraces se inocularon con  $10^7$  células viables/mL de las especies no-*Saccharomyces* y  $10^3$  células viables/mL de *S. cerevisiae*. Para la inoculación se empleó biomasa seca procedente de ensayos de producción en melaza.

El seguimiento de la fermentación se realizó mediante el estudio de la pérdida de peso de los matraces, determinada por la evolución de la producción de CO<sub>2</sub> a lo largo de la fermentación. El tiempo de fermentación fue variable en función de cada fermentación y especie. El mosto inicial, el mosto en fermentación y el vino final se analizaron según lo descrito en el apartado 5.1.5. Al final de la fermentación se tomaron muestras del vino final para su análisis mediante cromatografía de gases (apartado 5.1.6). Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado.

La evolución de la microbiota en las fermentaciones mixtas se realizó mediante la toma de muestras (500 µL) de los matraces. A partir de estas alícuotas se realizaron diluciones seriadas (hasta  $1 \times 10^{-6}$ ) y se depositaron 100 µL de estas sobre placas de medio WL (WL Nutrient Agar, Thermo Scientific) para la diferenciación de las especies coinoculadas. En este medio, las colonias de *S. cerevisiae* son de color crema, las de *H. vineae* presentan un color verde y las colonias de *M. pulcherrima* adoptan un color rojizo/pardo.

### 3. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

La comprobación de la identidad de las levaduras no-*Saccharomyces* suministradas por Lallemand Inc se realizó mediante PCR-RFLP de la región ITS1-5.8 rDNA-ITS2, tal y como se describe en Esteve-Zarzoso et al., (1999) con ligeras modificaciones.

#### 3.1 Extracción de DNA

La extracción del DNA se realizó a partir de una colonia procedente de un cultivo puro en placas de YPD, que se resuspendió en 3  $\mu$ L de NaOH 0.01 M, se congeló a -80 °C durante 1 min y luego se calentó a 95 °C durante 10 min para provocar la lisis celular.

#### 3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de la región ITS1-5.8 rDNA-ITS2 se emplearon los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Las reacciones fueron realizadas con un termociclador automático (Eppendorf AG 22331, Alemania) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; 40 ciclos consistentes en: desnaturalización a 94 °C 1 min, alineamiento a 55.5 °C 1 min y extensión a 72 °C 90 s; y extensión final a 72 °C durante 10 min.

Para la comprobación de las especies *M. pulcherrima* y *M. fructicola* se realizó el análisis de la secuencia del dominio D1/D2 de la subunidad grande, de acuerdo con lo descrito por Kurtzman y Robnett (1998). Para la amplificación de esta región se emplearon los oligonucleótidos NL-1 y NL-4. La PCR se realizó en las mismas condiciones que en el caso de la región ITS1-5.8 rDNA-ITS2.

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa según lo descrito en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos.

#### 3.3 Restricción con endonucleasas

Una vez comprobada la amplificación de los fragmentos de PCR por electroforesis, los fragmentos amplificados fueron digeridos con 1 U de las endonucleasas *HaeIII*, *HinfI* y *CfoI* (Roche, Alemania) por separado a 37 °C durante 2 h. Los fragmentos de restricción fueron analizados en geles de agarosa según lo descrito en el apartado 3.4

de materiales y métodos. Los resultados obtenidos fueron comparados con la base de datos <https://yeast-id.org>.

### **3.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración variable (1 – 2 %) según los tamaños a separar. Los geles se prepararon en tampón TBE (Tris-HCl 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1.25 mM), que también fue empleado como tampón de electroforesis. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (azul de bromofenol 0.25 % (p/v), xilancianol 0.25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)). La electroforesis se desarrolló a 100 V durante 1 h. La detección de los fragmentos de DNA se realizó bajo luz fluorescente debido a la adición de bromuro de etidio (50 µg/mL) en el gel de electroforesis.

## **4. Métodos de obtención y análisis de proteínas**

### **4.1 Obtención de extractos celulares**

Los extractos proteicos se prepararon siguiendo diversos protocolos en función de la utilización posterior de las muestras. En el caso de las actividades catalasa y glutatión reductasa se procedió a la rotura de las células de manera mecánica por agitación en un aparato FastPrep-24 (MP Biomedical, EEUU) y añadiendo 1 volumen de tampón de lisis (de diferente composición en cada caso, ver apartados 4.2.1 y 4.2.2 respectivamente) y 1 volumen de perlas de vidrio. Para la rotura celular se realizaron 3 ciclos de 30 s a 4 m/s. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. La cuantificación de proteínas en los extractos se realizó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), con el reactivo comercializado por Bio-Rad y una recta patrón preparada con seroalbúmina bovina (BSA).

### **4.2 Determinación de actividades enzimáticas**

#### **4.2.1 Actividad catalasa**

La actividad catalasa se determinó siguiendo el método descrito por Jakubowski et al., (2000). Se realizaron extractos celulares en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 con inhibidor de proteasas 1X (complete Mini, EDTA-free de Roche, Alemania). Se utilizaron 10 – 50 µg de proteína en una solución extemporánea de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 mM. A los 5 s se

determinó la velocidad de disminución de la absorbancia a 240 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Pharmacia, EEUU) durante 1 min.

Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la descomposición de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto y se normalizó según la cantidad de proteína del extracto (actividad específica).

#### **4.2.2 Actividad glutatión reductasa**

Para la determinación de la actividad glutatión reductasa se siguió un protocolo adaptado a partir del descrito por Murshed et al., (2008). Se realizaron extractos celulares (como se describe en el apartado 4.1) en tampón MES/KOH 50 mM pH 6 con inhibidor de proteasas 1X. Se utilizaron 10 – 50  $\mu\text{g}$  de proteína en una solución Hepes 50 mM, EDTA 0.5 mM, NADPH 0.25 mM y GSSG 20 mM. Se determinó el descenso de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH.

Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto y por microgramo de proteína (actividad específica).

#### **4.2.3 Actividad invertasa**

La actividad invertasa se determinó siguiendo el método descrito por Harkness y Arnason, 2014. Se prepararon cultivos celulares en crecimiento logarítmico inicial ( $\text{DO}_{600}$  0.2 – 0.3) en YPD (2 % glucosa). Una vez los cultivos alcanzaron la  $\text{DO}_{600}$  requerida, se recogieron  $1 \times 10^6$  células para evaluar la actividad invertasa en condiciones de represión. Las células restantes fueron lavadas y resuspendidas a una  $\text{DO}_{600}$  de 0.2 – 0.3 en YPD con glucosa 0.05 % e incubadas a 30 °C durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se recogieron  $1 \times 10^6$  células para evaluar la actividad invertasa en condiciones de desrepresión. También se realizaron ensayos con  $1 \times 10^6$  células procedentes de cultivos en medio melaza. Cada alícuota de  $1 \times 10^6$  células fue lavada dos veces con 200  $\mu\text{L}$  de azida de sodio 10 mM y los sedimentos celulares se mantuvieron en hielo hasta su ensayo.

Para empezar la reacción, todas las muestras fueron resuspendidas en 50  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 50 mM pH 5.1 y se les añadieron 12.5  $\mu\text{L}$  de sacarosa 0.5 M. Las muestras fueron incubadas a 37 °C y transcurridos 10 min la reacción se paró mediante la adición de 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 M. Las muestras se dejaron en hielo 1 min, seguido

de 3 min a 95 °C y hielo de nuevo durante 1 min. La liberación de glucosa fue determinada mediante el método de la glucosa oxidasa / peroxidasa (apartado 5.1.2).

A lo largo del proceso se mantuvieron los 2 controles descritos a continuación:

- a. Células sin sacarosa: sedimento celular + 50  $\mu$ L acetato sódico 50 mM pH 5.1 + 12.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O.
- b. Solo sacarosa: 12.5  $\mu$ L sacarosa 0.5 M + 50  $\mu$ L acetato sódico 50 mM pH 5.1 + 12.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O.

El control a de cada muestra se empleó como blanco mientras que la DO<sub>600</sub> del control b se empleó para descontar la hidrólisis no enzimática. La actividad invertasa se expresó como  $\mu$ M de glucosa  $\text{min}^{-1} 10^6$  células<sup>-1</sup>.

## 5. Análisis de parámetros bioquímicos

### 5.1 Análisis de parámetros enológicos

#### 5.1.1 Determinación de azúcares reductores

Para determinar la concentración de azúcares reductores se siguió la metodología descrita por Robyt y Whelan (1972). Se realizaron diluciones sucesivas de las muestras (generalmente 1:100 en el caso de las vinificaciones) en un volumen final de 100  $\mu$ L y se añadieron 100  $\mu$ L de reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 1 % (p/v), NaOH 1.6 % (p/v), tártaro doble sódico-potásico 30 % (p/v)). Se llevaron las muestras a ebullición (5 min a 95 °C) y se enfriaron en hielo. Luego, se añadió 1 mL de agua y se midió la absorbancia a 540 nm. Se realizó una recta patrón con concentraciones de glucosa entre 0 y 2 g/L. La concentración de azúcares reductores se calculó por interpolación en la recta patrón.

#### 5.1.2 Determinación de glucosa por el método glucosa oxidasa / peroxidasa

Se prepararon diluciones de las muestras a valorar, se tomó un volumen de 100  $\mu$ L y se añadieron 400  $\mu$ L de reactivo GOX/P (glucosa oxidasa 7.8 U, peroxidasa 0.4 U, o-dianisidina 0.9 mM, todo en tampón fosfato potásico 100 mM pH 7). La reacción se desarrolló a 30 °C durante 15 min y se detuvo mediante la adición de 500  $\mu$ L de HCl 6 N. Se realizó una recta patrón con cantidades de glucosa entre 0 y 10  $\mu$ g. Se midió la absorbancia de las muestras y la recta patrón a 540 nm. La cantidad de glucosa en cada muestra se calculó por interpolación en la recta patrón.

### 5.1.3 Determinación de sacarosa

Se prepararon diluciones de las muestras a valorar, se tomó un volumen de 40  $\mu\text{L}$  y se mezcló con 160  $\mu\text{L}$  de tampón acetato sódico 50 mM pH 5, invertasa 2.5 U (Sigma, EEUU). Se prepararon muestras para la recta patrón con concentraciones de sacarosa entre 0 y 1 mg/mL. Las muestras se incubaron 10 min a 30 °C, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.4 M y se hirvieron las muestras durante 3 min para detener la reacción. Parte de la muestra se utilizó para valorar la glucosa liberada mediante el método de la glucosa oxidasa / peroxidasa (apartado 5.1.2). La concentración de sacarosa en cada muestra se calculó por interpolación en la recta patrón.

### 5.1.4 Determinación de etanol

La cuantificación enzimática de etanol se realizó mediante la detección espectrofotométrica a 340 nm del NADH formado durante la oxidación del etanol a acetaldehído por acción del enzima alcohol deshidrogenasa. Se prepararon diluciones de las muestras a valorar. El ensayo se llevó a cabo en tampón glicina 0.2 M – Tris 0.3 M (pH 9.7), con  $\text{NAD}^+$  2 mM, en un volumen final de 1 mL, al cual se le añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la muestra a analizar o de etanol (0 – 0.9 mM) para la recta patrón. Se midió la absorbancia inicial a 340 nm y ese dato se utilizó como blanco para cada muestra. Se añadió alcohol deshidrogenasa de levadura 20 U/mL (Sigma, EEUU) y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 340 nm y se determinó la concentración de etanol en cada muestra por interpolación en la recta patrón.

### 5.1.5 Perfil analítico de vinos experimentales

El mosto empleado en los experimentos de vinificaciones mixtas, el mosto en fermentación y los vinos finales se analizaron para la detección de parámetros químicos convencionales, como azúcares residuales, acidez total, acidez volátil, etanol o pH. Se tomaron alícuotas al inicio y al final de la fermentación, así como a lo largo del proceso, que se analizaron mediante espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*, FTIR) empleando un detector OenoFoss (Foss Analytics, Dinamarca).

### 5.1.6 Cromatografía de gases

El contenido en compuestos secundarios producidos por las levaduras, como acetaldehído, etil acetato, acetoina y alcoholes superiores (n-propanol, isobutanol, alcohol amílico) fue determinado mediante cromatografía de gases, empleando un

cromatógrafo Agilent 7890 A (Agilent, EEUU) con detector de inyección de llama conectado a un software Agilent Chemstation.

El aparato estaba dotado de un muestreador automático para los análisis. Las muestras se inyectaron en una columna de vidrio (2 mm de diámetro interno y 6 mm de diámetro externo) empaquetada con Carbopack BAW 5 % y Carbowax 20 % (Supelco, EEUU). La temperatura de la cámara se programó para que incrementase de 80 °C a 200 °C a una velocidad de 5 °C/min durante 25 min. El gas portador fue helio con un flujo de 20 mL/min. Los niveles de los metabolitos secundarios se determinaron mediante comparación con curvas estándares.

## **5.2 Análisis de parámetros redox de tolerancia a estrés**

### **5.2.1 Cuantificación de la peroxidación de lípidos**

La peroxidación de lípidos se determinó mediante el ensayo colorimétrico descrito por Buege y Aust (1978) (con algunas modificaciones), basándose en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA), producto de la rotura de ácidos grasos. Se resuspendieron 100 mg de células en 500 µL de tampón fosfato sódico 50 mM pH 6 con ácido tricloroacético 10 % (v/v). La mezcla se transfirió a tubos con perlas y se realizó el extracto mediante 3 ciclos de rotura de 30 s a 4 m/s en un FastPrep-24 (MP Biomedical, EEUU). Se recogió el sobrenadante tras centrifugar a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. Se mezclaron 300 µL del sobrenadante con 700 µL de una mezcla de reacción (TBA 1% (p/v), 15 % TCA (v/v)). Las muestras se incubaron a 95 °C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se enfriaron 5 min en hielo y se centrifugó 2 min a 12000 rpm para eliminar posibles precipitados. Se preparó una recta patrón con concentraciones de MDA 0 – 30 µM en un volumen de 1 mL que se trató como las muestras. Se midió la absorbancia a 535 nm y se determinó la concentración de MDA en cada muestra por interpolación en la recta patrón. Los resultados se expresaron en nmoles de MDA por mg de células.

### **5.2.2 Cuantificación de trehalosa**

Los extractos celulares para la cuantificación de trehalosa se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Parrou y François (1997), con algunas modificaciones. 100 mg de células fueron resuspendidos en 0.25 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 250 mM y se incubaron a 95 °C durante 4 horas. Después, se añadieron 0.15 mL de ácido acético 1 M y 0.6 mL de acetato sódico 0.2 M pH 5.2 y se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 2 min. Se incubaron 150 µL del sobrenadante con 8.4 mU de trehalasa comercial (Sigma,

EEUU) y se incluyeron blancos con extracto celular sin trehalasa. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 12 – 16 horas. Para cada ensayo se realizó una recta patrón de trehalosa entre 0 y 20 µg que fue procesada igual que los sobrenadantes. Finalizada la incubación, las muestras se hirvieron para parar la reacción y se valoró la glucosa liberada mediante el método de la glucosa oxidasa / peroxidasa (apartado 5.1.2). La cantidad de trehalosa intracelular se expresó en µg de trehalosa por mg de células.

### 5.2.3 Cuantificación de glutatión

Para la determinación del glutatión se utilizó un método colorimétrico basado en la reacción de esta molécula con ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). El protocolo realizado es una modificación del descrito originalmente por Griffith (1980).

Se recogieron 100 mg de células y se resuspendieron en 1 mL de HCl 8 mM y ácido sulfosalicílico 1.3 % (p/v) a 4 °C. Las células se rompieron en tubos con perlas de vidrio en 3 ciclos de 30 s a 4 m/s en un aparato FastPrep-24 (MP Biomedical, EEUU). Tras la rotura se mantuvieron 15 min en hielo y se recuperó el sobrenadante tras centrifugar a 12000 rpm 10 min a 4°C.

La valoración del glutatión total se realizó mezclando 200 µL de muestra (con la dilución pertinente) con 120 µL de un cóctel enzimático preparado en el momento que contenía NADP 0.4 mg/mL, glucosa-6-fosfato 0.16 mg/mL, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 3 µg/mL, glutatión reductasa 1 mU, MES 0.2 M y EDTA 2mM disueltos en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6. Se añadieron 480 µL de DTNB 200 µM, se incubó 20 min en agitación y oscuridad, a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a 240 nm. Se realizaron rectas patrón de 0 a 16 µM de glutatión comercial (Sigma, EEUU) que fueron sometidos a los mismos tratamientos que las muestras.

Para la valoración del glutatión oxidado (GSSG), los 200 µL de muestra se incubaron, previamente al tratamiento descrito, con 4 µL de una solución de 2-vinilpiridina 1 M (Sigma, EEUU) durante 1 h. Este compuesto enmascara el glutatión reducido (GSH) presente en la muestra e impide su reacción con el DTNB. El GSH de las muestras se calculó por la diferencia entre el glutatión total y el oxidado. Los resultados se expresaron como nmoles de glutatión por mg de células.

### 5.3 Análisis de composición lipídica total

#### 5.3.1 Determinación de ácidos grasos

La determinación del contenido de ácidos grasos totales se hizo siguiendo lo descrito por Romero et al., (2018). En primer lugar, se añadieron 1 mL de HCl 1.25 N en metanol, 10  $\mu$ L de ácido heptanoico (C7, 1 g/L) y 10  $\mu$ L de ácido heptadecanoico (C17, 4 g/L) a tubos de vidrio que contenían un pellet de alrededor de  $2 \times 10^8$  células. Las muestras se incubaron a 90 °C durante 60 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Tras atemperarse, se añadieron 1 mL de NaCl 0.9 % (p/v) en agua y 300  $\mu$ L de hexano. La extracción se repitió dos veces. Entre cada fase de extracción los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 5 min para permitir la separación de las fases. Los extractos se analizaron mediante cromatografía de gases empleando un cromatógrafo Agilent 5890 (Agilent, EEUU) conectado a un ordenador con el software ChemStation (Agilent). Los extractos (2  $\mu$ L) se inyectaron en una columna FFAP-HP de 30 m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m mediante un inyector automático (Agilent). La abundancia relativa de cada ácido graso se calculó a partir del área de los picos correspondientes después de la normalización con estándares internos (C7 o C17).

#### 5.3.2 Determinación de esteroides

El contenido total de esteroides se determinó siguiendo el método descrito por Quail y Kelly (1996). En resumen,  $2 \times 10^8$  células se resuspendieron en 1.5 mL de metanol, 1 mL de pirogalol 0.5 % (p/v), 1 mL de KOH 60 % (p/v) y 10  $\mu$ L de  $\alpha$ -colestano (estándar interno, 1 mg/mL en hexano), en tubos de vidrio y se saponificaron a 90 °C durante 2 horas. Los esteroides se extrajeron dos veces con 500  $\mu$ L de hexano y el extracto se secó en una centrifuga de vacío SC110 (Savant Instruments, EEUU). Los pellets secos se disolvieron en 100  $\mu$ L de hexano. De la fase orgánica recuperada, se inyectaron 2 mL en una columna DB-5HT (30 m x 0.25 mm x 0.1  $\mu$ m, Agilent, EEUU) mediante un inyector automático 7683B (Agilent, EEUU). La identificación de cada compuesto se realizó mediante comparación de los patrones de fragmentación de los picos obtenidos con los obtenidos por inyección de estándares disponibles o según lo descrito por Quail y Kelly (1996). La abundancia relativa de cada compuesto se calculó a partir del área del pico correspondiente, normalizado frente al área del pico del estándar interno empleado. Los resultados se expresaron como porcentajes de la suma total de los esteroides identificados.

## 6. Análisis de parámetros tecnológicos

### 6.1 Medida de viabilidad

La biomasa procedente de los cultivos en melaza (biomasa fresca) y la biomasa rehidratada (biomasa seca) se diluyeron a una  $DO_{600} = 0.001$  y se sembraron en placas de YPD. Se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) tras 24 h a 30 °C. El porcentaje de células viables se calculó tomando como 100 % de viabilidad las UFC obtenidas a partir de biomasa fresca.

### 6.2 Medida de rendimiento

Para determinar el rendimiento se recogió la biomasa procedente de cultivos en melaza mediante un proceso de centrifugación a 4000 rpm durante 2 min y diferentes lavados con agua destilada estéril. La pasta de biomasa obtenida se extendió en placas Petri de vidrio estériles que se colocaron en el interior de una estufa de aire caliente a 37 °C y se mantuvieron hasta que dejó de observarse pérdida de peso. El peso al final del secado se tomó como el peso seco de levadura producido. Se determinó la cantidad de sacarosa presente en la melaza al inicio y al final del crecimiento, siguiendo lo descrito en el apartado 5.1.3. La diferencia entre ambos valores fue la cantidad de sacarosa consumida. El rendimiento se expresó como gramos de biomasa producidos por gramo de sacarosa consumida

### 6.3 Capacidad fermentativa

La capacidad fermentativa se determinó en medio MS300, descrito en el apartado 2.1. Se inocularon 100 mL de MS300 con aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/mL y se comprobó la cantidad real de células mediante recuento en cámara cuentaglobulos Fuchs-Rosenthal. La viabilidad celular se determinó mediante siembra en placas de YPD. Los cultivos se colocaron en un baño de agua a 30 °C con agitación de 65 rpm y se determinó el  $CO_2$  producido mediante el sistema de detección Gas Production System (Ankom, EEUU). El seguimiento de la producción de  $CO_2$  se realizó cada 10 min durante 6 horas. La capacidad fermentativa se expresa como mL de  $CO_2$  producidos por unidad de tiempo y por número de células viables.

## 7. Tratamiento estadístico de los datos

En todos los resultados de carácter cuantitativo en los que se muestra un análisis estadístico de los datos, la significatividad estadística se obtuvo mediante un test t de Student de 2 colas con 2 grados de libertad. El análisis estadístico de la cuantificación de lípidos totales se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA de dos factores, la comparación entre medias se realizó mediante test de Turkey. En todos los análisis estadísticos se han considerado significativos aquellos valores con un p valor (*p-value*) menor o igual a 0.05, que corresponde con un intervalo de confianza del 95 %.

Las ecuaciones exponenciales empleadas para calcular los tiempos de deshidratación se obtuvieron mediante el análisis de las cinéticas de deshidratación con Excel (Microsoft, EEUU).

Los *heatmaps* se generaron con la función *heatmap.2* del software R. Para la generación de los *heatmaps* los datos de cada parámetro analizado se normalizaron frente a los valores obtenidos en la especie control y se calculó el  $\log_2$  de todos ellos.

Los alineamientos de secuencias se realizaron mediante la herramienta online de alineamiento múltiple de secuencias Clustal Omega ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)) del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) y se analizaron mediante el software Jalview (Waterhouse et al., 2009).

## **Resultados y Discusión**

---



## 1. Caracterización fisiológica de especies no-*Saccharomyces* en condiciones de producción de levadura seca activa.

Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación permitieron la puesta a punto de un protocolo que simula el proceso de propagación de biomasa de levadura a escala de laboratorio (Pérez-Torrado et al., 2005), empleando melaza de remolacha como medio de crecimiento y simplificando la secuencia de fermentaciones industriales. Además, también se desarrolló un protocolo rudimentario para simular la deshidratación industrial de la biomasa, mediante el secado de la misma en una estufa. En este trabajo, el proceso de secado ha sido adaptado y mejorado para asemejarse más a las condiciones industriales, gracias al uso de un deshidratador de lecho fluidizado (ver Materiales y Métodos).

Como se ha descrito en la Introducción, la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* durante la producción de vinos tiene un papel clave en la calidad del producto final. Las bases fisiológicas y metabólicas de este fenómeno están siendo ampliamente estudiadas. Sin embargo, no existen muchos trabajos en los que se analice cómo se comportan estas levaduras en condiciones de producción de biomasa para la obtención de cultivos iniciadores secos, proceso clave para su uso enológico. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han estudiado el comportamiento de algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* en condiciones de producción de biomasa, si bien se trataba de especies depositadas en colección (Colección Española de Cultivos Tipo) y no aisladas de condiciones industriales (Gamero-Sandemetrico et al., 2019, 2018). También se dispone de publicaciones recientes en las que se analiza la respuesta a deshidratación de algunas especies no-*Saccharomyces* (Cámara et al., 2019a; Kim et al., 2019), aunque en estos casos, las condiciones de crecimiento y deshidratación de la biomasa difieren de las empleadas en este trabajo.

Es por esto que se planteó abordar la caracterización de una serie de especies no-*Saccharomyces* de interés enológico en condiciones de propagación de biomasa, acoplado a una deshidratación controlada. Los resultados presentados a continuación se han obtenido empleando ocho especies diferentes de levaduras vínicas no-*Saccharomyces* no comercializadas procedentes de la colección de la empresa Lallemand Inc., que aparecen recogidas en el apartado 1.1 de Materiales y Métodos. Todas ellas presentan alguna característica interesante para la producción de vinos, ya sea por su capacidad de reducir el contenido en etanol, por mejorar propiedades organolépticas o por servir como agentes de biocontrol (ver Introducción). Todos los ensayos se han realizado en condiciones de simulación del proceso de propagación de biomasa a escala de laboratorio, de modo que los datos derivados de este trabajo

podrán ayudar en la identificación de levaduras candidatas a ser empleadas como inóculos comerciales en forma de LSA. Además, ofrecerán información sobre posibles mejoras y adaptaciones tecnológicas del proceso de producción industrial de biomasa seca de estas especies.

### 1.1 Identificación de especies no-*Saccharomyces*.

En primer lugar, se realizó la comprobación de la identidad de las especies de levadura no-*Saccharomyces* recibidas de Lallemand Inc. Para dicha comprobación se realizó el análisis de la región ITS1-5.8 rDNA-ITS2 mediante PCR-RFLP. Los perfiles de restricción obtenidos se compararon con los de la base de datos Yeast.ID. En la Tabla R.1.1 se recogen los perfiles de restricción de las especies analizadas. En todos los casos se confirmó la identidad de las cepas de partida.

**Tabla R.1.1:** Perfiles de fragmentos de restricción con varios enzimas de restricción de las levaduras no-*Saccharomyces* empleadas en este trabajo.

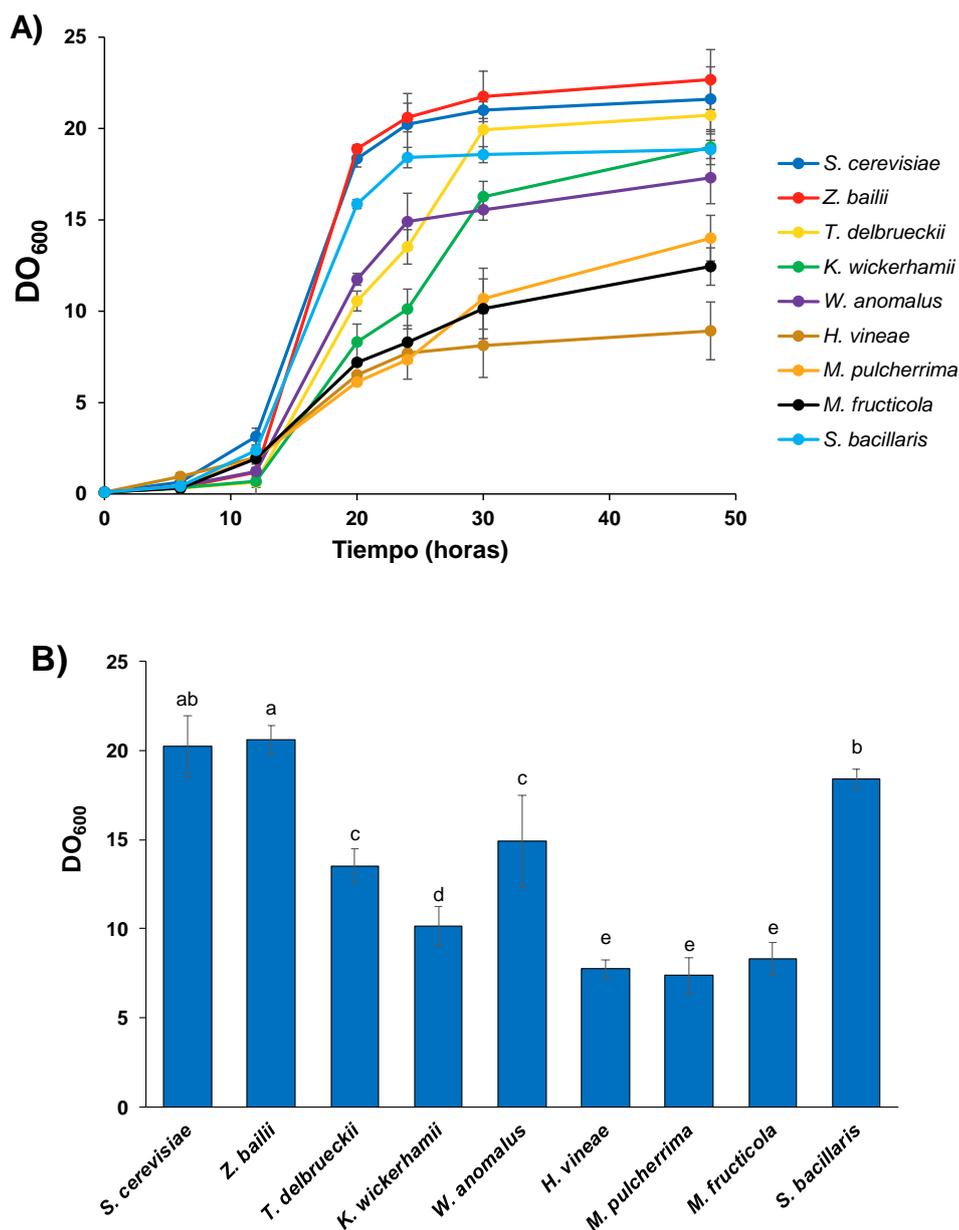
Especie	Amplificado (pb)	Fragmentos de restricción (pb)		
		<i>CfoI</i>	<i>HaellI</i>	<i>HinfI</i>
<i>Z. bailii</i>	790	95 + 95 + 270 + 320	90 + 690	55 + 160 + 225 + 340
<i>T. delbrueckii</i>	800	100 + 150 + 220 + 330	800	380+410
<i>K. wickerhamii</i>	723	10 + 82 + 160 + 186 + 285	95 + 628	5 + 46 + 59 + 77 + 113 + 180 + 243
<i>W. anomalus</i>	620	50 + 560	620	300 + 310
<i>H. vineae</i>	775	90 + 150 + 180 + 270	110 + 660	370 + 390
<i>M. pulcherrima</i>	400	95 + 100 + 205	100 + 280	190 + 200
<i>M. fructicola</i>	400	95 + 100 + 205	100 + 280	190 + 200
<i>S. bacillaris</i>	460	56 + 103 + 105 + 196	460	225 + 235

Debido a que las especies *M. pulcherrima* y *M. fructicola* comparten patrones de restricción idénticos, se tuvo que recurrir al análisis de la secuencia de la región D1/D2 26S rDNA para determinar que se trataba de dos especies diferentes. Todos estos análisis moleculares permitieron confirmar la identidad del material biológico de partida con el que se han desarrollado todos los análisis subsiguientes.

## 1.2 Crecimiento en melaza

Una vez comprobada la identidad de las levaduras no-*Saccharomyces* se procedió a su crecimiento en condiciones de simulación del proceso de propagación de biomasa a escala de laboratorio. A lo largo de toda la tesis doctoral se ha mantenido como control la cepa Lalvin T73, una cepa vínica comercial de *S. cerevisiae* perteneciente a Lallemand Inc. y caracterizada ampliamente en nuestro laboratorio bajo las condiciones empleadas en este trabajo. Todos los ensayos de propagación de biomasa en condiciones de laboratorio se realizaron según lo descrito en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos.

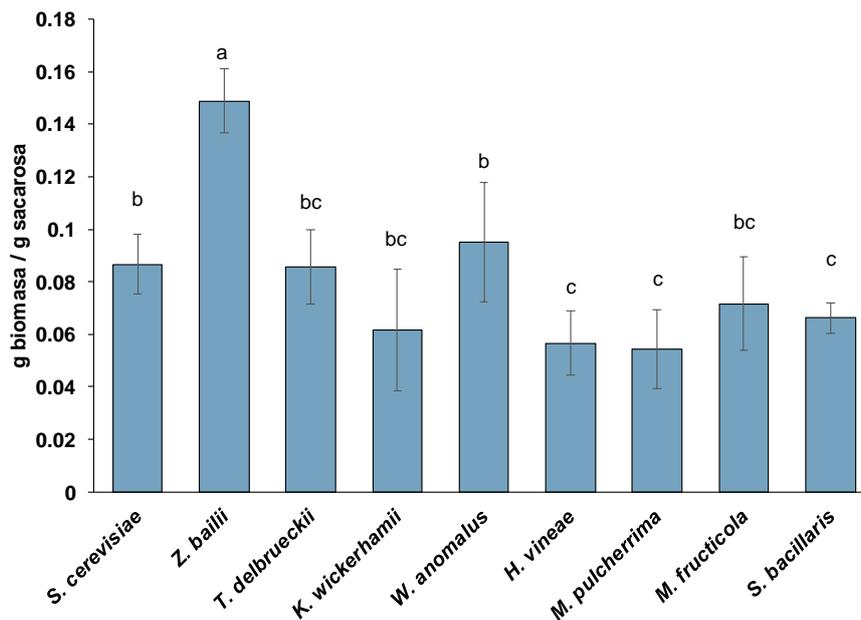
Un parámetro básico para determinar el potencial uso de las diferentes especies a nivel industrial es su capacidad de crecimiento en melaza. Se estudió el crecimiento de las distintas especies tras 24 h de cultivo en *batch* en medio melaza. Se tomó como tiempo de referencia las 24 h de cultivo ya que este es un tiempo suficiente para que *S. cerevisiae* consuma por completo la sacarosa del medio. En la Figura R.1.1.A se recogen las curvas de crecimiento obtenidas para cada especie. Se puede observar que existen grandes diferencias entre especies en cuanto a la densidad celular alcanzada tras este periodo (Figura R.1.1.B). Las únicas especies en las que se observó un crecimiento similar al de la cepa control comercial fueron *Z. bailii* y, en menor medida, *S. bacillaris*, mientras que el resto de especies presentaron un crecimiento menor a las 24 h. Las especies *W. anomalus* y *T. delbrueckii* presentaron un crecimiento intermedio entre aquellas especies capaces de alcanzar una  $DO_{600}$  igual a la del control y las especies con un crecimiento más pobre. Cabe destacar que, debido al comportamiento floculante de la cepa de *T. delbrueckii* estudiada, los datos de crecimiento obtenidos a partir de la medida de la  $DO_{600}$  pueden no ser exactos. Para las medidas de  $DO_{600}$  de esta especie se añadió EDTA hasta alcanzar una concentración 100 mM para disgregar los agregados celulares. Por último, las especies *K. wickerhamii* y especialmente *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola* presentaron un crecimiento muy pobre, aproximadamente la mitad del observado en la cepa de referencia.



**Figura R.1.1:** Crecimiento celular (DO<sub>600</sub>) en medio melaza a 30 °C. A) Curva de crecimiento celular. B) Crecimiento alcanzado tras 24 h. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

Un factor a tener en cuenta al analizar el comportamiento tecnológico de las levaduras, más allá de su crecimiento, es el rendimiento de las mismas, definido como gramos de biomasa producidos por gramo de sacarosa consumido. Como se puede observar en la Figura R.1.2, al estudiar este parámetro se vio que no existen grandes diferencias entre especies. En la mayoría de los casos se observaron rendimientos que se asemejan al de la cepa *S. cerevisiae* control ( $0.086 \pm 0,01$ ). No se observaron

diferencias estadísticamente significativas entre el rendimiento de las especies *T. delbrueckii*, *K. wickerhamii*, *W. anomalus* y *M. fructicola* y el de la cepa comercial. Mientras que las especies *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *S. bacillaris* presentaron un rendimiento ligeramente menor. La única especie que presentó un rendimiento superior fue *Z. bailii*, prácticamente el doble ( $0.148 \pm 0,01$ ) que el de la cepa de referencia. La capacidad de esta especie para crecer en medios ricos en sacarosa y de fermentar hexosas, así como su elevada osmotolerancia, ya han sido descritas (Martorell et al., 2007; Praphailong y Fleet, 1997), lo cual hace pensar que está perfectamente capacitada para el crecimiento en melaza. Estos resultados indican que la mayoría de especies presentan un aprovechamiento de la sacarosa consumida prácticamente igual al de la cepa control en las condiciones ensayadas, y que las diferencias de crecimiento detectadas probablemente sean debidas a estar creciendo en condiciones subóptimas, al distinto tamaño celular o a ser incapaces de aprovechar toda la sacarosa presente en el medio de cultivo, como se describe a continuación.



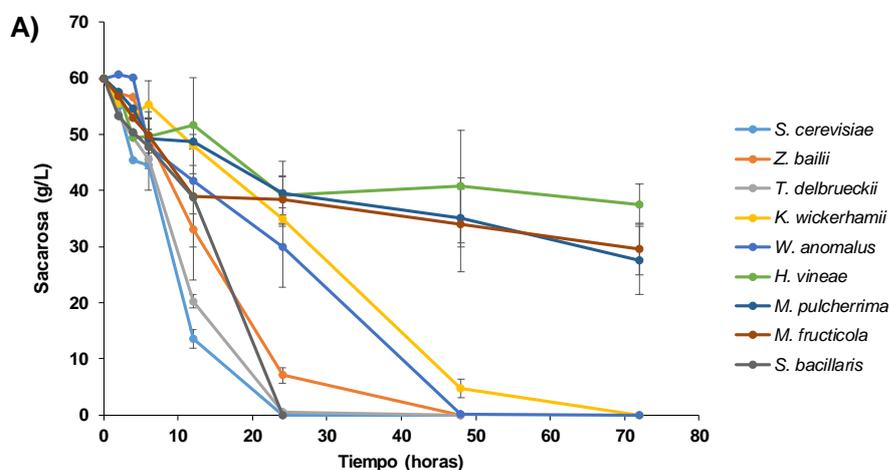
**Figura R.1.2:** Rendimiento (g biomasa / g sacarosa) tras 24 h de crecimiento en medio melaza a 30 °C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

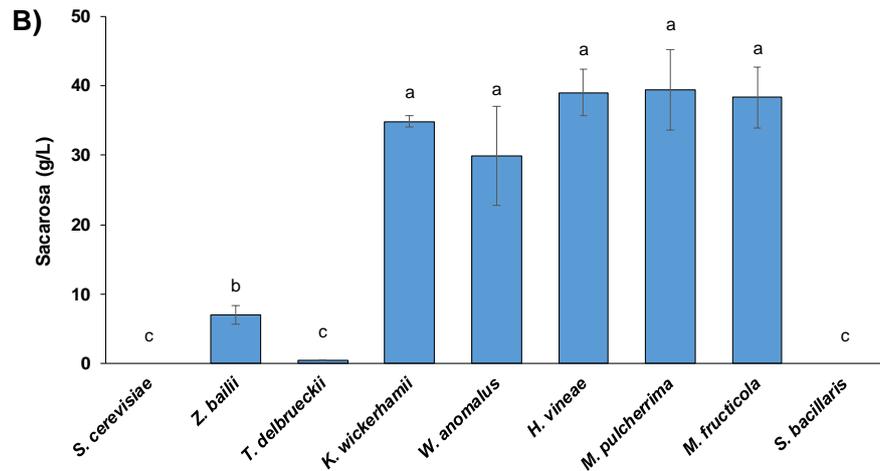
### 1.3 Análisis del consumo de sacarosa y de la actividad invertasa

Las diferencias observadas entre el crecimiento y el rendimiento de las distintas especies tras el cultivo en medio melaza pueden ser debidas a numerosos factores; uno de ellos es un consumo más eficiente de la fuente de carbono principal del medio de cultivo, la sacarosa.

Se estudió la evolución de los niveles de sacarosa residual en el medio melaza a lo largo del crecimiento de las levaduras. Tal y como puede observarse en la Figura R.1.3 los perfiles de consumo de este disacárido fueron muy diferentes entre especies, pudiéndose diferenciar entre tres grandes grupos:

- Especies con un consumo rápido de la sacarosa, formado por: *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *S. bacillaris* y *Z. bailii*.
- Especies con un consumo de la sacarosa más lento que *S. cerevisiae*, formado por: *K. wickerhamii* y *W. anomalus*.
- Especies incapaces de consumir toda la sacarosa del medio, formado por: *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*.





**Figura R.1.3:** Consumo de sacarosa durante el crecimiento en medio melaza. **A)** Perfiles de consumo de sacarosa en cultivos de 72 h en medio melaza. **B)** Sacarosa residual en el medio melaza tras 24 horas de cultivo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

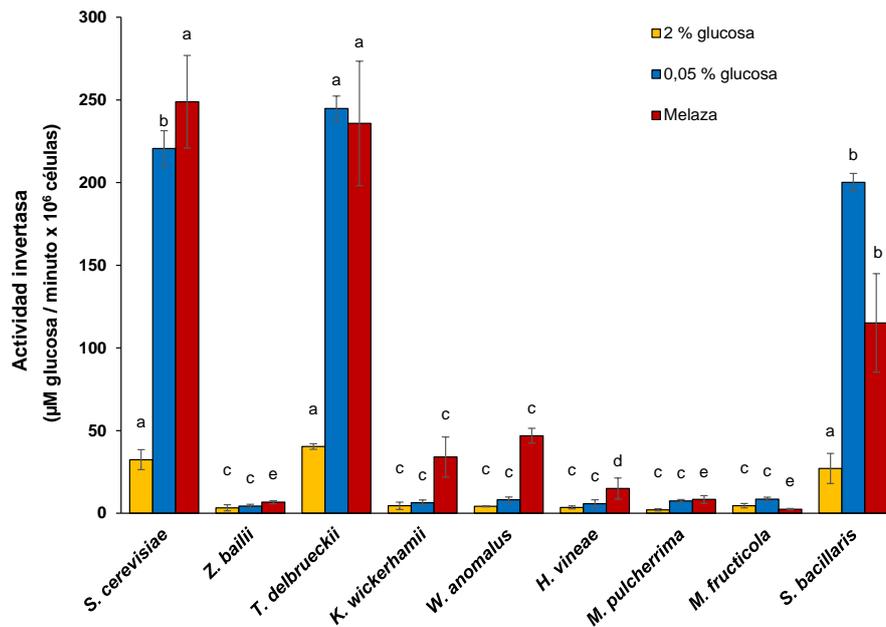
En el primer grupo, se encuentran dos especies no-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii* y *S. bacillaris*) que fueron capaces de metabolizar completamente la sacarosa del medio a las 24 h de cultivo, como ocurre con la cepa de referencia, y *Z. bailii* que, si bien no fue capaz de metabolizar por completo la sacarosa, mostró una tasa de consumo muy similar a la de las otras especies del grupo. El segundo grupo está compuesto por dos especies (*K. wickerhamii* y *W. anomalus*) que fueron capaces de metabolizar por completo la sacarosa del medio, aunque su consumo fue más lento que en el caso anterior. Como puede observarse en la Figura R.1.3.B, los valores de sacarosa residual a las 24 horas de cultivo son relativamente elevados, pero las dos especies son capaces de metabolizar por completo la sacarosa transcurridas alrededor de 48 h. Por último, se encuentra el grupo formado *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *H. vineae* que resultaron ser incapaces de metabolizar por completo la sacarosa presente en el medio, incluso tras 72 h de cultivo, tiempo tras el cual todavía se detecta una concentración de sacarosa de unos 30 g/L. Estos datos explicarían el pobre crecimiento de estas especies bajo nuestras condiciones de trabajo y, en el caso de *M. pulcherrima*, coinciden con lo descrito por Chua et al. (2018) y Lu et al. (2016), que observaron que la cepa comercial de esta especie es incapaz de metabolizar la sacarosa. Además, estos datos ayudarían a entender el pobre comportamiento de las levaduras no convencionales en condiciones de propagación industrial, un proceso cuyas condiciones de cultivo vienen marcadas por

el comportamiento de cepas de *S. cerevisiae* altamente adaptadas al proceso, y que difieren de las condiciones de crecimiento óptimas de estas especies.

La invertasa es la enzima encargada de catalizar la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa. En *S. cerevisiae* es codificada por una familia de genes que comprende a *SUC1* – *SUC5* y *SUC7* (Carlson y Botstein, 1983), aunque en la cepa de referencia S288c solo *SUC2* parece ser funcional. Es una de las familias de genes más afectadas por la regulación en función de la disponibilidad de fuentes de carbono. Los genes *SUC* están reprimidos a concentraciones elevadas de glucosa (2 %), mientras que se desreprimen cuando la concentración es baja (0.1 %) (Özcan et al., 1997). La invertasa es una proteína secretada y actúa en el espacio periplásmico, por ello se ensaya sobre células enteras. Para tratar de entender las diferencias observadas en los perfiles de consumo de sacarosa se analizó la actividad invertasa de las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas. En la Figura R.1.4 se presentan los valores de actividad invertasa detectados para las distintas especies en condiciones de represión (2 % glucosa) y en condiciones de desrepresión (0.05 % glucosa) del gen *SUC2*, así como en melaza.

Como se puede observar, las especies *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *S. bacillaris* presentaron los niveles de actividad más elevados en las tres condiciones ensayadas. Incluso en condiciones de represión se detectaron niveles de actividad basales relativamente elevados. En el resto de especies no-*Saccharomyces*, en condiciones de represión los niveles de actividad invertasa fueron prácticamente nulos.

En condiciones de desrepresión se detectó un aumento muy pronunciado de la actividad invertasa en las especies *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *S. bacillaris*, con valores más de 4 veces superiores a los observados en condiciones de represión. En el resto de especies (*Z. bailii*, *K. wickerhamii*, *W. anomalus*, *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*) no se observó un aumento de la actividad enzimática en estas condiciones. La actividad invertasa en melaza fue similar a la detectada en condiciones de desrepresión en el caso de *S. cerevisiae* y de *T. delbrueckii*, mientras que en *S. bacillaris* la actividad en melaza fue menor que en condiciones de desrepresión, pero aun así fue considerablemente superior a la detectada en represión. Igual que ocurría en condiciones de desrepresión, la mayoría de especies no-*Saccharomyces* no mostraron un aumento de la actividad invertasa en medio melaza. Únicamente se observó un aumento significativo en *K. wickerhamii* y *W. anomalus*, mientras que en el resto de especies (*Z. bailii*, *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*) los niveles de actividad invertasa se mantuvieron prácticamente invariables en las tres condiciones ensayadas.



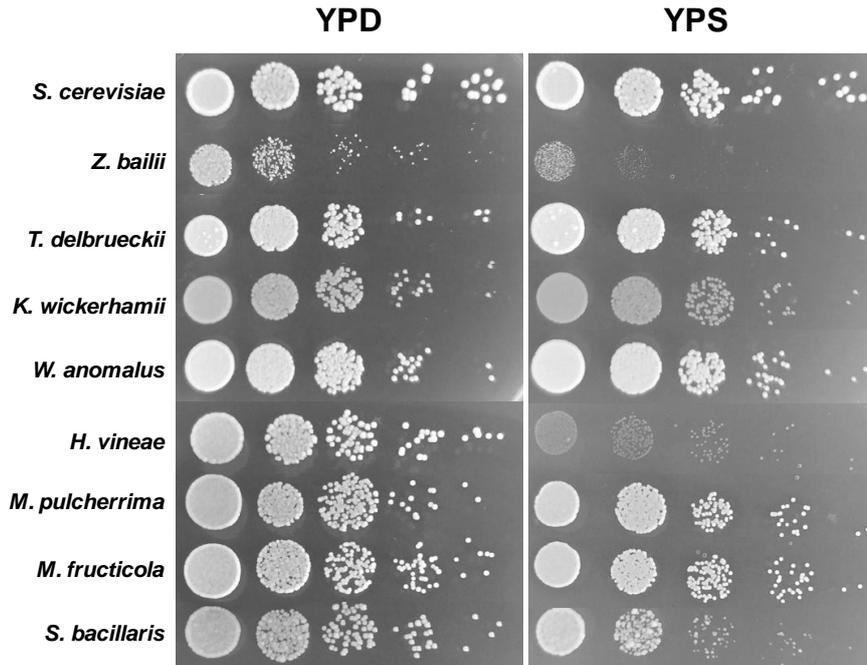
**Figura R.1.4:** Actividad invertasa en condiciones de represión (2 % glucosa, barras amarillas), de desrepresión (0.05 % glucosa, barras azules) y en melaza (barras rojas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies dentro de cada condición ( $p < 0.05$ ).

Existe una clara correlación entre la elevada actividad invertasa de cada una de las especies y su capacidad para metabolizar la sacarosa presente en la melaza. La elevada actividad detectada en *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *S. bacillaris* está ligada al hecho de que estas fueron las únicas capaces de consumir por completo la sacarosa del medio a las 24 h de cultivo. Por otro lado, la menor actividad detectada en *K. wickerhamii* y *W. anomalus* explicaría la menor tasa de consumo de estas dos especies en comparación con aquellas con elevada actividad invertasa. Sin embargo, ambas son capaces de consumir por completo la sacarosa del medio, tal y como ya ha sido descrito (Fredlund et al., 2002; Lachance, 2011a). Destaca la baja actividad detectada en *Z. bailii*, más si se tiene en cuenta su perfil de consumo de sacarosa (Figura R.1.3). Sin embargo, Arez et al. (2014), ya demostraron que *Z. bailii* es capaz de producir una invertasa extracelular con elevada actividad y Praphailong y Fleet (1997) describieron su capacidad de crecer a elevadas concentraciones de sacarosa, por lo que parece evidente que esta especie dispone de la capacidad de metabolizar eficientemente la sacarosa. Es posible que debido a las condiciones de ensayo no se pueda detectar este tipo de actividad invertasa o que esta se induzca más tarde tras un periodo de adaptación al medio de crecimiento. En cualquier caso, no debe descartarse que

mecanismos de captación y de hidrólisis intracelular puedan estar operando en estas especies para mantener un crecimiento limitado.

Las tres especies que presentaron menor crecimiento en melaza presentaron también valores prácticamente nulos de actividad invertasa en las tres condiciones ensayadas. Únicamente se detectó cierto aumento de la actividad en *H. vineae* en melaza. Se ha descrito que *H. vineae* es incapaz de crecer con sacarosa como única fuente de carbono (Bellut et al., 2018), este hecho probablemente sea debido a la ausencia de enzimas capaces de hidrolizar este disacárido, lo cual explicaría el pobre comportamiento de esta especie en condiciones de propagación de biomasa. Por otro lado, la baja actividad invertasa detectada en *M. pulcherrima* coincide con lo reportado por Schnierda et al., (2014), en cuyo trabajo observaron que *M. pulcherrima* fue incapaz de metabolizar por completo la sacarosa presente en la melaza empleada (20 g/L) en cultivos líquidos y que únicamente tras un tratamiento con invertasa exógena se observó el consumo completo de este disacárido, pero en dicho estudio no se observaron diferencias de crecimiento en placas de agar con sacarosa o glucosa como fuente de carbono, tal y como aparece descrito para *M. pulcherrima* y *M. fructicola* en Lachance (2011b).

Con el fin de confirmar nuestras observaciones, se analizó la capacidad de crecimiento de las distintas especies en placas de YPSacarosa (YPS). Como puede observarse en la Figura R.1.5, todas las especies fueron capaces de crecer eficientemente, con la excepción de *Z. bailii* y *H. vineae* que presentaron crecimiento muy reducido. Estos resultados coinciden con lo ya mencionado para *H. vineae*, incapaz de metabolizar totalmente la sacarosa presente en la melaza y con un bajo crecimiento en la misma. Sorprende la incapacidad de *Z. bailii* de crecer en placas de YPS, teniendo en cuenta su elevado crecimiento en melaza y su capacidad para crecer a elevadas concentraciones de este disacárido (Praphailong y Fleet, 1997). No obstante, otros factores como el pH, que no está controlado, pueden estar afectando la actividad invertasa de esta especie. Cabe destacar también el buen crecimiento observado en placas de YPS de las dos especies del género *Metschnikowia*, que coincide con el trabajo de Lachance (2011b) anteriormente mencionado y que no se corresponden con la medida de invertasa periplásmica, sugiriendo que este tipo de levaduras podrían disponer de sistemas alternativos de captación e hidrólisis de la sacarosa, que en cualquier caso no serían muy eficientes en las condiciones de crecimiento en melaza.



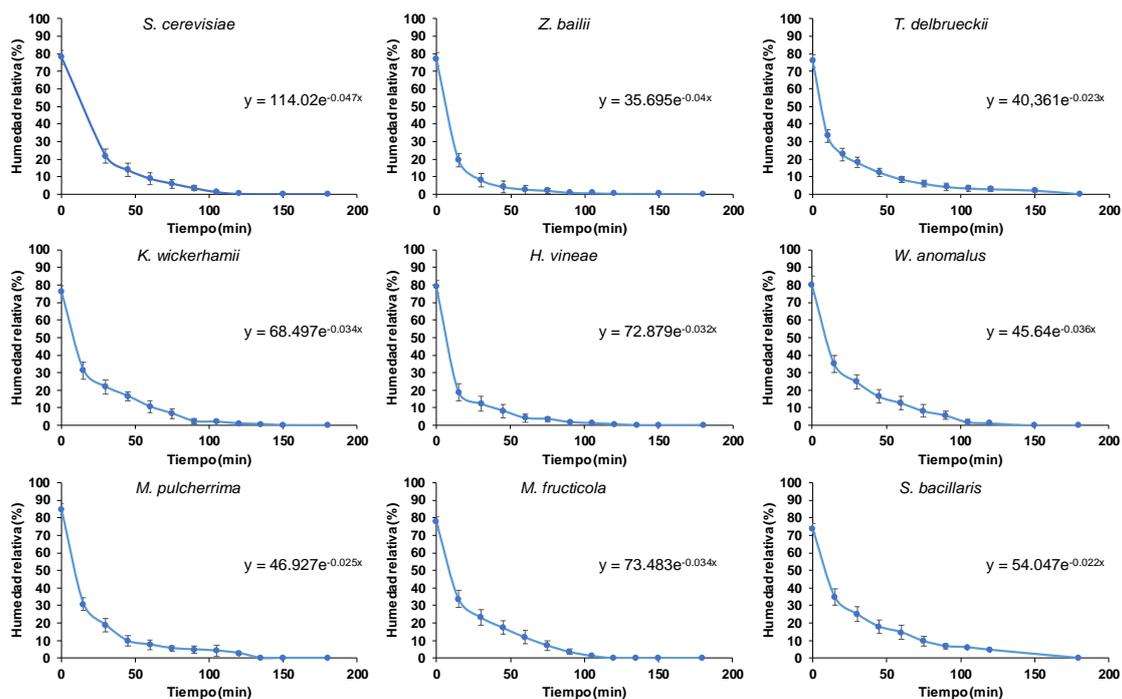
**Figura R.1.5:** Crecimiento en placas de YPS. Se sembraron diferentes diluciones seriadas a partir de cultivos ajustados a una  $DO_{600}$  de 1. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h.

#### 1.4 Análisis de la viabilidad tras la deshidratación

El último paso en el proceso de producción de LSA y en nuestras simulaciones a escala de laboratorio es la deshidratación de la biomasa obtenida. La deshidratación se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos, empleando un deshidratador de lecho fluidizado. Con el fin de estandarizar el proceso de deshidratación, el primer paso antes de la obtención de LSA fue determinar el tiempo de secado necesario en cada especie para alcanzar aproximadamente un 10 % de humedad relativa en la LSA obtenida, para asemejar lo máximo posible nuestras condiciones de trabajo a las condiciones industriales y poder comparar entre sí los parámetros de diferentes especies.

En la Figura R.1.6 se recogen las cinéticas de deshidratación de las diferentes especies bajo las condiciones empleadas en este trabajo. En la figura aparecen también las ecuaciones exponenciales obtenidas a partir de los datos de deshidratación que se emplearon para calcular el tiempo necesario para la obtención de biomasa deshidratada con aproximadamente un 10 % de humedad relativa. En la Tabla R.1.2 se recogen los tiempos calculados para cada caso.

## Resultados y Discusión



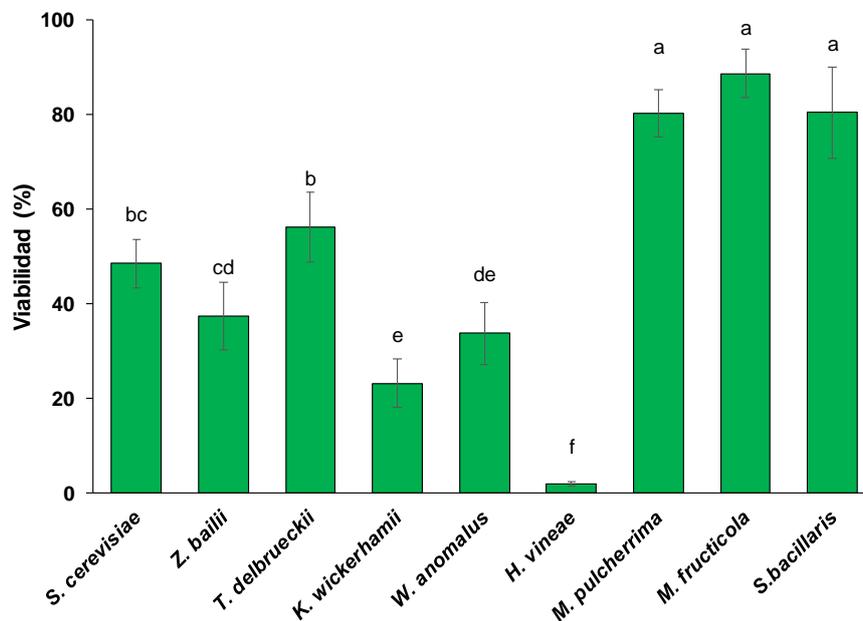
**Figura R.1.6:** Cinéticas de deshidratación de las especies estudiadas en un deshidratador de lecho fluidizado. En cada gráfica se incluye la ecuación exponencial obtenida a partir de los datos y empleada para calcular el tiempo necesario para alcanzar un 10 % de humedad relativa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

**Tabla R.1.2:** Tiempos de secado necesarios para alcanzar un 10 % de humedad relativa.

Especie	Tiempo (min)
<i>S. cerevisiae</i>	51
<i>Z. bailii</i>	32
<i>T. delbrueckii</i>	60
<i>K. wickerhamii</i>	57
<i>W. anomalus</i>	62
<i>H. vineae</i>	42
<i>M. pulcherrima</i>	62
<i>M. fructicola</i>	59
<i>S. bacillaris</i>	77

Como puede observarse, en la mayoría de los casos los tiempos de deshidratación oscilaron entre 50 – 65 minutos. Destaca el corto tiempo de deshidratación necesario para *Z. bailii*, de tan solo 32 minutos, y el tiempo elevado de *S. bacillaris*, 77 minutos.

Para determinar el efecto del proceso de deshidratación sobre la viabilidad de la LSA obtenida se analizó y comparó la viabilidad celular antes (biomasa fresca) y después del proceso (biomasa deshidratada al 10 % de humedad), tal y como se describe en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. En vista de los resultados obtenidos (Figura R.1.7) se puede afirmar que el proceso de deshidratación tiene un claro impacto sobre la viabilidad celular de la LSA obtenida, aunque este efecto varía de forma considerable entre especies. La cepa control comercial presentó una viabilidad cercana al 50 %. Las dos especies que presentaron valores de viabilidad más similares al de la cepa control fueron *Z. bailii* y *T. delbrueckii*. Del resto de especies, destacó la elevada viabilidad observada en las especies *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*, que osciló entre el 80 y el 90 %. En *K. wickerhamii* y *W. anomalus* se observaron niveles de viabilidad inferiores a los de la cepa comercial, que oscilaron entre el 25 y el 30 %. Por último, destaca la pobre viabilidad de la especie *H. vineae*, de la que apenas se recuperaron un 2 % de células viables tras la deshidratación.



**Figura R.1.7:** Porcentaje de células viables recuperadas tras el proceso de deshidratación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

La viabilidad de la LSA es uno de los parámetros clave para determinar el potencial uso de las distintas especies como inóculos comerciales. El proceso de deshidratación y rehidratación afecta severamente a la viabilidad celular (Dupont et al., 2014; Rodríguez-Porrata et al., 2008) y optimizar las condiciones de estos procesos a las necesidades de cada especie podría ser una estrategia útil para mejorar la producción de LSA y obtener biomasa con una elevada viabilidad y vitalidad. En vista de nuestros resultados, las dos especies del género *Metschnikowia* y *S. bacillaris* serían muy buenas candidatas para la producción de inóculos en forma de LSA. Aunque las condiciones de deshidratación difieren de las empleadas en nuestro trabajo, la elevada viabilidad detectada en estas especies coincide con lo observado por Câmara et al., (2019b) y Kim et al., (2019). Del mismo modo, aquellas especies con un comportamiento cercano al de la cepa comercial podrían ser empleadas para la producción de inóculos comerciales. Por el contrario, especies con menor viabilidad, en especial *H. vineae*, no parecen adecuadas para la producción de inóculos comerciales bajo las condiciones empleadas en este trabajo, ya que además de una baja viabilidad presenta un crecimiento pobre en melaza. No obstante, estas especies son enológicamente relevantes, por lo que los datos obtenidos podrían ser un buen punto de partida para tratar de mejorar su comportamiento en condiciones de propagación de LSA. Una posibilidad, con el objetivo de mejorar la supervivencia de las levaduras al proceso de deshidratación, sería incorporar tratamientos que ya han resultado eficaces, como la adición de agentes antioxidantes durante el crecimiento (Gamero-Sandemetro et al., 2015), la adición de agentes protectores como leche en polvo previamente a la deshidratación (Lee et al., 2016; Romano et al., 2015) o la inmovilización de las células durante el secado (Borovikova et al., 2014).

## 1.5 Análisis de la capacidad fermentativa

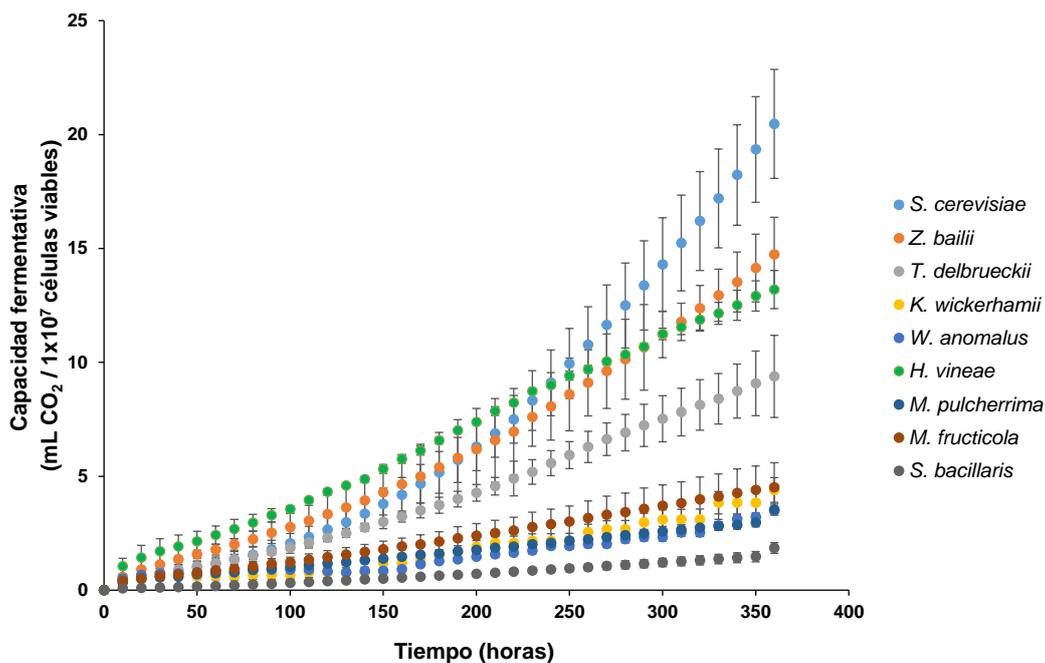
El uso final de los inóculos comerciales de levaduras vínicas en la fermentación del mosto de uva. En el caso de *S. cerevisiae* es interesante encontrar inóculos con un gran poder fermentativo, que aseguren la fermentación completa de los azúcares del medio. No obstante, el interés en la obtención de inóculos de especies no-*Saccharomyces* generalmente reside en otras propiedades que son, como ya se ha mencionado, la reducción del contenido final en etanol del vino, la obtención de perfiles organolépticos complejos o como agentes de biocontrol para evitar alteraciones durante la fermentación.

A pesar de que el potencial fermentativo no es una propiedad tan relevante tecnológicamente en especies no-*Saccharomyces* como lo es en cepas de *S. cerevisiae*, sí que es síntoma de un metabolismo activo en el mosto de uva. Se analizó la capacidad fermentativa de las distintas especies, tal y como se describe en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos, en mosto sintético (MS300), un medio complejo que simula la composición del mosto de uva natural, de modo que las levaduras se encuentren en condiciones lo más cercanas posibles a las del inicio de una fermentación en bodega, para determinar su comportamiento en estas condiciones, como indicativo de la adaptación metabólica a dicho medio.

### 1.5.1 Capacidad fermentativa en biomasa fresca

En primer lugar, se determinó la capacidad fermentativa de levaduras frescas, procedentes de cultivo en melaza. El análisis de la capacidad fermentativa en células frescas reveló que ninguna de las especies no-*Saccharomyces* analizadas era tan buena fermentadora como la cepa comercial de *S. cerevisiae*, tal y como se puede observar en la Figura R.1.8. Si se analiza la capacidad fermentativa de las especies no-*Saccharomyces*, estas se pueden dividir en 2 grandes grupos:

- Especies con capacidad fermentativa media y alta, formado por: *Z. bailii*, *T. delbrueckii* y *H. vineae*.
- Especies con baja capacidad fermentativa, formado por: *K. wickerhamii*, *W. anomalus*, *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*.



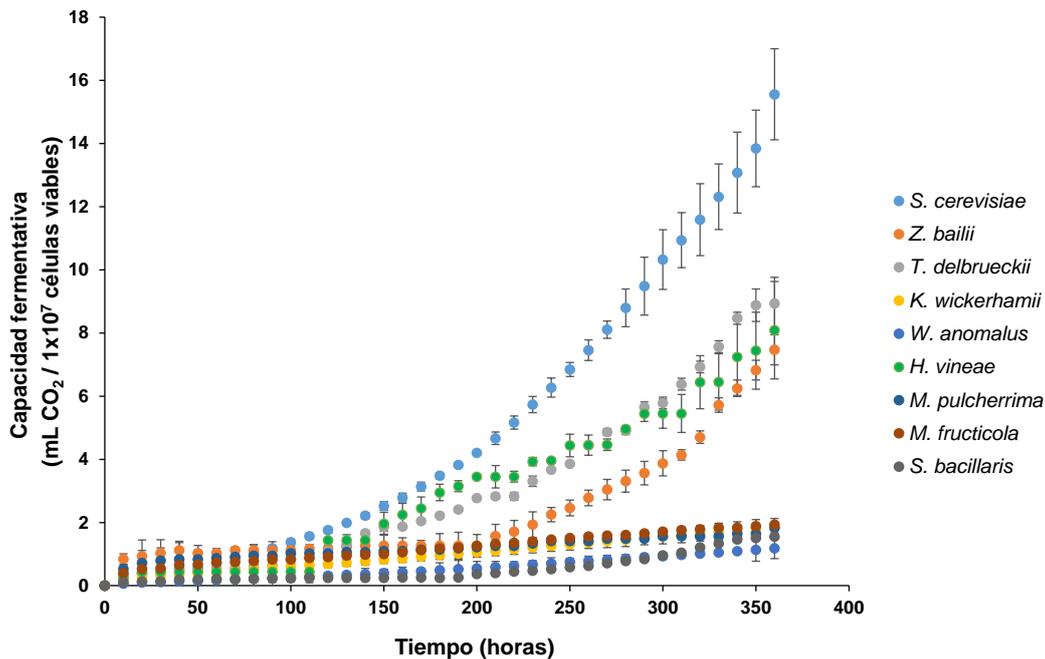
**Figura R.1.8:** Capacidad fermentativa (mL CO<sub>2</sub> / 1x10<sup>7</sup> células viables) en mosto sintético (MS300) a partir de biomasa fresca, procedente de cultivo en medio melaza. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En el primer grupo, encontramos especies que fueron capaces de adaptarse metabólicamente de forma rápida a las nuevas condiciones del medio de cultivo. Las especies que lo conforman presentan valores de capacidad fermentativa relativamente elevados, si bien existen diferencias significativas entre ellas. Estas diferencias se pueden ver más claramente si se tienen en cuenta los valores de CO<sub>2</sub> producido al final del experimento, que se recogen en la Figura R.1.10. Se puede observar que *Z. bailii* y *H. vineae* fueron las dos especies no-*Saccharomyces* que presentaron la capacidad fermentativa más elevada. En el caso de *Z. bailii*, esta especie, tradicionalmente considerada una levadura alterante en alimentos y bebidas fermentadas, ha sido identificada como la responsable de la explosión de productos enlatados y embotellados por su elevada producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación alcohólica (Stratford, 2006), lo cual es consistente con nuestros resultados. La buena capacidad fermentativa de *H. vineae* en condiciones de vinificación también ha sido descrita por otros autores (Lleixà et al., 2016; Martin et al., 2018). La última de las especies con capacidad fermentativa relativamente elevada, *T. delbrueckii*, presentó valores inferiores a las otras dos. En este caso, su capacidad para fermentar los azúcares del mosto se conoce desde hace años, no en vano fue la primera levadura no-*Saccharomyces* de la que se comercializaron inóculos para la producción de vino (Benito, 2018; Roudil et al., 2020). Por otro lado, en

el segundo grupo todas las especies presentaron valores de capacidad fermentativa reducidos y no se observaron diferencias significativas en la producción de CO<sub>2</sub> entre especies (a excepción de *S. bacillaris*, que es la especie con menor poder fermentativo), llegando a un máximo de unos 3 mL CO<sub>2</sub> / 1x10<sup>7</sup> células.

### 1.5.2 Capacidad fermentativa en biomasa deshidratada

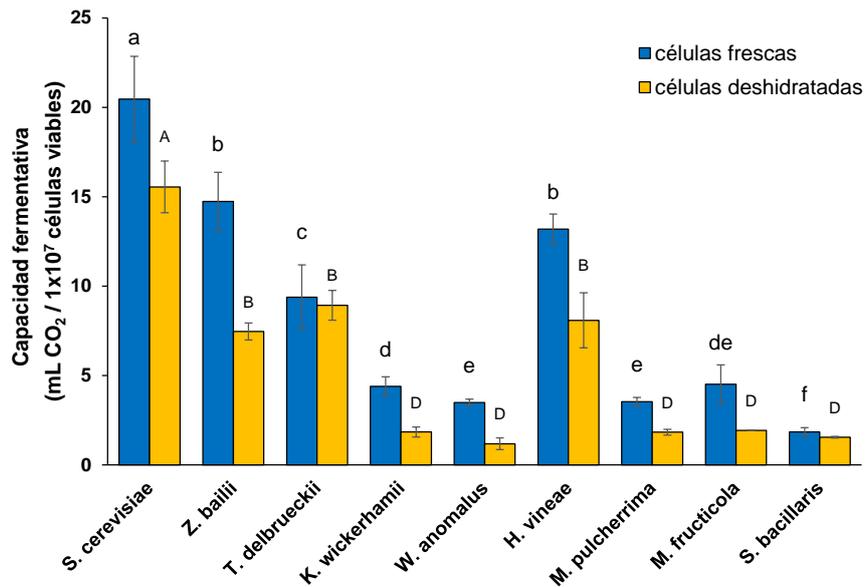
Para profundizar en el efecto del proceso de deshidratación sobre la eficiencia tecnológica de las levaduras se analizó la capacidad fermentativa de la LSA obtenida tras el proceso de deshidratación, los resultados obtenidos se muestran en la Figura R.1.9. Como puede observarse, la capacidad fermentativa de prácticamente todas las especies, incluida la cepa control comercial, disminuyó tras la deshidratación, indicando un claro efecto negativo de este proceso sobre la capacidad fermentativa. A pesar de esta disminución, se puede observar que, igual que ocurría en biomasa fresca, ninguna de las levaduras no-*Saccharomyces* fue tan buena fermentadora como a cepa comercial.



**Figura R.1.9:** Capacidad fermentativa (mL CO<sub>2</sub> / 1x10<sup>7</sup> células viables) en mosto sintético (MS300) a partir de biomasa deshidratada. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Cuando se empleó biomasa deshidratada, igual que se observó en biomasa fresca, *T. delbrueckii*, *Z. bailii* y *H. vineae* presentaron un comportamiento intermedio. *T. delbrueckii* presentó valores de capacidad fermentativa relativamente elevados, siendo la levadura no convencional más eficaz, aunque sin llegar al comportamiento de la cepa control, lo cual indica una relativa mejor tolerancia al proceso de secado. Por otro lado, en *Z. bailii* se observó un aumento de la capacidad fermentativa hacia las últimas horas del ensayo, tras una fase de latencia más prolongada que en condiciones de biomasa fresca, lo cual parece indicar que, tras una fase de adaptación a las nuevas condiciones de crecimiento, la biomasa seca de esta especie es capaz de fermentar los azúcares del mosto. Este hecho indica que los mecanismos adaptativos a la deshidratación no son tan eficaces como en *S. cerevisiae*, y no capacitan a *Z. bailii* a retomar rápidamente el crecimiento. Por último, igual que se observó en biomasa fresca, *H. vineae* presentó una buena capacidad fermentativa, similar a las otras dos especies. En el resto de especies no-*Saccharomyces* (*K. wickerhamii*, *W. anomalus*, *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*) la capacidad fermentativa fue muy baja, con valores que, en la mayoría de los casos, no superaron los 2 mL CO<sub>2</sub> / 1x10<sup>7</sup> células.

Con el fin de comparar con mayor facilidad los datos obtenidos en ambas condiciones, en la Figura R.1.10 se recogen los datos de capacidad fermentativa tras 6 horas en MS300 tanto para células frescas como deshidratadas. Además, en la Tabla R.1.3 aparecen indicados los porcentajes de pérdida de capacidad fermentativa entre ambas condiciones.



**Figura R.1.10:** Producción total de CO<sub>2</sub> tras 6 horas en mosto sintético (MS300) a partir de biomasa fresca (barras azules) y deshidratada (barras amarillas) (mL CO<sub>2</sub> / 1x10<sup>7</sup> células viables). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

Al comparar la capacidad fermentativa entre las dos condiciones estudiadas, se vio que se produjo una clara disminución de la misma tras el proceso de secado de la biomasa, salvo en *T. delbrueckii* y de *S. bacillaris*. La caída de la capacidad fermentativa se produce como consecuencia del estrés sufrido por la levadura durante la deshidratación, que tiene un claro efecto sobre la viabilidad y la vitalidad de las células. En la mayoría de los casos la pérdida de capacidad fermentativa entre ambas condiciones oscila entre el 40 – 60 % (Tabla R.1.3). En la cepa de referencia este porcentaje (24 %) es significativamente menor que en el resto de especies, lo que muestra la mayor capacidad de esta para adaptarse a las condiciones de deshidratación y retomar el crecimiento de manera eficiente una vez se dan las condiciones adecuadas. Como se ha mencionado, dos de las especies no-*Saccharomyces*, *T. delbrueckii* y *S. bacillaris*, presentaron una reducción de la capacidad fermentativa entre condiciones muy reducida. En el caso de *T. delbrueckii*, la biomasa deshidratada un porcentaje de pérdida de capacidad fermentativa de tan solo el 4.82 %, lo cual parece indicar que esta especie se adapta muy bien a las condiciones de deshidratación, no obstante, podría tratarse de un efecto de la floculación que se observa en esta especie, que causa artefactos a la hora de calcular el número de células. Del mismo modo, *S. bacillaris* presentó un porcentaje de pérdida menor que la cepa de referencia (16.07 %), en este caso, el bajo valor total de partida probablemente influya en este cálculo.

**Tabla R.1.3:** Capacidad fermentativa tras 6 horas en mosto sintético (MS300) y porcentaje de pérdida de capacidad fermentativa tras la deshidratación.

Especie	Capacidad fermentativa en células frescas (mL CO <sub>2</sub> / 10 <sup>7</sup> cél)	Capacidad fermentativa en células secas (mL CO <sub>2</sub> / 10 <sup>7</sup> cells)	Pérdida de capacidad fermentativa (%)
<i>S. cerevisiae</i>	20.46 (± 2.39) <sup>a</sup>	15.56 (± 1.44) <sup>a</sup>	24.01
<i>Z. bailii</i>	14,74 (± 1.63) <sup>b</sup>	7.47 (± 0.47) <sup>b</sup>	49.33
<i>T. delbrueckii</i>	9.39 (± 1.80) <sup>c</sup>	8.93 (± 0.83) <sup>b</sup>	4.82
<i>K. wickerhamii</i>	4.39 (± 0.54) <sup>d</sup>	1.84 (± 0.28) <sup>d</sup>	58.01
<i>W. anomalus</i>	3.49 (± 0.18) <sup>e</sup>	1.19 (± 0.33) <sup>d</sup>	66.04
<i>H. vineae</i>	13.20 (± 0.84) <sup>b</sup>	8.09 (± 1.54) <sup>b</sup>	38.69
<i>M. pulcherrima</i>	3.04(± 0.24) <sup>e</sup>	1.83 (± 0.16) <sup>d</sup>	39.86
<i>M. fructicola</i>	4.51 (± 1.08) <sup>de</sup>	1.93 (± 0.03) <sup>d</sup>	57.07
<i>S. bacillaris</i>	1.85 (± 0.23) <sup>f</sup>	1.55 (± 0.05) <sup>d</sup>	16.07

El estudio de la capacidad fermentativa es un buen parámetro para determinar el potencial uso de las levaduras en fermentaciones a escala industrial, sin embargo, en el caso de levaduras no convencionales como las que se están analizando en este trabajo es posible que una mayor capacidad fermentativa no sea un parámetro estrictamente requerido. Las contribuciones de las levaduras no-*Saccharomyces* en el vino van más allá de su capacidad de fermentar los azúcares del mosto. Como se ha comentado en la Introducción, su presencia durante las primeras etapas de la fermentación resulta en la producción de metabolitos secundarios de interés. Otro de los principales puntos de interés reside en el uso de estas especies para reducir el contenido de etanol en el producto final, por lo que la presencia de especies con un metabolismo preferentemente respiratorio, que aseguren el consumo de azúcares sin producción de etanol, es una estrategia interesante para tal fin (Ciani et al., 2016; González et al., 2013; Quirós et al., 2014).

Entre las especies que se han analizado se encontraron varias con una capacidad fermentativa muy baja, incluso antes de la deshidratación. Este es el caso por ejemplo de *M. pulcherrima*, cuya naturaleza *Crabtree* negativa ha sido descrita previamente (Schnierda et al., 2014). Nuestros resultados revelan que tanto *M. pulcherrima* como *M. fructicola* tienen una capacidad fermentativa muy baja, lo cual las convierte en muy buenas candidatas para la reducción del etanol en el vino, como ya ha sido reportado para *M. pulcherrima* (Morales et al., 2015; Puškaš et al., 2020; Tronchoni et al., 2018).

Aunque el carácter respiratorio de *K. wickerhamii* no ha sido descrito, cabría esperar que presente un metabolismo preferentemente respiratorio, ya que especies filogenéticamente cercanas del género *Kluyveromyces*, como son *K. marxianus* y *K. lactis*, han sido descritas como *Crabtree* negativas (Lane et al., 2011; Siso et al., 1996). Del mismo modo, *W. anomalus* también ha sido descrita como *Crabtree* negativa (Fredlund et al., 2004), por lo que es de esperar que presente una baja capacidad fermentativa. Por último, *S. bacillaris* ha sido descrita como una especie capaz de producir etanol, aunque a niveles significativamente más bajos que en *S. cerevisiae* (Englezos et al., 2017). Todo esto hace de estas cinco especies candidatas interesantes para la reducción de etanol en el vino, más allá de las contribuciones organolépticas que puedan ofrecer en el producto final.

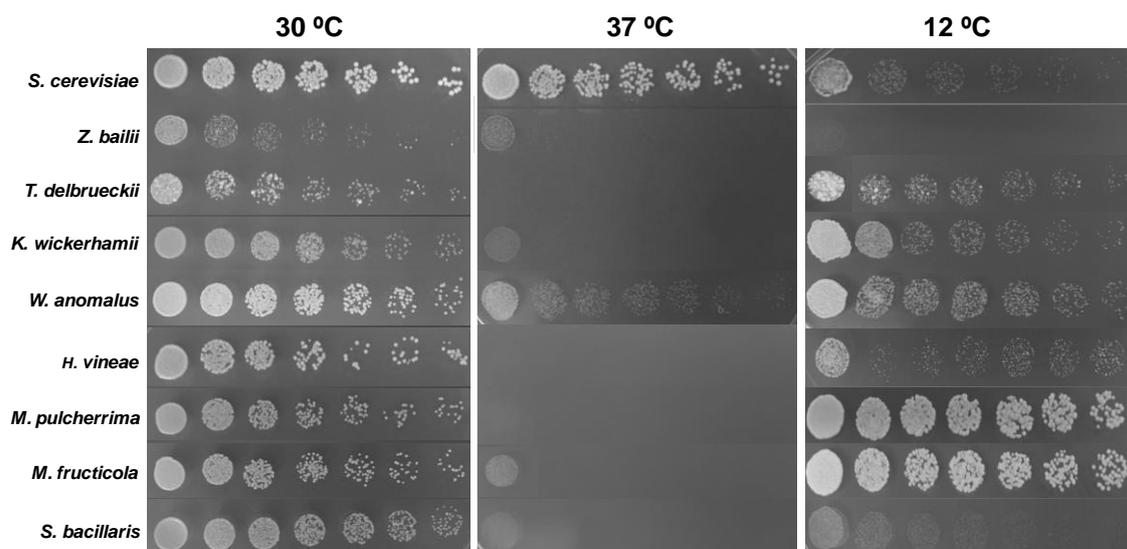
## 1.6 Análisis de crecimiento en condiciones de estrés

A lo largo del proceso de producción de LSA las levaduras se ven sometidas a numerosas condiciones que resultan estresantes para la célula. Por ello, se abordó la evaluación de la capacidad de crecimiento de las especies estudiadas en placas de medio rico YPD bajo distintas condiciones de estrés. La evaluación de la capacidad de crecimiento de las levaduras en condiciones de estrés se realizó según lo descrito en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos.

### 1.6.1 Estrés Térmico

En general, las levaduras no-*Saccharomyces* fueron incapaces de crecer a 37 °C, únicamente se observó crecimiento de *W. anomalus*, muy reducido respecto de las condiciones control (30 °C), mientras que el crecimiento de la cepa comercial de *S. cerevisiae* no se vio afectado (Figura R.1.11).

El hecho de que las especies no-*Saccharomyces* sean incapaces de crecer a 37 °C no está necesariamente ligado con efectos sobre la viabilidad tras la deshidratación, ya que especies con viabilidades muy superiores a la cepa control (*M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*) son incapaces de crecer a 37 °C. Esto puede ser debido a que el tiempo de exposición a esta temperatura es mucho menor durante la deshidratación (alrededor de 1 hora) que en los ensayos de crecimiento a 37 °C durante tiempos largos (24 horas). Sin embargo, el estrés térmico tiene un claro efecto sobre la viabilidad, y juega un papel durante el proceso de deshidratación, por lo que es posible que sea uno de los múltiples factores que afecten a la baja viabilidad de aquellas especies no-*Saccharomyces* con un peor comportamiento en deshidratación.



**Figura R.1.11:** Crecimiento a diferentes temperaturas. Se sembraron diferentes diluciones seriadas, a partir de cultivos ajustados a una  $DO_{600}$  de 1, en placas de medio YPD. Las placas se incubaron a 30 y 37 °C durante 24 h, y a 12 °C durante 6 días.

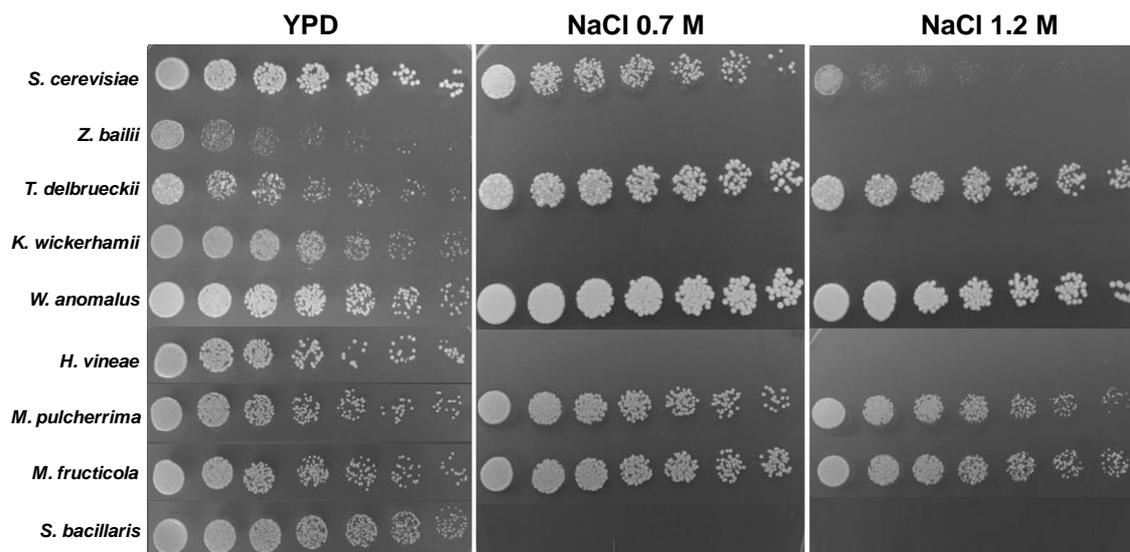
Si se analiza la capacidad de crecimiento de las levaduras en condiciones de estrés por frío (Figura R.1.11), se observa que, al contrario de lo que ocurría a 37 °C, muchas de las especies estudiadas presentan un crecimiento mayor que la cepa de referencia. Tras 6 días de incubación, el crecimiento de *S. cerevisiae* a 12 °C es menor que en condiciones control, igual que ocurre con *S. bacillaris*, mientras que en *Z. bailii* no se observa crecimiento alguno. Por otro lado, el crecimiento del resto de especies es similar, siendo particularmente destacable el crecimiento de las dos especies de *Metschnikowia*. La capacidad de estas especies para crecer a bajas temperaturas resulta una característica interesante, de cara a su posible aplicación en fermentaciones en frío.

### 1.6.2 Estrés osmótico

Se realizaron dos tipos de experimentos, con NaCl y con sorbitol. La elección de ambos compuestos se debe a que causan dos tipos de estrés diferentes. El sorbitol provoca un estrés osmótico mediante una reducción del potencial hídrico del medio. La respuesta celular es una salida de agua, concentrando los iones y biomoléculas

intracelulares, dando como resultado una reducción de la actividad celular. Por otro lado, el NaCl causa un estrés osmótico similar al causado por el sorbitol, además de un estrés salino debido a la elección del catión. En este caso, el ion  $\text{Na}^+$  interacciona específicamente con sitios activos de determinadas proteínas afectando a su función, por lo que se añade un efecto tóxico del  $\text{Na}^+$ , además del estrés osmótico.

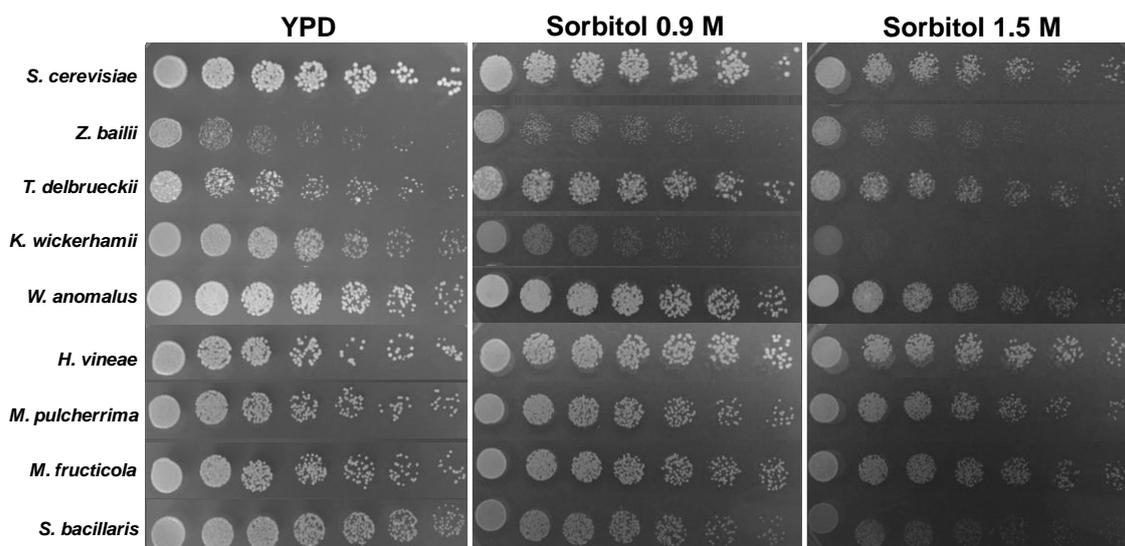
Se observaron grandes diferencias en el efecto del crecimiento en presencia de NaCl entre especies (Figura R.1.12). Incluso a concentraciones moderadas de NaCl (0.7 M), las especies *Z. bailii*, *K. wickerhamii*, *H. vineae* y *S. bacillaris* fueron incapaces de crecer, mientras que el crecimiento del resto de especies no se ve afectado. A concentraciones de NaCl más elevadas (1.2 M) prácticamente no se observa crecimiento de *S. cerevisiae* y las dos especies del género *Metschnikowia* presentan un crecimiento ligeramente inferior al observado en concentraciones control, mientras que el crecimiento de *T. delbrueckii*, *W. anomalus* no se vio afectado.



**Figura R.1.12:** Crecimiento en presencia de alta concentración salina. Se sembraron diferentes diluciones seriadas, a partir de cultivos ajustados a una  $\text{DO}_{600}$  de 1, en placas de YPD con NaCl (0.7 y 1.2 M) y sin NaCl como control. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días.

En cuanto al crecimiento en presencia de sorbitol, en general, todas las especies estudiadas presentaron un crecimiento parecido a las condiciones control cuando se cultivaron en presencia de sorbitol 0.9 M, únicamente se observó una reducción del crecimiento en *K. wickerhamii*. Cuando se aumentó la concentración de sorbitol a 1.5 M se pudieron apreciar mayores diferencias. En este caso se observó que el crecimiento

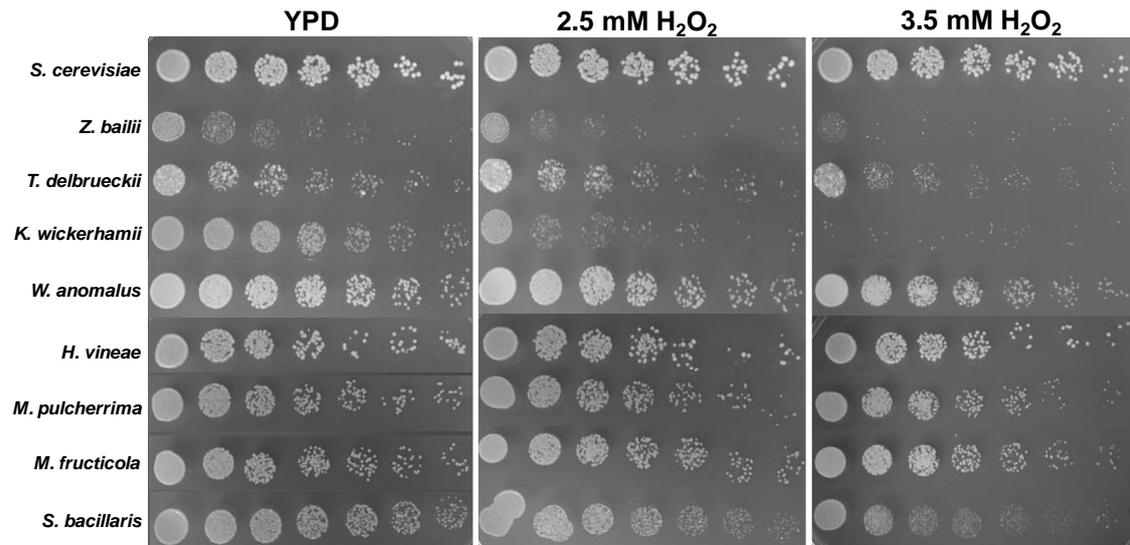
de *S. bacillaris* y *Z. bailii* fue menor que el de sus respectivos controles. A esta concentración de sorbitol *K. wickerhamii* presentó un crecimiento prácticamente nulo. El resto de especies no se vieron afectadas por esta concentración de sorbitol (Figura R.1.13). Así pues, *H. vineae* es muy sensible a la presencia de iones, aunque su osmotolerancia es adecuada.



**Figura R.1.13:** Crecimiento en medios con alta osmolaridad. Se sembraron diferentes diluciones seriadas, a partir de cultivos ajustados a una  $DO_{600}$  de 1, en placas de YPD en presencia de sorbitol (0.9 y 1.5 M) y de YPD sin sorbitol como control. Las placas se incubaron a 30 °C durante 2 días.

### 1.6.3 Estrés oxidativo

En la Figura R.1.14 se puede observar que la cepa comercial de *S. cerevisiae* empleada como control no se vio afectada por la presencia de  $H_2O_2$  durante el crecimiento, independientemente de la concentración en el rango empleado. De entre las especies no-*Saccharomyces*, las más afectadas por el estrés oxidativo fueron *K. wickerhamii* y *Z. bailii*, cuyo crecimiento se vio muy reducido en presencia de 2.5 mM  $H_2O_2$  y fue nulo a 3.5 mM. No se observó ningún efecto sobre el resto de especies no-*Saccharomyces* a concentraciones bajas; sin embargo, todas ellas sufrieron una ligera reducción del crecimiento a la concentración más elevada, especialmente *S. bacillaris*. En el siguiente capítulo se presentan resultados de un estudio más amplio de diferentes parámetros bioquímicos de respuesta frente a estrés oxidativo, que podrían ayudar a entender la capacidad de crecimiento de las levaduras en presencia de este estrés.

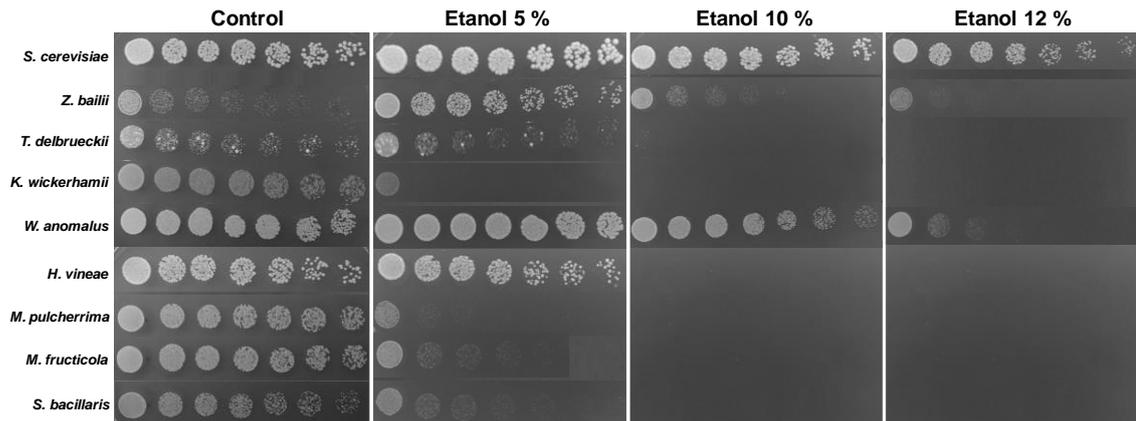


**Figura R.1.14:** Crecimiento en presencia de estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno. Se sembraron diferentes diluciones seriadas, a partir de cultivos ajustados a una  $DO_{600}$  de 1, en placas de YPD en presencia de  $H_2O_2$  (2.5 y 3.5 mM) y de YPD sin  $H_2O_2$  como control. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 horas.

#### 1.6.4 Estrés por etanol

Como se ha mencionado en la Introducción, la acumulación de etanol es uno de los factores determinantes en la supervivencia de las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en el mosto a medida que avanza la fermentación. En la Figura R.1.15 se puede observar que la presencia de etanol tiene un claro efecto negativo sobre el crecimiento de todas las especies no-*Saccharomyces* estudiadas. A concentraciones bajas de etanol (5 %) se observó que el crecimiento de *K. wickerhamii*, *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris* fue prácticamente nulo, y a concentraciones superiores fueron incapaces de crecer. Estos datos, junto con los resultados del estudio de capacidad fermentativa, nos indican que estas especies no están adaptadas al crecimiento en presencia de etanol. Por otro lado, *Z. bailii*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus* y *H. vineae* fueron capaces de crecer en presencia de 5 % de etanol. A concentraciones superiores de etanol (10 y 12 %) solo *Z. bailii* y *W. anomalus* fueron capaces de crecer, aunque su crecimiento disminuyó considerablemente a medida que se aumentó la concentración de etanol, quedando lejos de la tolerancia mostrada por *S. cerevisiae*. Por otra parte, *T. delbrueckii* y *H. vineae* dejaron de mostrar crecimiento a una concentración de etanol del 10 %.

## Resultados y Discusión



**Figura R.1.15:** Crecimiento en presencia de etanol. Se sembraron diferentes diluciones seriadas, a partir de cultivos ajustados a una  $DO_{600}$  de 1, en placas de YPD en presencia de etanol (5, 10 y 12 %) y de YPD sin etanol como control. Las placas con etanol se incubaron a 30 °C durante 2 días.

Una mayor tolerancia al etanol por parte de las levaduras no-*Saccharomyces* asegura que estas puedan permanecer viables durante más tiempo en las primeras etapas de la fermentación haciendo que su influencia sobre el producto final sea mayor, hasta que *S. cerevisiae* acabe imponiéndose. La especie que presentó mayor resistencia al estrés por etanol fue *W. anomalus*, observándose crecimiento incluso en presencia de etanol 12 %, tal y como ya se ha descrito para algunas cepas de esta especie (Sabel et al., 2014; Walker, 2011). La capacidad de *Z. bailii*, *T. delbrueckii* y *H. vineae* de crecer en presencia de concentraciones bajas de etanol correlaciona con los resultados presentados en el apartado anterior, donde se observó que estas tres especies mostraron valores de capacidad fermentativa relativamente elevados, de manera que pueden producir y tolerar ciertos niveles de etanol, pero sucumben a una acumulación elevada del mismo.

## 1.7 Discusión general

La demanda de vinos con perfiles organolépticos complejos y/o menor contenido en etanol ha crecido exponencialmente en los últimos años. Existen múltiples ejemplos del uso de levaduras no-*Saccharomyces* empleadas para tal fin (revisado en Varela, 2016). Sin embargo, para conseguir satisfacer la demanda de estos vinos es necesario producir inóculos en forma de levadura seca activa (LSA) que puedan ser empleados en la industria enológica. Como se ha mencionado en la Introducción, ya existen inóculos comerciales de especies no-*Saccharomyces*, entre los que se incluyen algunos de especies analizadas en este trabajo, como por ejemplo *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia fructicola*, *Starmerella bacillaris*, *Kluyveromyces wickerhamii* y *Wickerhamomyces anomalus*. No obstante, no se han explorado todas las posibilidades que ofrece la enorme diversidad de levaduras presentes de forma natural en ambientes vínicos (Varela y Borneman, 2017).

El proceso de producción industrial de biomasa está altamente adaptado y optimizado para la producción de *S. cerevisiae*, y como se ha visto, de forma general, las especies no-*Saccharomyces* presentan un crecimiento inferior a la cepa comercial que se ha empleado como referencia bajo las condiciones de referencia de crecimiento en melaza. Únicamente se vio un crecimiento similar al control en el caso de *Z. bailii* o *S. bacillaris*. Las diferencias en el crecimiento pueden ser debidas a un peor aprovechamiento de los nutrientes del medio o incluso a la incapacidad de crecer en el mismo. Este hecho quedó patente al estudiar el consumo de la sacarosa presente en la melaza. Se observó que existe una clara correlación entre las cinéticas de consumo de este disacárido, la actividad invertasa y el crecimiento de cada especie en melaza. En general, aquellas especies con capacidad de consumir rápidamente la sacarosa, derivada de una elevada actividad invertasa, fueron las que presentaron una tasa de crecimiento mayor y similar a *S. cerevisiae* en melaza. Por otro lado, destacó el comportamiento de *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *H. vineae*, incapaces de metabolizar la sacarosa del medio, y cuyo crecimiento fue muy bajo en comparación con el control. Como ya se ha mencionado, tanto el proceso de producción industrial como nuestras simulaciones a escala de laboratorio están adaptados a la producción de *S. cerevisiae*, los resultados obtenidos sugieren, que como cabría esperar, las condiciones de trabajo empleadas no son óptimas para la mayoría de especies no-*Saccharomyces* y que algunas requieren tiempos de cultivo más largos para alcanzar el mismo estado de crecimiento que la cepa control, por su menor eficiencia a la hora de metabolizar la sacarosa de la melaza. Aunque los mecanismos de regulación metabólica en las especies no-*Saccharomyces* no se conocen en profundidad, es posible que la pequeña

cantidad de glucosa presente en la melaza sea suficiente para mantener la represión sobre la expresión de los genes encargados del catabolismo de fuentes de carbono alternativas, mediada en el caso de *S. cerevisiae* por el represor *MIG1* de la ruta *Snf1*. En el caso de *S. cerevisiae* y seguramente en aquellas especies con una elevada actividad invertasa, no parece haber ningún impedimento a nivel metabólico para que se desreprima la expresión de los genes encargados del metabolismo de la sacarosa.

Además de determinar el comportamiento de en condiciones de propagación de biomasa, es importante conocer cómo se comportan en un medio y condiciones de crecimiento que simulan las primeras etapas de la fermentación del mosto de uva y que difieren sustancialmente de las condiciones de propagación de biomasa. Aunque una elevada capacidad fermentativa no es un parámetro estrictamente buscado en levaduras no-*Saccharomyces*, debido al ya comentado interés por producir vinos con un menor grado alcohólico (Varela et al., 2015), esta se analizó para determinar la adaptación metabólica de las levaduras a las condiciones de vinificación. Entre las especies analizadas se encontraron tres con una capacidad fermentativa relativamente elevada: *T. delbrueckii*, *H. vineae* y *Z. bailii*, que se ajusta a lo ya descrito por otros autores (Bely et al., 2008; Kuanyshev et al., 2017; Martin et al., 2018). Por otro lado, en el resto de especies la capacidad fermentativa detectada fue mínima, algo que cabía esperar teniendo en cuenta el carácter *Crabtree* negativo de la mayoría de ellas. Sin embargo, como ya se ha mencionado, esta característica es deseable cuando se trabaja con levaduras no-*Saccharomyces*, debido a su potencial uso como inóculos para la reducción del etanol en el vino final (Ciani et al., 2016; Contreras et al., 2015; González et al., 2013). De igual modo la menor eficiencia en fermentativa de las levaduras no convencionales en comparación con *S. cerevisiae* puede ser empleada para reducir el contenido de etanol del vino (Jolly et al., 2014; Varela, 2016).

Debido al interés en la obtención de inóculos de especies no-*Saccharomyces* en forma de LSA, resulta especialmente interesante caracterizar su comportamiento en condiciones de deshidratación de la biomasa procedente de cultivos en melaza. Tras la estandarización del tiempo de deshidratación para obtener una biomasa con alrededor de un 10 % de humedad relativa, se analizó la viabilidad de la LSA obtenida. Se encontraron tres especies (*M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*) con una viabilidad muy elevada, superior a la cepa control, lo cual las convierte en candidatas ideales para la producción de inóculos comerciales. Por otro lado, el resto de especies presentaron viabilidades similares o inferiores al control, destacando la extremadamente baja viabilidad de *H. vineae*. En este caso, la baja viabilidad de la LSA sería el principal impedimento para la producción de inóculos de esta especie enológica relevante.

Es posible, que la menor viabilidad de algunas de estas especies esté relacionada con la fase de crecimiento en la que se encuentran, ya que hacia el final del crecimiento se produce la inducción de la expresión de genes de respuesta a estrés (Gómez-Pastor et al., 2011) y la acumulación de metabolitos de reserva (Garre et al., 2010) importantes para la supervivencia a la deshidratación. De hecho, en *S. cerevisiae* la supervivencia al proceso de deshidratación es considerablemente superior en células en estado estacionario que en células en crecimiento exponencial (Calahan et al., 2011). Además, estas especies pueden ser más sensibles a ciertas condiciones de estrés, como es el caso del estrés iónico para *H. vineae*. De cualquier modo, la viabilidad de las levaduras tras la deshidratación es un parámetro tecnológicamente mejorable. Como se ha mencionado, el estado fisiológico y metabólico de la célula antes de la deshidratación determina su supervivencia al proceso, por lo que ajustar las condiciones de cultivo en función de cada especie es necesario para conseguir una LSA con la mayor viabilidad posible. También son posibles otras estrategias adicionales, como la deshidratación y la rehidratación en presencia de diferentes protectores, como la leche en polvo o la trehalosa, que ya han sido empleados para mejorar la viabilidad de *S. cerevisiae* (Rodríguez-Porrata et al., 2011; Romano et al., 2015) y de levaduras no-*Saccharomyces* (Roca-Domènech et al., 2018, 2016).

La capacidad de respuesta de las levaduras a los diferentes estreses a los que se ven sometidos a lo largo de su propagación industrial está íntimamente relacionada con la obtención de LSA con una buena eficiencia tecnológica para su posterior uso en condiciones de vinificación. En esta sección se ha determinado que las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas se ven muy afectadas por elevadas temperaturas, estrés osmótico, oxidativo y estrés por etanol. Profundizar en la caracterización de la respuesta a estos estreses puede ser clave de cara a mejorar el comportamiento de estas especies en condiciones de propagación de biomasa. A continuación, se exponen los resultados obtenidos a partir de un análisis más amplio de una serie de parámetros bioquímicos con el fin de encontrar una relación entre el comportamiento fisiológico y la capacidad de respuesta a estrés de estas levaduras.

## **2. Caracterización bioquímica de mecanismos de respuesta a estrés oxidativo de especies de levaduras no-*Saccharomyces*.**

Como ya se ha comentado en la Introducción, a lo largo del proceso de propagación y deshidratación de la biomasa las levaduras están sometidas a una serie de condiciones de estrés, que afectan a la eficiencia tecnológica y la viabilidad de la misma, siendo el estrés oxidativo uno de los principales factores a tener en cuenta (Matallana y Aranda, 2017). Las condiciones aeróbicas de cultivo causan un estrés oxidativo interno a lo largo del proceso, pero especialmente en la transición al metabolismo respiratorio impuesto en la fase *fed-batch*. Durante la fase *fed-batch* del crecimiento y la deshidratación se inducen numerosos genes relacionados con el estrés oxidativo (Gómez-Pastor et al., 2010a, 2010b). Entender los mecanismos celulares de protección frente a estrés oxidativo de especies de levaduras vínicas no convencionales puede ser una herramienta muy útil para la evaluación de su potencial como inóculos en forma de LSA.

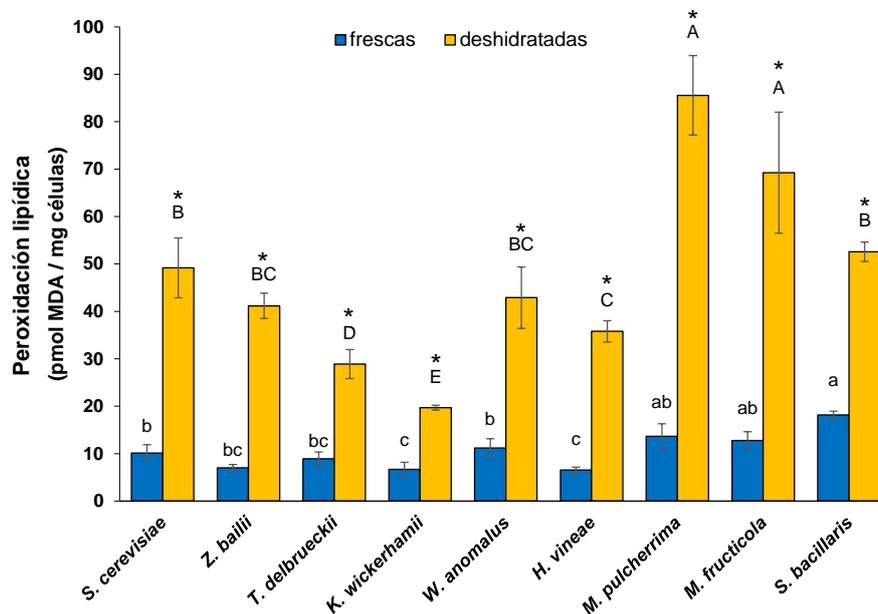
En los últimos años, en nuestro grupo de investigación se han descrito una serie de parámetros, que incluyen actividades enzimáticas (catalasa y glutatión reductasa) y moléculas protectoras (trehalosa y glutatión) que están relacionados con un mejor comportamiento industrial de la LSA de diferentes cepas de *S. cerevisiae* (Gamero-Sandemetro et al., 2014). Recientemente, se han publicado trabajos en los que se muestra que existe una correlación entre una mejor respuesta frente a estrés oxidativo y una mejor tolerancia frente a la deshidratación, haciendo hincapié en el papel de la trehalosa y el glutatión (Câmara et al., 2019b; Gamero-Sandemetro et al., 2018). Aun así, la bibliografía existente sobre especies no-*Saccharomyces* en condiciones de propagación de biomasa es muy escasa. Por otro lado, diferentes estudios en *S. cerevisiae* han resaltado el papel de la composición de la membrana lipídica de las células a la hora de adaptarse y hacer frente a condiciones de estrés (Beltran et al., 2008; Casey y Ingledew, 1986; Sakamoto y Murata, 2002) y recientemente se ha comprobado la importancia de la insaturación de los lípidos de membrana a la hora de hacer frente a estrés oxidativo en especies no-*Saccharomyces* (Vázquez et al., 2019).

Por lo tanto, debido a la importancia de la capacidad de respuesta a estrés oxidativo durante la producción de LSA, decidimos estudiar los parámetros de respuesta a estrés mencionados anteriormente, así como la composición lipídica de especies seleccionadas. Todos los ensayos descritos a continuación se realizaron en células frescas, procedentes de cultivo en melaza, y en células deshidratadas a partir de las mismas condiciones.

## 2.1 Determinación del daño oxidativo sobre lípidos

Como ya se ha mencionado en la Introducción, una de las principales consecuencias del estrés oxidativo es el daño directo sobre los lípidos de membrana. Para evaluar el efecto del estrés oxidativo al que se ven sometidas las levaduras a lo largo del proceso de producción de LSA se estudiaron los niveles de peroxidación lipídica a través de la medida de los niveles de malondialdehído (MDA) en células frescas y deshidratadas, tal y como se describe en el apartado 5.2.1 de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R.2.1. Como se puede observar, todas las especies experimentaron un aumento significativo en los niveles de MDA tras el proceso de deshidratación. Este aumento seguramente sea debido al estrés oxidativo al que se ven sometidas las células durante el proceso de deshidratación. Si se analizan los valores obtenidos en las células frescas, se observa que no hubo grandes diferencias en la acumulación de MDA entre especies. *S. bacillaris* fue la única especie que presentó niveles de MDA superiores a los de la cepa control, mientras que *K. wickerhamii* y *H. vineae* presentaron niveles ligera pero significativamente inferiores.



**Figura R.2.1:** Niveles de peroxidación (pmol de MDA / mg de células) en células frescas (barras azules) y células deshidratadas (barras amarillas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies y diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

Si se analizan los valores obtenidos en biomasa deshidratada se vio que existen diferencias en los niveles totales de MDA entre especies (Figura R.2.1). *Z. bailii*, *W. anomalous* y *S. bacillaris* presentaron niveles similares a la cepa control, mientras que *H. vineae*, *K. wickerhamii* y *T. delbrueckii* presentaron niveles de MDA más bajos que el control en esta condición. Las especies que presentaron un mayor grado de peroxidación lipídica fueron *M. pulcherrima* y *M. fructicola*. Curiosamente estas dos especies fueron aquellas que presentaron los valores de viabilidad de la LSA más elevados, un resultado que en principio no estaría de acuerdo con el hecho de que presenten mayor daño oxidativo. Esta mayor peroxidación podría ser debida a su metabolismo respiratorio o, como se describe más adelante, a su composición lipídica. De forma similar, se puede observar que en especies con una viabilidad inferior a *S. cerevisiae*, como *K. wickerhamii* o *H. vineae*, los niveles de peroxidación son inferiores. Cuando se analiza el incremento de peroxidación lipídica asociado a la deshidratación (Tabla R.2.1), se observa que las especies en las que el porcentaje de aumento fue menor fueron *S. bacillaris*, *K. wickerhamii* y *T. delbrueckii*. Otras especies, como son *Z. bailii* o *M. pulcherrima* experimentaron un incremento significativamente mayor. Todo esto indica que, a pesar de tratarse de un buen indicador del daño oxidativo al que se ven sometidas las levaduras a lo largo del proceso de producción de LSA, la peroxidación lipídica no se puede tomar como el único parámetro de referencia a la hora de valorar el efecto del estrés oxidativo sobre la eficiencia tecnológica de las levaduras ya que no existe una relación directa entre los niveles de MDA y la viabilidad de la LSA. Además del metabolismo de cada una de las especies, otros factores pueden influir en una mayor peroxidación lipídica, por lo que es necesario profundizar en la caracterización de la respuesta a estrés oxidativo de estas especies para poder trazar una relación con el comportamiento tecnológico de cada una de ellas.

**Tabla R.2.1:** Factor de incremento del nivel de MDA en células deshidratadas, tomando como base el valor de las células frescas. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

Especie	Factor de incremento
<i>S. cerevisiae</i>	4.91 ( $\pm 0.79$ ) <sup>ab</sup>
<i>Z. bailii</i>	5.93 ( $\pm 0.80$ ) <sup>a</sup>
<i>T. delbrueckii</i>	3.30 ( $\pm 0.69$ ) <sup>bc</sup>
<i>K. wickerhamii</i>	3.03 ( $\pm 0.53$ ) <sup>c</sup>
<i>W. anomalus</i>	3.98 ( $\pm 1.24$ ) <sup>bc</sup>
<i>H. vineae</i>	5.48 ( $\pm 0.35$ ) <sup>ab</sup>
<i>M. pulcherrima</i>	6.36 ( $\pm 0.72$ ) <sup>ab</sup>
<i>M. fructicola</i>	5.40 ( $\pm 0.39$ ) <sup>ab</sup>
<i>S. bacillaris</i>	2.89 ( $\pm 0.08$ ) <sup>c</sup>

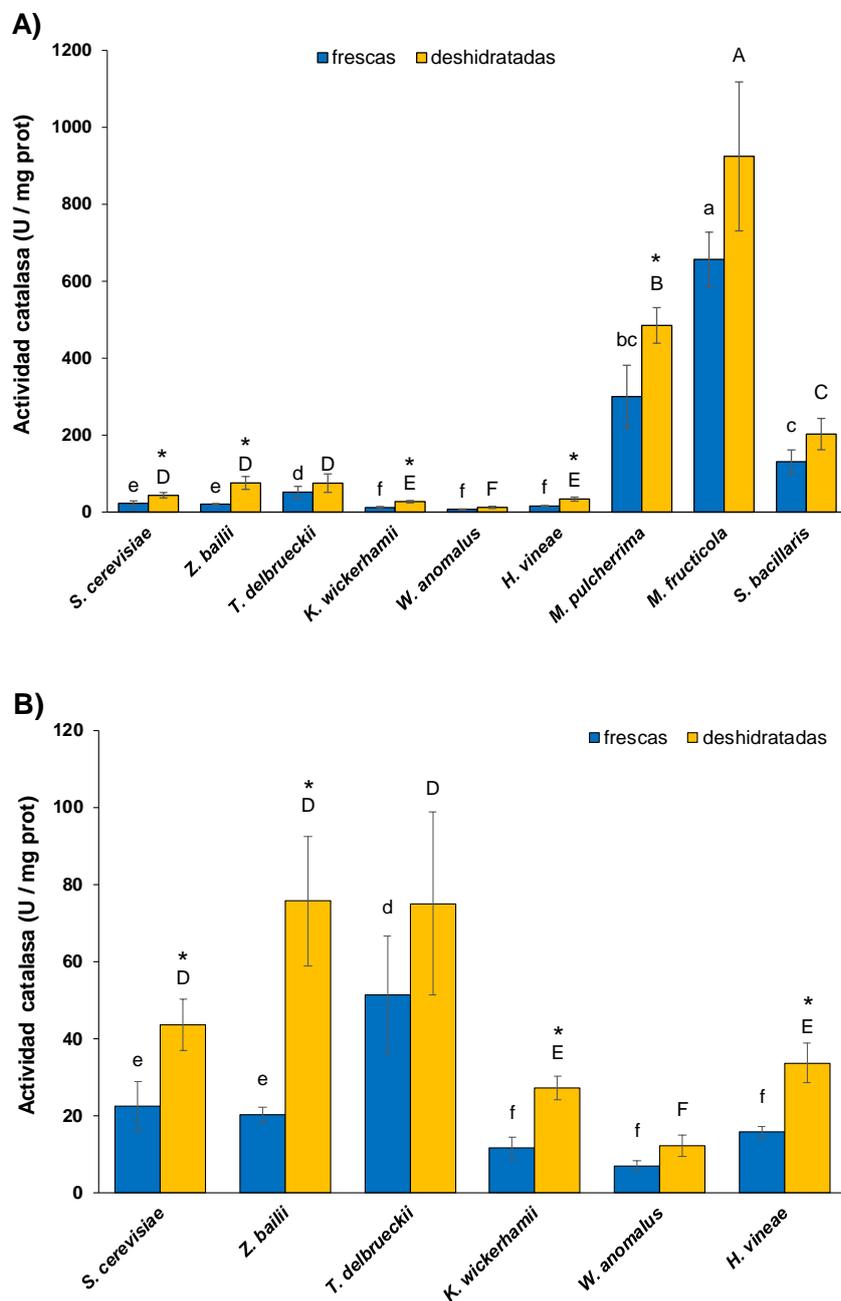
## 2.2 Determinación de actividades enzimáticas de defensa antioxidante

### 2.2.1 Actividad catalasa

La catalasa es la enzima encargada de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua, por lo que tiene un efecto directo en la eliminación de especies reactivas del oxígeno en el interior celular. La actividad catalasa se midió siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la Figura R.2.2, entre las especies analizadas destaca la actividad extraordinariamente elevada detectada en ambas condiciones en *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*, un orden de magnitud superior al resto. Más allá de estas tres especies, se puede observar como la actividad catalasa en células frescas de *K. wickerhamii*, *H. vineae* y *W. anomalus* es menor que en la cepa de referencia, mientras que la actividad catalasa de *T. delbrueckii* fue superior (Figura R.2.2.B). Tras la deshidratación, en general, se observa una clara inducción de la actividad catalasa como respuesta a un mayor estrés oxidativo. Igual que ocurría en la biomasa fresca, la actividad catalasa detectada en células deshidratadas de *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris* es diez veces superior a la del resto de especies. En lo que se refiere al resto de especies, en células deshidratadas la actividad de *Z. bailii* y *T. delbrueckii* fue ligeramente superior a la del control, mientras que en *K.*

*wickerhamii*, *H. vineae* y *W. anomalus* los valores de actividad se mantuvieron por debajo de los de *S. cerevisiae*.



**Figura R.2.2:** Actividad catalasa en biomasa fresca (barras azules) y biomasa deshidratada (barras amarillas). El panel **A)** recoge los valores de actividad de todas las especies analizadas en ambas condiciones. El panel **B)** muestra un detalle de aquellas especies con valores de actividad más bajos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies y diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

El factor de incremento de actividad entre condiciones varía entre las diferentes especies (Tabla R.2.2). Resulta especialmente interesante que aquellas especies con una mayor actividad (*M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*) fueron las que presentaron incrementos más reducidos. En estos casos, parece que la elevada actividad basal, seguramente promovida por un metabolismo respiratorio, hace innecesaria una mayor inducción de esta actividad enzimática, ya que las células se encuentran en todo momento preparadas para eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en el interior celular. De entre las especies con niveles más bajos de actividad, *T. delbrueckii* y *W. anomalus* presentaron un incremento similar al de las especies anteriormente mencionadas tras la deshidratación, lo cual es especialmente significativo en el caso de *W. anomalus* en vista de los bajos niveles basales de actividad, lo que indicaría una pobre predisposición y respuesta al estrés oxidativo al que se ven sometidas las células. El resto de especies presentaron incrementos de la actividad más elevados y similares al de *S. cerevisiae*, siendo especialmente destacable el caso de *Z. bailii*, que presentó una inducción mayor que la detectada en la cepa de referencia.

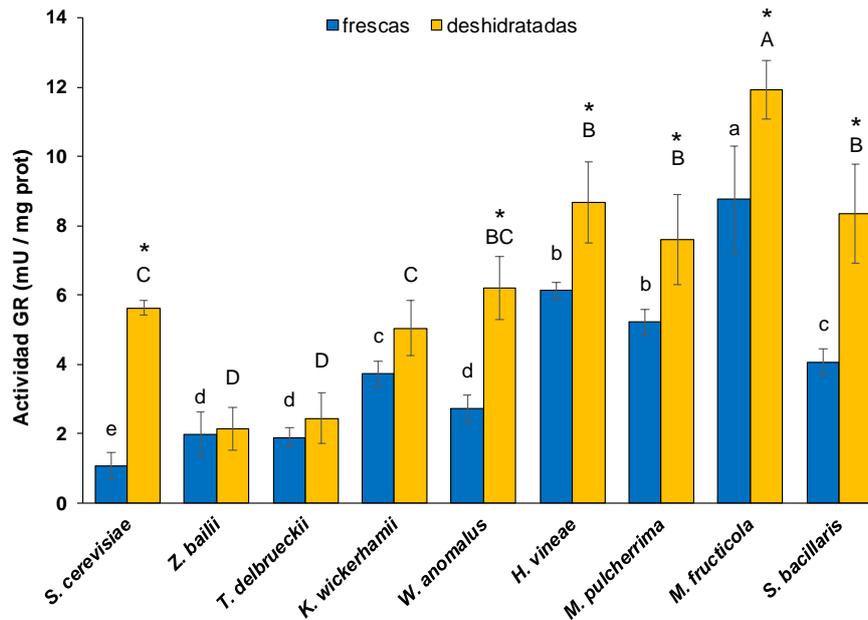
Una elevada actividad catalasa basal, y su posterior inducción adecuada tras la deshidratación, están relacionadas con una mayor viabilidad de la LSA en cepas de *S. cerevisiae* (Gamero-Sandemetro et al., 2014). Sin embargo, la catalasa es solo uno de los múltiples mecanismos de respuesta a estrés oxidativo de los que dispone la célula, por lo que resulta difícil trazar una única relación entre actividad catalasa y comportamiento tecnológico. A pesar de esto, esta relación queda patente en el caso de *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*, que presentaron niveles extraordinariamente elevados de actividad catalasa y cuya viabilidad fue la más elevada tras la deshidratación. Los resultados aquí obtenidos constatan la elevada actividad catalasa de *M. pulcherrima* propuesta por Mestre Furlani et al., (2017) en base a la capacidad de esta especie por crecer en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En el resto de especies no-*Saccharomyces* la relación entre actividad catalasa y viabilidad no es tan clara. El caso de *Z. bailii* y *T. delbrueckii* se vio que el comportamiento en deshidratación y sus valores de actividad catalasa son similares a los de *S. cerevisiae*. A pesar de la inducción de la actividad catalasa observada en *K. wickerhamii* o *H. vineae*, esta no parece ser suficiente para mantener una viabilidad elevada tras la deshidratación, probablemente porque incluso en esas condiciones los niveles de actividad son muy bajos.

**Tabla R.2.2:** Factor de incremento de la actividad catalasa en células deshidratadas, tomando como base el valor de las células frescas. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

<b>Especie</b>	<b>Factor de incremento</b>
<i>S. cerevisiae</i>	2.02 ( $\pm 0.33$ ) <sup>b</sup>
<i>Z. bailii</i>	3.73 ( $\pm 0.91$ ) <sup>a</sup>
<i>T. delbrueckii</i>	1.46 ( $\pm 0.11$ ) <sup>c</sup>
<i>K. wickerhamii</i>	2.47 ( $\pm 0.67$ ) <sup>ab</sup>
<i>W. anomalus</i>	1.76 ( $\pm 0.49$ ) <sup>bc</sup>
<i>H. vineae</i>	2.13 ( $\pm 0.22$ ) <sup>b</sup>
<i>M. pulcherrima</i>	1.76 ( $\pm 0.65$ ) <sup>bc</sup>
<i>M. fructicola</i>	1.42 ( $\pm 0.38$ ) <sup>bc</sup>
<i>S. bacillaris</i>	1.69 ( $\pm 0.86$ ) <sup>bc</sup>

### 2.2.2 Actividad glutatión reductasa

La glutatión reductasa (GR) es la enzima encargada de catalizar la reducción del glutatión oxidado y formar glutatión reducido, un proceso crítico para el mantenimiento del ambiente reductor en el interior celular. La actividad glutatión reductasa se midió siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2.2 de Materiales y Métodos.



**Figura R.2.3:** Actividad glutatión reductasa en células frescas (barras azules) y células deshidratadas (barras amarillas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies y diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

La actividad glutatión reductasa fue muy variable entre las diferentes especies, como puede observarse en la Figura R.2.3. En células frescas todas las especies no-*Saccharomyces* presentaron valores de actividad GR más elevados que los de la cepa control, siendo *H. vineae* y las dos especies del género *Metschnikowia* las que presentaron una mayor actividad, mientras que *Z. bailii*, *T. delbrueckii*, *K. wickerhamii*, *W. anomalus* y *S. bacillaris* presentaron valores de actividad basal inferiores a estas, pero superiores a *S. cerevisiae*. A pesar de las diferencias en los niveles de actividad basal, tras la deshidratación se produjo un aumento de la actividad GR comparable entre todas las especies no-*Saccharomyces* y significativamente mayor en el caso de *S. cerevisiae* (Tabla R.2.3). El aumento de la actividad GR tras la deshidratación sugiere

un aumento del estrés oxidativo endógeno, que coincide con el aumento de la peroxidación lipídica observado en estas condiciones. Además, el mayor incremento detectado en *S. cerevisiae* indica una mayor capacidad de respuesta de esta especie al aumento de los niveles de glutatión oxidado, permitiendo así que este permanezca en su forma reducida y que las funciones celulares no se vean afectadas. El menor incremento observado en las especies no-*Saccharomyces* podría ser explicado por su elevada actividad basal, que en algunos casos (*H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*) es comparable a la actividad GR tras la deshidratación de la cepa control. De cualquier modo, a pesar del menor factor de incremento, en estas tres especies y en *S. bacillaris* la actividad total en células deshidratadas fue superior a la de la cepa control. No ocurre así en el resto de especies, en las que el pobre factor de incremento hace que los valores totales de actividad en células deshidratadas sean inferiores (*Z. bailii*, *T. delbrueckii*) o comparables (*K. wickerhamii*, *W. anomalus*) a los de *S. cerevisiae*. En cualquier caso, en este último grupo de especies los valores de actividad GR fueron similares entre condiciones, lo cual indicaría una pobre capacidad de respuesta a los cambios en los niveles de glutatión oxidado que se acumulan en el interior celular como consecuencia del estrés oxidativo. En apartados posteriores se analizan los niveles de glutatión en ambas condiciones. Es posible, que la baja acumulación de glutatión total y oxidado de algunas de estas especies, en especial *Z. bailii*, *T. delbrueckii* y *W. anomalus*, haga innecesaria una actividad GR elevada.

**Tabla R.2.3:** Factor de incremento de la actividad glutatión reductasa en células deshidratadas, tomando como base el valor de las células frescas. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

Especie	Factor de incremento
<i>S. cerevisiae</i>	5.31 ( $\pm 0.14$ ) <sup>a</sup>
<i>Z. bailii</i>	1.29 ( $\pm 0.75$ ) <sup>b</sup>
<i>T. delbrueckii</i>	1.34 ( $\pm 0.51$ ) <sup>b</sup>
<i>K. wickerhamii</i>	1.36 ( $\pm 0.25$ ) <sup>b</sup>
<i>W. anomalus</i>	2.35 ( $\pm 0.51$ ) <sup>b</sup>
<i>H. vineae</i>	1.42 ( $\pm 0.20$ ) <sup>b</sup>
<i>M. pulcherrima</i>	1.55 ( $\pm 0.38$ ) <sup>b</sup>
<i>M. fructicola</i>	1.37 ( $\pm 0.23$ ) <sup>b</sup>
<i>S. bacillaris</i>	2.09 ( $\pm 0.52$ ) <sup>b</sup>

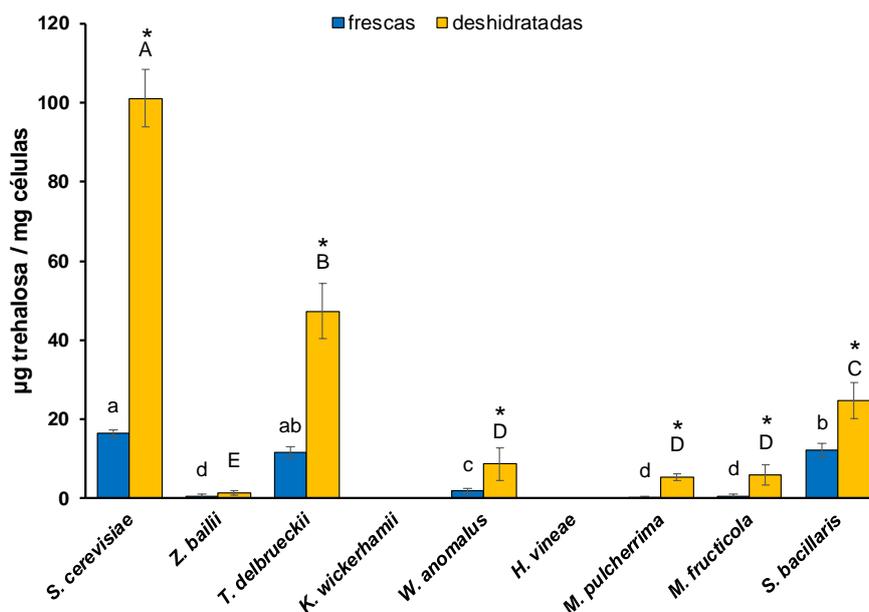
## 2.3 Determinación de metabolitos intracelulares de protección frente a estrés

Además de los mecanismos enzimáticos de defensa, como ya se ha mencionado en la Introducción, también existen mecanismos no enzimáticos que ayudan a combatir el estrés oxidativo y a mantener un correcto balance redox en el interior celular. Se procedió a la determinación de los niveles de trehalosa y de las diversas formas de glutatión como representantes de este tipo de metabolitos protectores frente a estrés oxidativo.

### 2.3.1 Niveles de trehalosa

La trehalosa es un disacárido ampliamente distribuido en la naturaleza y cuyo papel como protector frente a condiciones de estrés ha sido estudiado en detalle, como se ha mencionado en la Introducción. Los niveles de trehalosa se analizaron según lo descrito en el apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos. En la Figura R.2.4 se puede observar la gran variabilidad existente en la acumulación de trehalosa entre especies. *T. delbrueckii* y *S. bacillaris* fueron las únicas dos especies que acumularon niveles de trehalosa similares a los de la cepa comercial en células frescas. En el resto de especies los niveles de trehalosa fueron muy bajos, y en el caso de *K. wickerhamii* y *H. vineae* no se llegó a detectar trehalosa. La deshidratación resultó en un aumento de la acumulación de trehalosa en prácticamente todas las especies. En los únicos casos en los que no se detectaron diferencias significativas entre condiciones fue en *Z. bailii*, cuyos niveles de trehalosa se mantuvieron cercanos a cero, y en *K. wickerhamii* y *H. vineae* en las que tampoco fuimos capaces de detectar trehalosa tras la deshidratación. En células deshidratadas, *S. cerevisiae* presentó los niveles de trehalosa más elevados, seguida de aquellas especies que también presentaron niveles elevados en células frescas (*T. delbrueckii* y *S. bacillaris*). En *W. anomalus*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola* se observó una acumulación significativamente mayor de trehalosa como consecuencia de la deshidratación, aunque los niveles totales siguieron siendo muy bajos en relación a la cepa control (incluso inferiores a los observados en células frescas de *S. cerevisiae*). Cabe destacar que, a pesar de que los niveles totales de trehalosa en estas especies fueron bajos, el factor de incremento entre ambas condiciones es muy superior (*M. pulcherrima* y *M. fructicola*) o similar (*W. anomalus*) al de *S. cerevisiae* (Tabla R.2.4).

## Resultados y Discusión



**Figura R.2.4:** Acumulación de trehalosa en células frescas (barras azules) y células deshidratadas (barras amarillas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies y diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

**Tabla R.2.4:** Factor de incremento de los niveles de trehalosa en células deshidratadas, tomando como base el valor de las células frescas. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

Especie	Factor de incremento
<i>S. cerevisiae</i>	6.18 ( $\pm 0.79$ ) <sup>b</sup>
<i>Z. bailii</i>	2.91 ( $\pm 1.84$ ) <sup>d</sup>
<i>T. delbrueckii</i>	4.10 ( $\pm 0.43$ ) <sup>c</sup>
<i>K. wickerhamii</i>	No detectable
<i>W. anomalus</i>	5.38 ( $\pm 3.09$ ) <sup>bcd</sup>
<i>H. vineae</i>	No detectable
<i>M. pulcherrima</i>	27.55 ( $\pm 11.13$ ) <sup>a</sup>
<i>M. fructicola</i>	26.28 ( $\pm 4.32$ ) <sup>a</sup>
<i>S. bacillaris</i>	2.05 ( $\pm 0.46$ ) <sup>d</sup>

La trehalosa juega un papel clave en la tolerancia a la deshidratación (Dupont et al., 2014; Eleutherio et al., 2015; Rapoport et al., 2019). Nuestros resultados muestran las grandes diferencias existentes en los niveles de trehalosa entre especies. La ausencia de trehalosa en *K. wickerhamii* y *H. vineae* es, probablemente, uno de los factores determinantes en su baja viabilidad. Sin embargo, otras especies con una acumulación de trehalosa baja en términos absolutos, como es el caso de *M. pulcherrima* y *M. fructicola*, presentaron valores muy elevados de viabilidad. No obstante, en dichas cepas existe activación de la síntesis en respuesta a la deshidratación, lo que indica que los mecanismos de respuesta existen y son efectivos. Este hecho constata la complejidad de la respuesta a estrés, en la que intervienen múltiples factores que pueden llegar a compensar la falta de otros mecanismos *a priori* vitales para la supervivencia al proceso de deshidratación.

Con el fin de profundizar en la caracterización del papel de la trehalosa durante la deshidratación decidimos analizar la presencia de genes con homología de secuencia a los del metabolismo de la trehalosa de *S. cerevisiae* en las especies no-*Saccharomyces*, a partir de los datos genómicos disponibles para cada una de ellas. Se analizó la presencia de los genes *TPS1*, *TPS2*, *TSL1* (codificantes de las proteínas componentes del complejo trehalosa sintasa), *NTH1* y *ATH1* (codificantes de las trehalasas neutra y ácida, respectivamente) mediante la interfaz online de la herramienta de análisis BLAST del NCBI.

En la Tabla 2.5 se recogen los resultados derivados de la búsqueda de genes ortólogos en las distintas especies. En ella se representa el porcentaje de cobertura de la secuencia de cada uno de los genes en las especies estudiadas, así como la identidad de secuencia sobre la región que presenta cobertura. En las especies *Z. bailii*, *T. delbrueckii*, las más cercanas filogenéticamente a *S. cerevisiae* (Shen et al., 2016), se encontraron secuencias homólogas con un alto porcentaje de identidad para todos los genes analizados. Del mismo modo, en *W. anomalus* también se encontraron secuencias con un alto porcentaje de similitud con las de *TPS1*, *TPS2* y *NTH1*, y un porcentaje menor (29 – 30 %) para *TSL1* y *ATH1*. Cabe destacar que *K. wickerhamii* y *H. vineae*, en las que se fue incapaz de detectar trehalosa, presentan secuencias con alto porcentaje de homología a las de la mayoría de los genes (todos salvo *ATH1* en *K. wickerhamii* y *ATH1* y *TSL1* en *H. vineae*), lo cual indica que disponen de la maquinaria celular para la síntesis y el metabolismo de la trehalosa, pero que no la producen bajo las condiciones ensayadas, o si lo hacen, los niveles totales son muy bajos. Cabe destacar que en *S. cerevisiae*, la trehalosa se acumula cuando las células empiezan a acercarse a la fase estacionaria del crecimiento, además de en condiciones de estrés

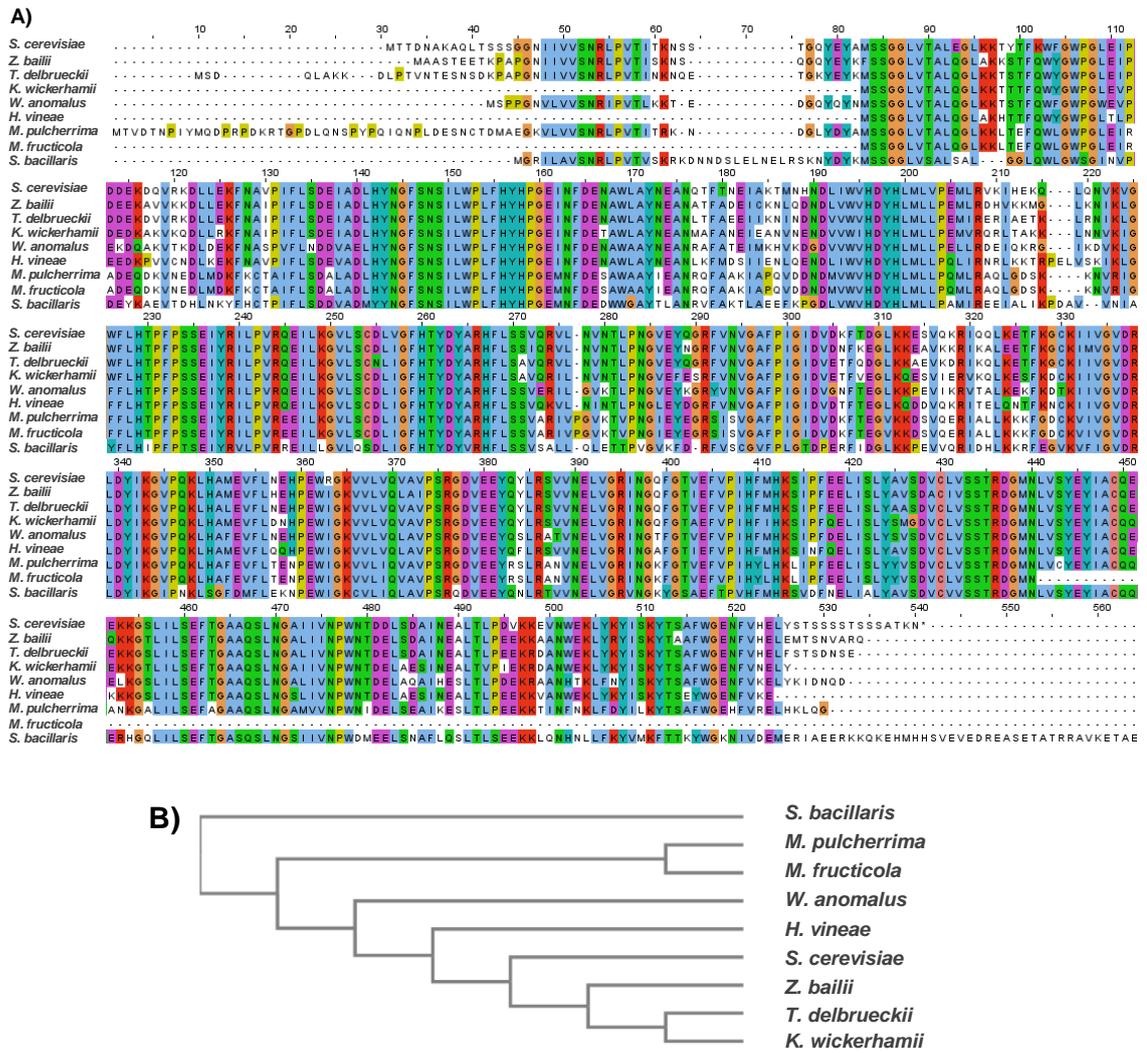
(revisado en Eleutherio et al., 2015), por lo que existe la posibilidad de que no se consiguiera detectar trehalosa en células frescas por no haber alcanzado las células un estado de crecimiento lo suficientemente avanzado como para comenzar a sintetizarla. No obstante, es muy destacable que tras la deshidratación los niveles totales sigan siendo tan bajos (o nulos) en la mayoría de las especies, dada la importancia de este metabolito en la protección frente a la deshidratación en *S. cerevisiae*. Por otro lado, en *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris* tan solo se encontraron secuencias similares a la de *TPS1*. Si nos fijamos en el resto de genes, en *M. pulcherrima*, *M. fructicola* se encontraron secuencias con un bajo porcentaje de homología a las de *TPS2*, *TSL1* y *NTH1* (entre el 35 - 10 %), mientras que en el caso de *ATH1* no se encontraron secuencias homólogas en ninguna de las especies. Es especialmente significativo el caso de *S. bacillaris*. En esta especie se consiguieron detectar niveles de trehalosa relativamente elevados en las condiciones ensayadas, lo que parece indicar que dispone de la maquinaria celular de síntesis de este disacárido. Sin embargo, no se encontraron secuencias homólogas a las de los genes *TPS2*, *TSL1*, *NTH1* y *ATH1* de *S. cerevisiae*. Es posible que en aquellos casos en los que no se consiguieron encontrar secuencias homólogas fuera debido al precario nivel de ensamblaje de las secuencias disponibles. No obstante, como se ha mencionado, el gen *TPS1* se encuentra en todas las especies, lo cual tiene sentido si se tiene en cuenta que codifica la trehalosa-6-fosfato sintasa, enzima que cataliza la formación de trehalosa-6-fosfato a partir de la glucosa, y que este metabolito tiene un papel regulador fundamental sobre la actividad hexoquinasa, asegurando una correcta regulación del flujo glicolítico (Blázquez et al., 1993; François y Parrou, 2001).

**Tabla R.2.5:** Análisis de la presencia de genes del metabolismo de la trehalosa en especies no-*Saccharomyces*. El porcentaje de cobertura de secuencia y de identidad (columnas) se obtuvieron mediante un análisis con la herramienta BLAST del NCBI. En verde se marcan los genes con un porcentaje de homología mayor del 50 %, en amarillo aquellos entre el 50 y el 10 % y en rojo los genes para los que no se encontró homología.

	<b>TPS1</b>		<b>TPS2</b>		<b>TSL1</b>		<b>NTH1</b>		<b>ATH1</b>	
	Cobertura secuencia problema (%)	Identidad de secuencia (%)	Cobertura secuencia problema (%)	Identidad de secuencia (%)	Cobertura secuencia problema (%)	Identidad de secuencia (%)	Cobertura secuencia problema (%)	Identidad de secuencia (%)	Cobertura secuencia problema (%)	Identidad de secuencia (%)
<i>Z. bailii</i>	93	74.4	90	69.9	61	68	98	70.5	58	71
<i>T. delbrueckii</i>	94	77.5	84	72	60	68	98	72.2	71	68
<i>K. wickerhamii</i>	93	74	83	68.5	57	65	83	65.1	35	70.1
<i>W. anomalus</i>	88	70.5	82	65	29	66.7	80	69.3	30	65.3
<i>H. vineae</i>	93	71.44	68	65.4	34	66.2	80	65.1	13	70.7
<i>M. pulcherrima</i>	91	68.2	32	65	15	70.5	31	69.2		
<i>M. fructicola</i>	92	68.3	32	70	15	71.3	17	73.6		
<i>S. bacillaris</i>	40	66.5								

Con el fin de ampliar el estudio de la maquinaria celular para la síntesis de trehalosa en las especies no-*Saccharomyces* analizadas, se decidió realizar un análisis comparativo de la secuencia de la proteína Tps1 de *S. cerevisiae* con las secuencias homólogas presentes en los genomas secuenciados de las especies no-*Saccharomyces*. En la Figura R.2.5 se recoge el alineamiento de dichas secuencias, obtenido mediante la herramienta de alineamiento de secuencias múltiples *Clustal Omega*, así como el árbol filogenético derivado de dicho alineamiento. Como cabría esperar, en base a los datos anteriormente presentados acerca de la homología de secuencia del gen *TPS1*, todas las especies presentan proteínas con una elevada homología a lo largo de toda la secuencia y dominios muy conservados respecto a la proteína Tps1p de *S. cerevisiae*. Por ello, parece claro que todas las especies analizadas disponen de proteínas ortólogas con estructura y función homólogas a *S. cerevisiae* para la síntesis de, al menos, el precursor de la trehalosa, la trehalosa-6-fosfato. El árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias analizadas (Figura R.2.5.B) se ajusta relativamente al árbol filogenético del subfilo *Saccharomycotina* mostrado en la Introducción (Figura I.1). Especies filogenéticamente cercanas, como las dos especies del género *Metschnikowia* o *S. cerevisiae*, *Z. bailii* y *T. delbrueckii*, se encuentran cercanas entre sí, mientras que *S. bacillaris*, la especie más alejada

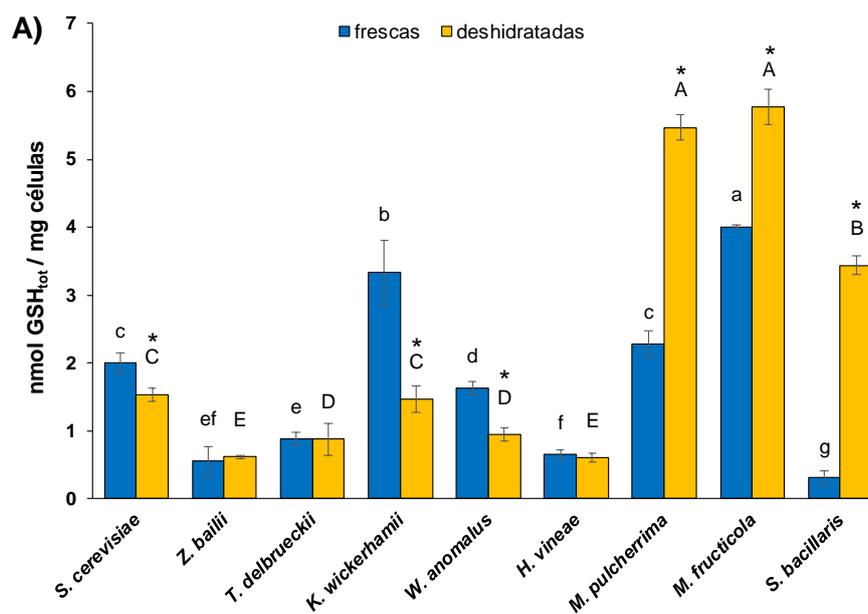
filogenéticamente del resto, es la que presenta una mayor divergencia. El análisis de la homología de secuencia de Tps1p ha dejado patente que se trata de una proteína altamente conservada entre las levaduras analizadas, y probablemente en todas las levaduras de este subfilo. El elevado grado de conservación de esta proteína a lo largo de todas las especies analizadas entra dentro de lo esperado, en base a su papel regulador sobre la actividad hexoquinasa y a la represión por glucosa y a la importancia de la trehalosa en la respuesta a estrés. Estas observaciones, junto con lo expuesto en referencia a la homología de secuencia con el resto de genes del metabolismo de la trehalosa, indican que las especies analizadas parecen disponer de la maquinaria celular necesaria para la síntesis de trehalosa. No obstante, como se ha visto, bajo las condiciones de cultivo ensayadas, algunas de las especies analizadas no parecen acumular trehalosa (*K. wickerhamii* y *H. vineae*) o, si lo hacen, es a niveles significativamente inferiores a los de *S. cerevisiae* incluso tras la deshidratación (*Z. bailii*, *W. anomalus*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*). Como ya se ha mencionado, es posible que los bajos niveles de trehalosa detectados se deban a que las células no se encuentran en el estado metabólico adecuado para su acumulación. En cualquier caso, en estas especies, la ausencia de trehalosa puede estar siendo compensado por otros factores, como la acumulación de otros metabolitos protectores o pequeñas hidrofílicas como Hsp12 (Koshland y Tapia, 2019) que en el caso de especies como *M. pulcherrima* o *M. fructicola* participarían en el mantenimiento de la elevada viabilidad. Esto no implica que en estas especies una mayor acumulación de trehalosa no pudiera potenciar todavía más la capacidad de hacer frente a las condiciones de estrés a las que se ven sometidas durante la propagación de LSA.

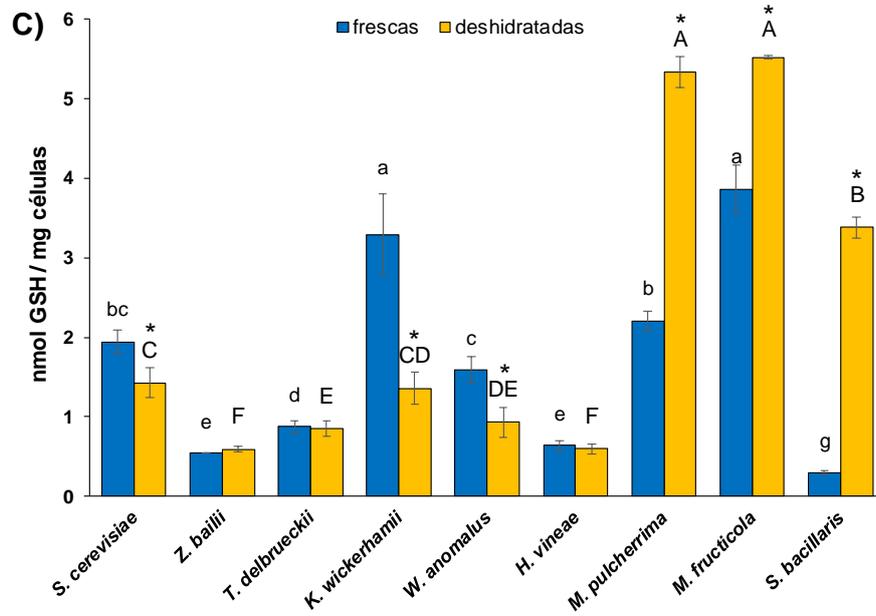
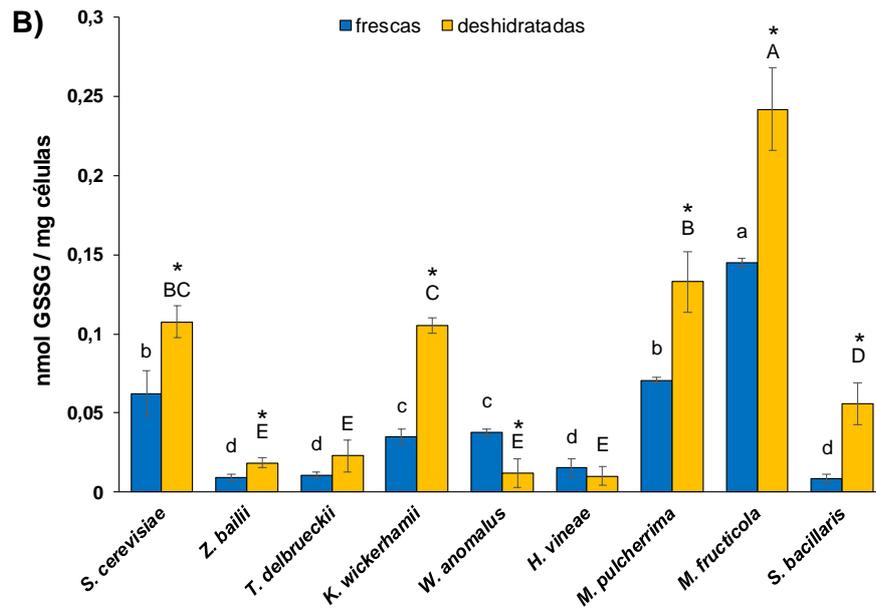


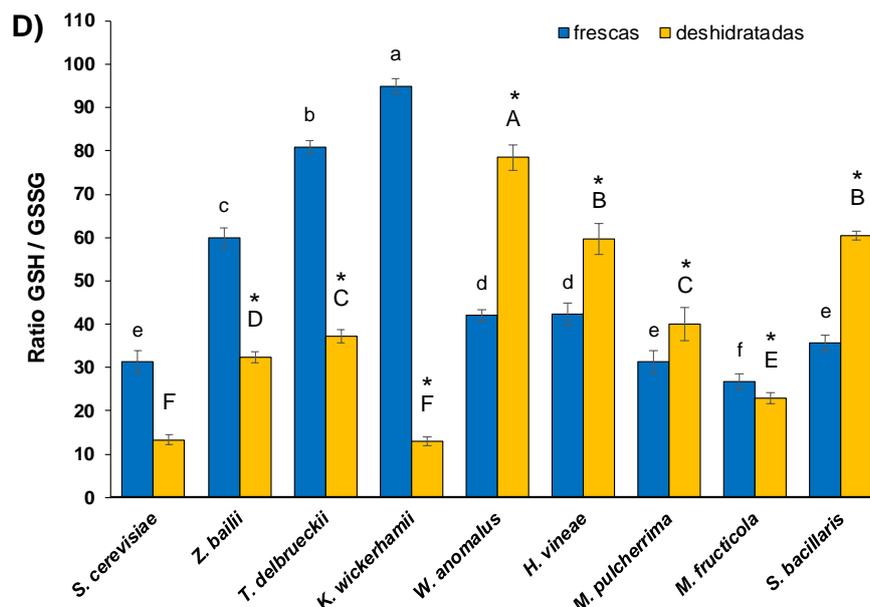
**Figura R.2.5:** Análisis comparativo de la secuencia de la proteína Tps1. **A)** Alineamiento múltiple de Tps1p y **B)** árbol filogenético obtenidos mediante *Clustal Omega*.

### 2.3.2 Niveles de glutatión

El glutatión, como se ha mencionado en la introducción, es un cofactor necesario para la actividad de diversas enzimas implicadas en la protección redox, particularmente en la protección frente a la oxidación de proteínas. Se analizaron los niveles de glutatión total, reducido y oxidado según lo descrito en el apartado 5.2.3 de materiales y métodos. Como se puede observar en la Figura R.2.6.A, los niveles de glutatión total (GSH<sub>TOT</sub>) variaron entre especies y condiciones. En general, la biomasa fresca de las levaduras no-*Saccharomyces* presentó niveles de GSH<sub>TOT</sub> inferiores a los de la cepa control, únicamente *K. wickerhamii* y *M. fructicola* presentaron niveles superiores, mientras que los niveles detectados en *M. pulcherrima* fueron similares a los del control. La deshidratación supuso cambios en los niveles de GSH<sub>TOT</sub> de prácticamente todas las especies. En *S. cerevisiae* se observa un ligero descenso, igual que ocurrió en *K. wickerhamii* y *W. anomalus*. Por el contrario, en *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris* se observó un claro aumento de los niveles de glutatión, mientras que en *Z. bailii*, *T. delbrueckii* y *H. vineae* no se detectó ningún efecto de la deshidratación sobre la acumulación de este metabolito. Esto evidencia estrategias diferentes en lo que respecta a la consecución de los niveles adecuados de glutatión: unas especies optan por una mayor síntesis durante la aplicación del estrés, mientras que otras utilizan mecanismos alternativos que pueden consistir en un control diferente del estado redox del glutatión presente.







**Figura R.2.6:** Niveles de glutatión en células frescas (barras azules) y células deshidratadas (barras amarillas). **A)** Glutatión total. **B)** Glutatión oxidado. **C)** Glutatión reducido. **D)** Relación GSH/GSSG. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies y diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

Además de los niveles de glutatión total, se decidió estudiar los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH), dado que la distribución total entre sus dos formas, oxidada y reducida, es lo realmente importante para el mantenimiento del equilibrio redox celular. Como puede observarse en la Figura R.2.6.B los niveles de GSSG fueron variables entre especies en las dos condiciones estudiadas, siempre proporcionales a los niveles de  $GSH_{TOT}$ . De nuevo, la mayoría de especies acumularon menos GSSG que *S. cerevisiae* en células frescas, salvo *M. fructicola*, que acumuló más GSSG, y *M. pulcherrima* que presentó niveles similares. Destaca el bajo nivel de GSSG detectado en células frescas *K. wickerhamii*, ya que esta especie presentó niveles de  $GSH_{TOT}$  elevados. Los niveles de GSSG aumentaron en la mayoría de las especies como consecuencia de la deshidratación, lo cual está de acuerdo con un mayor estrés oxidativo endógeno en estas condiciones. La única especie en la que se detectaron niveles de GSSG más bajos que en biomasa fresca fue en *W. anomalus*, cabe mencionar que en esta especie los niveles de  $GSH_{TOT}$  también disminuyeron tras la deshidratación, lo cual explicaría esta menor acumulación de GSSG. En *H. vineae* los niveles permanecen básicamente inalterados.

Igual que ocurre con el GSSG, los niveles de GSH reducido en células frescas fueron aproximadamente un reflejo del  $GSH_{TOT}$ . En células frescas, *K. wickerhamii* y *M. fructicola* presentaron niveles superiores a *S. cerevisiae*, mientras que en el resto de especies se detectaron niveles similares (*W. anomalus* y *M. pulcherrima*) o inferiores (el resto) (Figura R.2.6.C). Tras la deshidratación se observó un claro aumento de los niveles de GSH en *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*, totalmente opuesto a la caída observada en células deshidratadas de *S. cerevisiae*, *K. wickerhamii* y *W. anomalus*. En *Z. bailii*, *T. delbrueckii* y *H. vineae* no se detectó ningún efecto de la deshidratación sobre los niveles de GSH.

La relación GSH/GSSG es realmente el parámetro idóneo para determinar el estado redox de las levaduras y nos permite comparar más fácilmente entre especies en las que los niveles totales de glutatión varían significativamente. Como puede observarse en la Figura R.2.6.D, la relación en células frescas es superior a *S. cerevisiae* en *Z. bailii*, *T. delbrueckii* y *K. wickerhamii*, y similar en el resto de especies. En células deshidratadas *S. cerevisiae* y *K. wickerhamii* son las especies que tienen valores más bajos en este parámetro. La relación GSH/GSSG disminuyó tras la deshidratación en la cepa control y en *Z. bailii*, *T. delbrueckii*, *K. wickerhamii* y *M. fructicola*, aunque en esta última la caída fue menor. Una disminución en la relación GSH/GSSG indica un mayor estrés oxidativo endógeno como consecuencia de la deshidratación. En cambio, *W. anomalus*, *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *S. bacillaris* presentaron un aumento de la relación GSH/GSSG tras la deshidratación. Tras la deshidratación se espera que los niveles de GSSG aumenten debido al estrés oxidativo al que se ven sometidas las células, sin embargo, estas son capaces de mantener una relación GSH/GSSG elevada mediante el reciclaje del GSSG a través de su actividad glutatión reductasa o la síntesis de GSH. Se puede observar que aquellas especies en las que la relación aumenta tras la deshidratación son las mismas que presentaron una elevada actividad GR basal, además de una inducción de la misma en células deshidratadas (Figura R.2.3). Mientras que especies con baja actividad o en las que no se observa inducción, la relación GSH/GSSG disminuye tras la deshidratación.

La regulación del metabolismo del glutatión implica una compleja red de señalización que todavía no se comprende por completo. Sin embargo, su papel en la tolerancia a deshidratación se conoce desde hace años (Espindola et al., 2003). Como se ha mencionado, aquellas especies que presentaron mayor viabilidad tras la deshidratación, presentaron niveles elevados de  $GSH_{TOT}$  y relación GSH/GSSG altos. Por otro lado, en especies que presentaron una viabilidad relativamente menor tras la deshidratación, se detectaron valores de relación GSH/GSSG bajos, un indicador de desequilibrios en el

balance redox. Este fue el caso de, por ejemplo, *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, que se asemejan a los presentados por Câmara et al., (2019b). En estas especies, otros factores, como la elevada acumulación de trehalosa, pueden ayudar a mantener una buena viabilidad de la LSA.

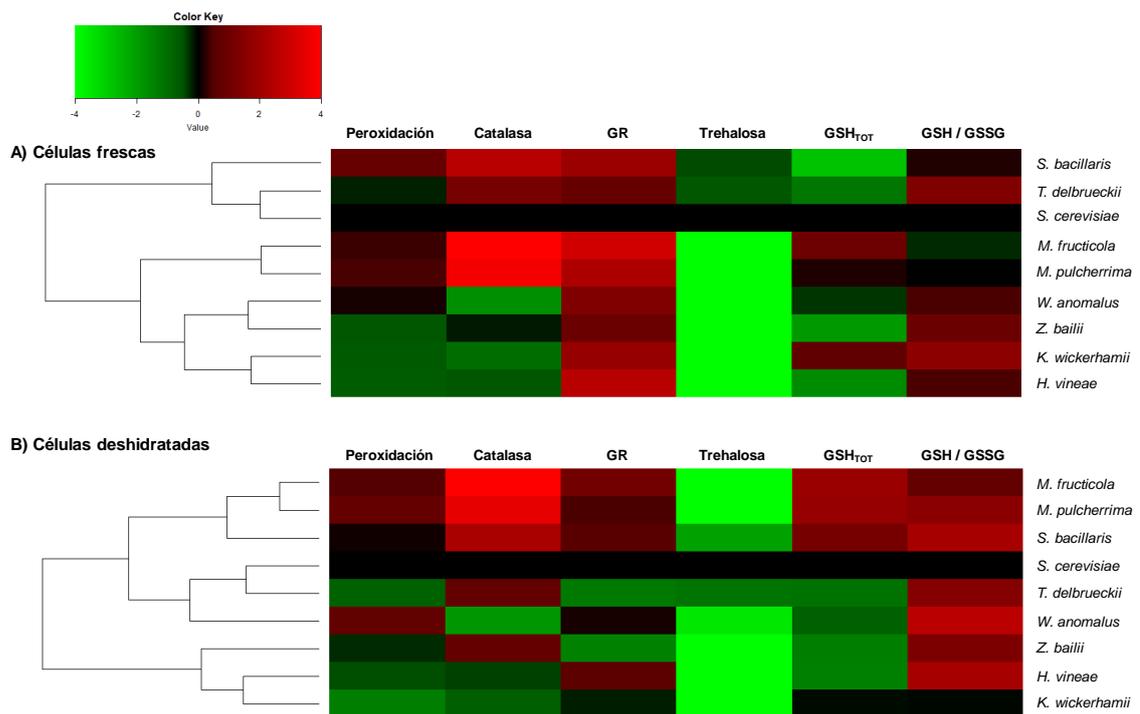
### 2.4 Análisis comparativo de especies no-*Saccharomyces*

Con el fin de obtener una visión más global sobre las similitudes y diferencias entre especies se realizó un análisis comparativo de los parámetros redox anteriormente descritos en todas las especies. Los resultados obtenidos se muestran en forma de mapas de calor (Figura R.2.7), uno por cada condición analizada (células frescas y deshidratadas). Los valores representados son los valores de los diferentes parámetros redox normalizados frente a los obtenidos en *S. cerevisiae*, en escala logarítmica en base 2. Los parámetros cuyo valor es mayor que en el control aparecen representados en rojo, mientras que los que presentan un valor menor que en el control aparecen representados en verde. Las especies se agruparon en base a su distancia euclídea.

Si se analiza el *heatmap* obtenido a partir de los datos de células frescas (Figura R.2.7.A) se puede ver que las especies con un mayor parecido a la cepa comercial son *T. delbrueckii* y *S. bacillaris*. Como se ha descrito en apartados anteriores, las tres especies presentaron comportamientos similares en condiciones de propagación de la biomasa. Por otro lado, como cabía esperar, las dos especies del género *Metschnikowia* aparecen agrupadas juntas, dado su comportamiento prácticamente idéntico. *H. vineae* y *K. wickerhamii* son las especies que tienen un comportamiento más diferenciado respecto de la cepa de referencia, particularmente por el efecto de la actividad catalasa y la diferente peroxidación de lípidos.

El *heatmap* obtenido a partir de los datos de células deshidratadas (Figura R.2.7.B) muestra que especies cuyo comportamiento tecnológico de la LSA fue parecido comparten similitudes en los parámetros de respuesta a estrés oxidativo estudiados. Igual que se observó en células frescas, *T. delbrueckii* fue la especie que presentó mayor similitud a *S. cerevisiae*, como ya se ha mencionado, el comportamiento de la LSA de estas dos especies fue muy similar. Por otro lado, se encontró que aquellas especies que presentaron una elevada viabilidad tras la deshidratación (*M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*) aparecen agrupadas juntas, todas ellas comparten una serie de rasgos, como son una elevada actividad catalasa, elevada actividad GR, altos niveles de glutatión y una relación GSH/GSSG elevado, que parecen ser determinantes para una buena supervivencia al proceso de deshidratación. Del mismo modo, se observó

que especies con un pobre comportamiento tras la deshidratación (*K. wickerhamii* y *H. vineae*) aparecen agrupadas juntas, estas especies comparten una baja actividad catalasa y niveles de glutatión menores o iguales a los del control, además de una menor cantidad de trehalosa, una característica común a prácticamente todas las especies estudiadas. Con todo, estos datos dejan patente la importancia de una óptima respuesta frente a estrés oxidativo a la hora de hacer frente a las condiciones desfavorables a las que las levaduras se ven sometidas durante el proceso de deshidratación.



**Figura R.2.7:** Análisis comparativo de parámetros de defensa frente a estrés oxidativo (columnas) en **A)** células frescas y **B)** células deshidratadas. Se representa el Log<sub>2</sub> de cada parámetro normalizado frente a *S. cerevisiae*. La leyenda de colores indica la variación de valores desde el más bajo (verde) al más alto (rojo). El agrupamiento de las especies se obtuvo mediante distancia euclídea.

## 2.5 Análisis de composición lipídica total

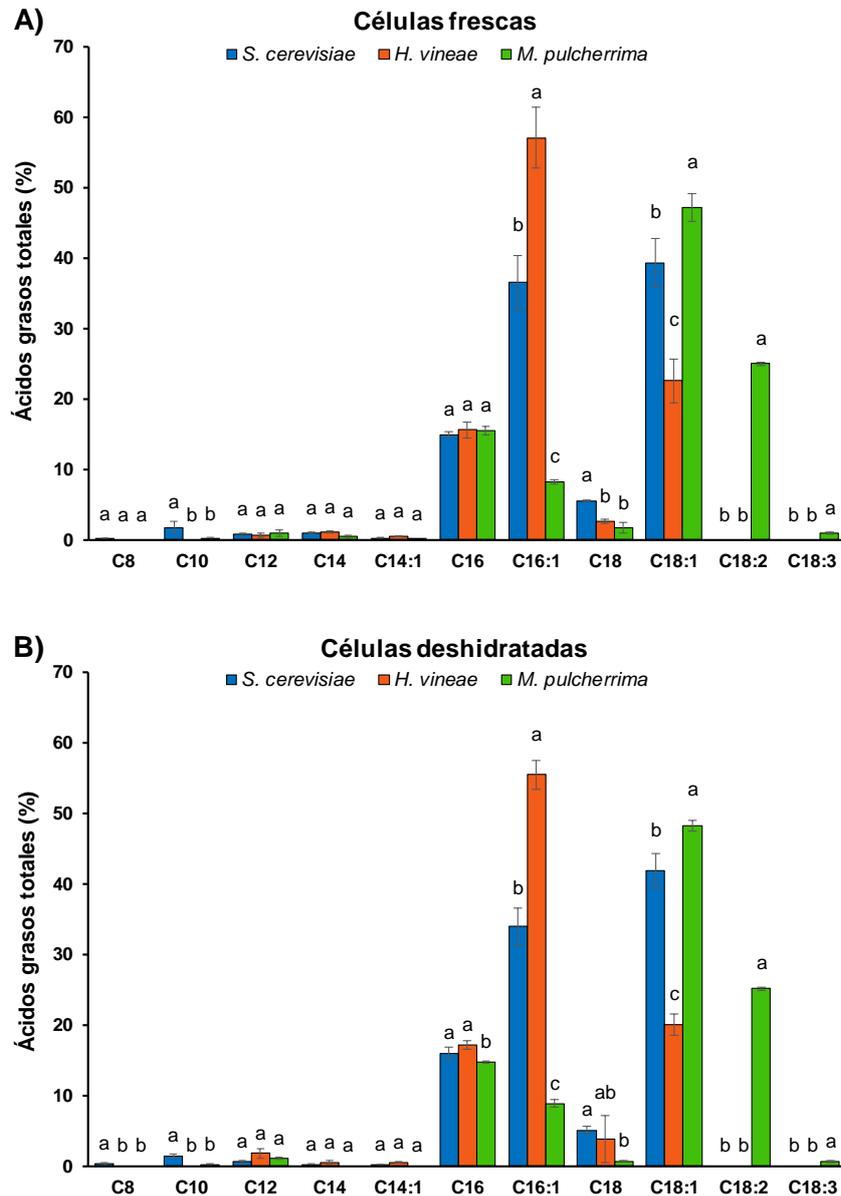
Con el fin de profundizar en la caracterización de los diferentes parámetros bioquímicos con un papel en la protección frente a condiciones de estrés, se decidió realizar un estudio de la composición lipídica total de especies seleccionadas para ver el posible efecto que pudieran tener sus diferencias sobre la eficiencia tecnológica de las levaduras. Para estos ensayos se seleccionaron las especies *H. vineae* y *M. pulcherrima* debido a las diferencias extremas de comportamiento tras la deshidratación, que ya han sido descritas. Además, se mantuvo la cepa comercial Lalvin T73 de *S. cerevisiae* como referencia. Todos los ensayos de análisis de composición lipídica total fueron realizados en colaboración con el Dr. Nicolas Rozès de la Universitat Rovira i Virgili.

### 2.5.1 Determinación de ácidos grasos totales

El contenido de ácidos grasos totales de las tres especies estudiadas se analizó según lo descrito en el apartado 5.3.1 de Materiales y Métodos. En la Figura R.2.8 se recogen los resultados obtenidos.

En primer lugar, cabe mencionar que prácticamente no se detectaron cambios en la proporción de ácidos grasos entre la biomasa fresca (Figura R.2.8.A) y la biomasa deshidratada (Figura R.2.8.B) de ninguna de las especies. Sin embargo, las diferencias en el contenido de ácidos grasos entre especies fueron muy claras. En *S. cerevisiae*, como puede verse en la figura los ácidos grasos insaturados oleico (C18:1) y palmitoleico (C16:1) constituyeron la mayor parte del contenido en ácidos grasos, representando, cada uno de ellos, alrededor del 35 – 40 % del total. El ácido palmítico (C16) y esteárico (C18) fueron los ácidos grasos saturados más abundantes, representando, respectivamente, un 15 y un 5 % del total. También se detectaron porcentajes bajos de otros ácidos grasos (C8, C10, C12, C14 y C14:1). En *H. vineae* el ácido graso predominante fue el ácido palmitoleico (60%), presente en un porcentaje superior al detectado en las otras dos especies analizadas. En esta especie, además, se encontraron niveles de ácido palmítico (15 %) similares a las otras dos especies, pero su contenido en ácido oleico (20 %) fue significativamente inferior que en las otras dos levaduras. Además, también se encontraron pequeños porcentajes de otros ácidos grasos. Por último, en *M. pulcherrima*, al igual que ocurría en *S. cerevisiae*, el ácido graso más abundante fue el ácido oleico, aunque en este caso se encontró en mayor proporción (50 %). Además, *M. pulcherrima* fue la única de las tres especies en la que se detectaron ácidos grasos poliinsaturados. En concreto, el ácido linoleico (C18:2) fue el segundo ácido graso más abundante (25 %) en esta especie, y también se detectó,

pero en un bajo porcentaje, el ácido gamma-linoleico (C18:3). Por otro lado, *M. pulcherrima* presentó valores similares a las otras especies de ácido palmítico y el menor porcentaje de ácido palmitoleico. *M. pulcherrima* es rica en ácidos grasos C18, *H. vineae* en C16, mientras que *S. cerevisiae* es más equilibrada a ese respecto.

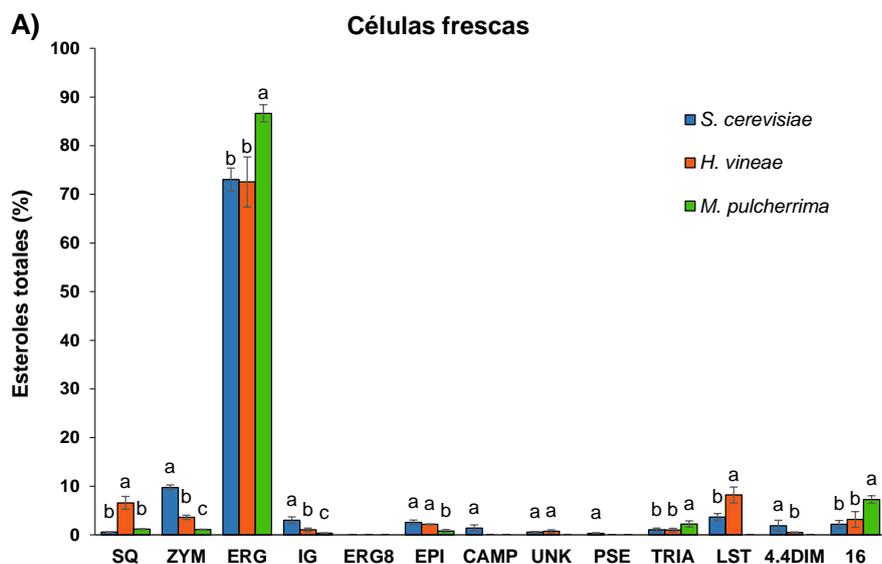


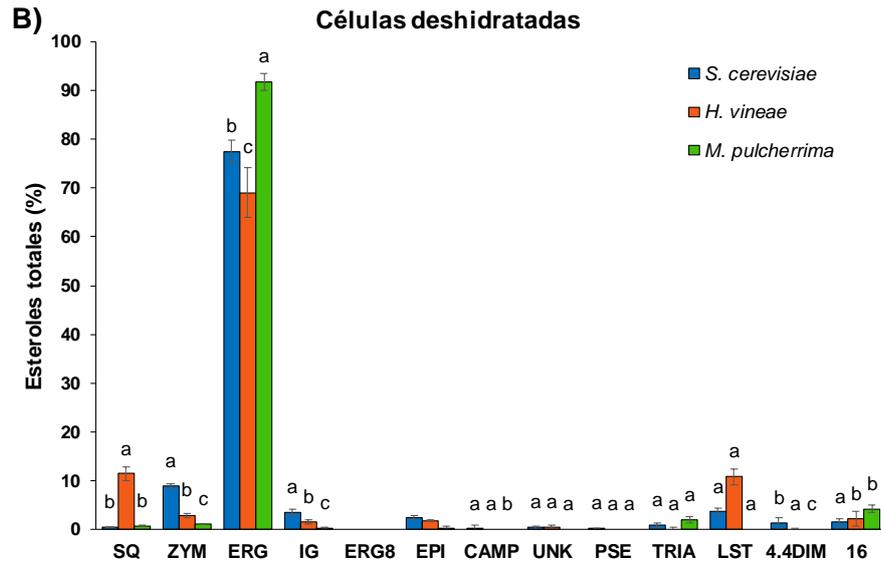
**Figura R.2.8:** Ácidos grasos totales (%) en **A)** células frescas y **B)** células deshidratadas de *S. cerevisiae*, *H. vineae* y *M. pulcherrima*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre especies ( $p < 0.05$ ). **C8:** ácido caprílico, **C10:** ácido cáprico, **C12:** ácido láurico, **C14:** ácido mirístico, **C14:1:** ácido miristoleico, **C16:** ácido palmítico, **C16:1:** ácido palmitoleico, **C18:** ácido esteárico, **C18:1:** ácido oleico, **C18:2:** ácido linoleico, **C18:3:** ácido gamma-linoleico.

### 2.5.2 Determinación de esteroles totales

El contenido de esteroles totales de las tres especies estudiadas se analizó según lo descrito en el apartado 5.3.2 de Materiales y Métodos. En la Figura R.2.9 se recogen los resultados obtenidos.

Del mismo modo que ocurría con los ácidos grasos, no se observaron cambios en los porcentajes de esteroles entre las dos condiciones estudiadas. Sin embargo, sí que se detectaron diferencias significativas entre especies. En los tres casos el esteroles más abundante fue el ergosterol, como cabía esperar, si bien, el porcentaje de ergosterol detectado fue mayor en *M. pulcherrima* (85 %) que en *S. cerevisiae* y *H. vineae* (70 %). Además del ergosterol, en *S. cerevisiae* se encontraron otros esteroles, siendo el segundo más abundante el zimosterol (10 %). En *H. vineae* se encontró relativa abundancia de escualeno (8 %) y de lanosterol (10 %). Por último, en *M. pulcherrima* el único otro esteroles que apareció en un porcentaje importante fue el ergosta-8,22-dienol (8 %).





**Figura R.2.9:** Esteroles totales (%) en **A)** células frescas y **B)** células deshidratadas de *S. cerevisiae*, *H. vineae* y *M. pulcherrima*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre especies ( $p < 0.05$ ). **SQ:** escualeno, **ZYM:** zimosterol, **ERG:** ergosterol, **IG:** ignosterol, **ERG8:** ergost-8-enol, **EPI:** episterol, **CAMP:** campesterol, **PSE:** 24,24-dihidrolanosterol, **TRIA:** ergosta-4,5,22-triene-3-one, **LST:** lanosterol, **4.4DIM:** 4,4-Dimetilcolesta-8,14-dienol, **16:** Ergosta-8,22-dienol.

Como ya se ha mencionado en la Introducción y se ha descrito en apartados anteriores, el estrés oxidativo tiene un efecto directo sobre los lípidos de membrana. Además, la composición de la membrana influye en la capacidad de las células de adaptarse a cambios en las condiciones de crecimiento y a condiciones de estrés. Para ello es especialmente importante la fluidez de membrana, determinada por el grado de insaturación y el contenido en ergosterol. El estudio de la composición lipídica reveló grandes diferencias entre las tres especies analizadas, pero no cambios durante el proceso de deshidratación. Esto parece indicar que durante el proceso de deshidratación no se produce una reordenación del metabolismo lipídico, lo que sugiere que el estado de la membrana al iniciar el proceso puede ser determinante, o que la presencia de lípidos externos puede contribuir al aumento de la viabilidad. El proceso de deshidratación parece ser más breve que el tiempo requerido para renovar la composición lipídica de la membrana, que podría ser un mecanismo adaptativo más a largo plazo, o que dependa de un crecimiento activo de la superficie celular durante la división. Los valores obtenidos en el análisis de composición de ácidos grasos coincidieron con resultados ya publicados para *S. cerevisiae* (Daum et al., 1998) y *M.*

*pulcherrima* (Vázquez et al., 2019). Hasta el momento no existen datos publicados acerca de la composición lipídica de *H. vineae*, pero de acuerdo con Rozès et al., (1992), esta se asemeja mucho a otras especies del género *Hanseniaspora*. De hecho, los porcentajes de ácido palmitoleico (C16:1) y oleico (18:1) son equivalentes a los de *H. uvarum* (CBS 5914). Como se ha mencionado, *M. pulcherrima* fue la única especie en la que se detectaron ácidos grasos poliinsaturados, los cuales confieren fluidez a la membrana y ayudan a la célula a adaptarse rápidamente a condiciones de estrés, esto, sumado a los parámetros de defensa frente estrés antioxidante anteriormente comentados, explicaría el buen comportamiento de esta especie tras la deshidratación. Además, un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados podría explicar la mayor peroxidación lipídica observada en esta especie, ya que membranas ricas en ácidos grasos poliinsaturados son más sensibles a la peroxidación que aquellas con mayor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (Ayala et al., 2014; Howlett y Avery, 1997). *S. cerevisiae* no es capaz de producir ácidos grasos poliinsaturados (Stukey et al., 1990), pero su contenido en ácido oleico es elevado, mucho mayor que el detectado en *H. vineae*, en la que el ácido palmitoleico fue el predominante. El ácido oleico ha sido empleado para mitigar estrés oxidativo en fermentaciones vínicas (Landolfo et al., 2010), mientras que el ácido palmitoleico ha sido relacionado con una mayor rigidez de membrana (Redón et al., 2009), lo cual ayudaría a explicar las diferencias de comportamiento observadas entre estas especies. Cabe destacar que *M. pulcherrima*, bajo las condiciones de cultivo adecuadas, como son pH bajo, estrés por frío o por ayuno, es considerada una levadura oleaginosa, capaz de producir altos porcentajes de lípidos (Santamauro et al., 2014), una cualidad que permite la producción de grandes cantidades de un aceite de composición similar al aceite de palma en cultivos semi-continuos (Abeln y Chuck, 2019). No obstante, las condiciones de cultivo necesarias para la elevada producción de lípidos difieren de las empleadas, lo que explicaría que bajo las condiciones de trabajo el contenido total de ácidos grasos sea similar entre las tres especies.

Los esteroides también son importantes para el mantenimiento de la integridad y la fluidez de la membrana (Daum et al., 1998). El ergosterol, el principal esteroide en levaduras, es necesario frente a condiciones de estrés oxidativo, ya que mutantes incapaces de sintetizarlo son hipersensibles a este estrés (Higgins et al., 2003). De nuevo, *M. pulcherrima* presentó el mayor porcentaje de ergosterol, lo cual, en combinación con su composición en ácidos grasos, hace que esté mejor preparada para hacer frente a los cambios y condiciones de estrés asociados al proceso de propagación de biomasa. *S. cerevisiae* y *H. vineae* presentaron niveles de ergosterol similares, sin

embargo, ya se han comentado las múltiples diferencias detectadas entre ambas, que ayudan a explicar las grandes diferencias de comportamiento tecnológico observadas.

## 2.6 Discusión general

El estrés oxidativo al que se ven sometidas las células durante la propagación de biomasa es uno de los principales causantes de la pérdida de viabilidad y eficiencia tecnológica de la LSA. Por ello se decidió realizar una caracterización de la capacidad de respuesta a estrés de las levaduras no-*Saccharomyces*. Los parámetros seleccionados están basados en el trabajo de Gamero-Sandemtrio et al., (2014), en el que se determinó que la combinación de niveles altos de trehalosa, niveles bajos de GSSG, elevada actividad catalasa basal e inducción de la actividad catalasa y glutatión reductasa después de la deshidratación correlacionaban con bajos niveles de daño macromolecular y una mejor eficiencia tecnológica en *S. cerevisiae*. En vista de las diferencias observadas entre las especies estudiadas, se puede especular que la respuesta a estrés oxidativo en levaduras no-*Saccharomyces* puede no ser equivalente a la de *S. cerevisiae*. Por tanto, el comportamiento descrito como idóneo en cepas de *S. cerevisiae* no tiene que reproducirse necesariamente en levaduras no convencionales con un buen comportamiento en condiciones de producción de LSA. Los resultados presentados en este apartado prueban la complejidad de la respuesta a estrés oxidativo y de la tolerancia a la deshidratación

Las grandes diferencias entre especies quedan patentes si se analizan, por ejemplo, la actividad catalasa o la acumulación de trehalosa. Las tres especies que presentaron mayor viabilidad de la LSA (*M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*) presentaron niveles de actividad catalasa diez veces superiores a los del resto de especies, incluida la *S. cerevisiae* comercial. Cabría esperar, por tanto, que estos elevados niveles de actividad catalasa estén directamente relacionados con la elevada viabilidad observada en estas especies, además de con su correcto crecimiento en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, descrito anteriormente en este trabajo y reportado por Barbosa et al. (2018). Por otra parte, se observó que en las condiciones ensayadas la mayoría de especies no-*Saccharomyces* no acumularon trehalosa (*K. wickerhamii* y *H. vineae*) o lo hicieron a niveles muy bajos (*Z. bailii*, *W. anomalus*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*). Únicamente *T. delbrueckii* y *S. bacillaris* presentaron niveles semejantes a los de *S. cerevisiae*. Este disacárido tiene un papel clave en la supervivencia al proceso de deshidratación (Dupont et al., 2014; Koshland y Tapia, 2019; Rapoport et al., 2019) y su ausencia ayudaría a explicar el pobre comportamiento de especies como *K. wickerhamii* y *H. vineae* en estas

condiciones. Es significativo que las dos especies del género *Metschnikowia* prácticamente no acumulen trehalosa, teniendo en cuenta su elevada viabilidad. No obstante, hay que tener en cuenta que las especies que presentaron una menor acumulación de trehalosa son aquellas en las que en el tiempo de cultivo ensayado no habían consumido por completo la sacarosa, por lo que es probable que no se den las condiciones fisiológicas y metabólicas necesarias para su acumulación, dado que la acumulación de trehalosa se produce en condiciones de limitación de fuente de carbono y como respuesta a condiciones leves de estrés (Eleutherio et al., 2015). Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la búsqueda de secuencias homólogas a los genes del metabolismo de la trehalosa de *S. cerevisiae* reveló que prácticamente todas las especies parecen disponer de la maquinaria celular necesaria para su síntesis. Es especialmente significativo el caso del gen *TPS1*, para el que se han encontrado secuencias altamente conservadas con una elevada homología de secuencia con *S. cerevisiae*, que podría ser debido al papel regulador de la trehalosa-6-fosfato, sintetizada por Tps1p, sobre el flujo glicolítico. En aquellas especies en las que se produce una acumulación de trehalosa deficiente en respuesta a la deshidratación, su efecto podría estar siendo compensado por otros factores. Por otro lado, se ha podido observar que aquellas especies con un mejor comportamiento tecnológico presentaron niveles de glutatión total superiores a los detectados en la cepa comercial. Además, estos niveles de glutatión fueron acompañados de una relación GSH/GSSG elevada, explicada a su vez por la elevada actividad glutatión reductasa detectada en estas especies.

A pesar de la dificultad de trazar un patrón de respuesta común entre especies, se han encontrado una serie de parámetros que parecen ir asociados a un mejor comportamiento tecnológico de la LSA. Así, se puede concluir que, las especies no-*Saccharomyces* con una buena viabilidad comparten: una elevada actividad catalasa y glutatión reductasa, niveles elevados de glutatión y una relación GSH/GSSG elevada. Además de los parámetros estudiados, otros múltiples factores afectan a la capacidad de las células de adaptarse al proceso de propagación industrial. Profundizar en la caracterización de los mismos es de vital importancia para entender la capacidad de las distintas especies para hacer frente a las condiciones adversas a las que se ven sometidas durante la propagación y desecación de la biomasa.

Uno de estos factores es la composición de la membrana lipídica. Para el estudio de la composición lipídica se seleccionaron las especies *H. vineae* y *M. pulcherrima* en base a las diferencias de comportamiento de la LSA. Como cabía esperar, existen notables diferencias en la composición lipídica entre especies. Por un lado, la membrana

de *M. pulcherrima* resultó ser rica en ácidos grasos mono y poliinsaturados, que confieren fluidez a la membrana y permiten que la célula se adapte a condiciones de estrés. Por otro lado, en *S. cerevisiae* y *H. vineae* no se detectaron poliinsaturaciones, pero el porcentaje de ácido oleico fue mayor en *S. cerevisiae* que en *H. vineae*. A las diferencias en el contenido en ácidos grasos se suma un mayor contenido de ergosterol en *M. pulcherrima* respecto al de las otras dos especies. Con todo, el estudio del contenido total de ácidos grasos y esteroides nos indica que *M. pulcherrima* posee una membrana altamente fluida, mientras que la de *H. vineae* sería más rígida. Estas diferencias ayudarían a explicar las diferencias de comportamiento entre ambas especies.

### **3. Efecto de la adición de aceites vegetales al medio de cultivo en la eficiencia tecnológica de levaduras no-*Saccharomyces***

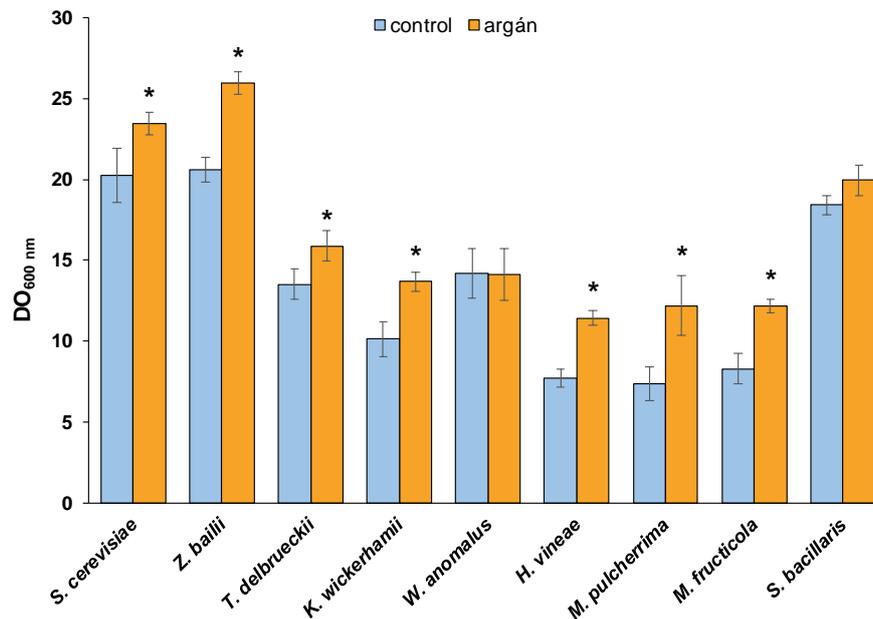
Los resultados presentados hasta el momento han dejado patente la importancia de la capacidad de respuesta a estrés oxidativo durante el proceso de propagación de biomasa. Se ha observado que las especies con una mejor capacidad de repuesta a estrés presentan un mejor comportamiento durante la deshidratación, resultando en una LSA provista de una mejor eficiencia tecnológica. Por tanto, la adición de compuestos químicos antioxidantes durante el crecimiento podría ser una buena alternativa para mejorar el comportamiento de aquellas especies con un peor desempeño tecnológico. Existen numerosas referencias sobre el efecto del crecimiento de *S. cerevisiae* en presencia de diferentes compuestos químicos puros antioxidantes, que en general resulta en una disminución del estrés oxidativo endógeno (Foued Amari et al., 2008; Landolfo et al., 2010; Wang et al., 2018)

Debido a los posibles problemas derivados del uso de compuestos químicos puros en el campo de la alimentación, en trabajos anteriores de nuestro laboratorio se seleccionó el aceite de argán como compuesto antioxidante de grado alimentario candidato para mejorar el comportamiento tecnológico de cepas de *S. cerevisiae*. Como se ha comentado en la Introducción, el aceite de argán se caracteriza por ser rico en compuestos antioxidantes. Posee, por ejemplo, un elevado contenido en ácido oleico, además de otros componentes minoritarios como fenoles (ácido cafeico y ferúlico), tocoferoles ( $\gamma$ -tocoferol) y carotenoides (Cabrera-Vique et al., 2012; El Abbassi et al., 2014). El cultivo de diferentes cepas de *S. cerevisiae* en presencia de aceite de argán resultó en una mejora de su crecimiento y de su capacidad fermentativa, así como en la mejora de los parámetros de defensa antioxidantes descritos anteriormente (Gamero-Sandemetro et al., 2019, 2015), demostrando así el carácter antioxidante de este aceite. En base a dichas observaciones decidimos incorporar el tratamiento con aceite de argán al crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* y analizar su efecto sobre la eficiencia tecnológica de la LSA obtenida, así como sobre los parámetros de defensa frente a estrés oxidativo. Además, decidimos extender el análisis a otros aceites vegetales de grado alimentario, como son el aceite de oliva, de girasol, de maíz y de sésamo, cuya composición y capacidad antioxidante difiere de la del aceite de argán (Cabrera-Vique et al., 2012; Pellegrini et al., 2003), pero que podrían ser alternativas interesantes debido a su menor coste económico y a su alta disponibilidad.

### 3.1 Efecto del tratamiento con aceite de argán sobre el crecimiento y la viabilidad de levaduras no-*Saccharomyces*

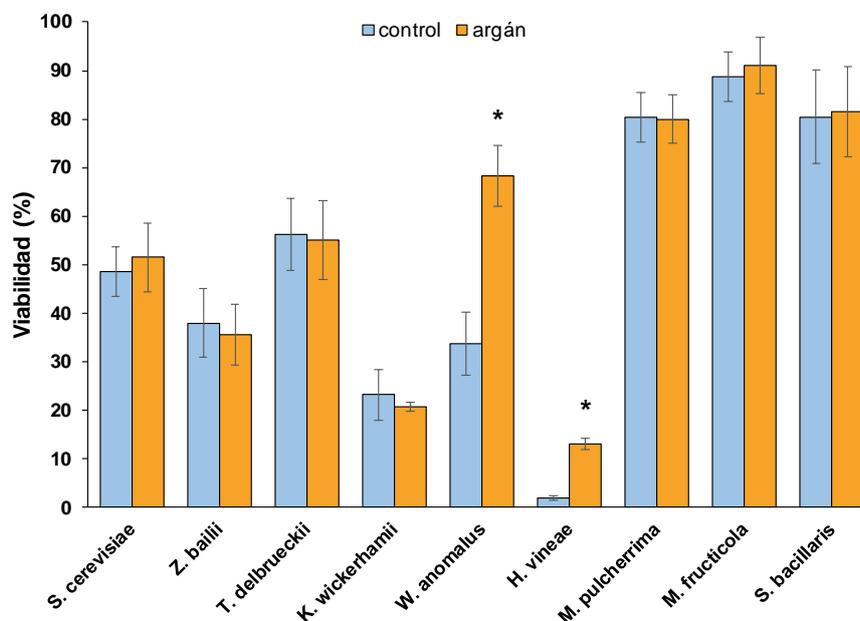
En primer lugar, se determinó el efecto del tratamiento con aceite de argán sobre el crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces*. Tal y como se menciona en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos, en base a lo expuesto por el fabricante (Natur Green, España) y la bibliografía (Cabrera-Vique et al., 2012) éste se añadió a una concentración de 12.7  $\mu\text{L/mL}$ , para conseguir una concentración final de 6 mg/mL de ácido oleico en la melaza (Gamero-Sandemetro et al., 2015).

Como puede observarse en la Figura R.3.1 la presencia de aceite de argán resultó en un mayor crecimiento de *S. cerevisiae*, como era de esperar en base a los trabajos anteriormente mencionados. El aceite de argán también tuvo un efecto beneficioso sobre el crecimiento de *Z. bailii*, *T. delbrueckii*, *K. wickerhamii*, *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*, pero no se observó ningún efecto sobre el crecimiento de *W. anomalus* ni de *S. bacillaris*.



**Figura R.3.1:** Crecimiento del cultivo (DO<sub>600</sub>) en melaza control (barras azules) y melaza suplementada con aceite de argán (barras naranjas) tras 24 h a 30 °C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco (\*) ( $p < 0.05$ ).

Una vez determinado el efecto del aceite de argán sobre el crecimiento de las levaduras se decidió estudiar su efecto sobre la viabilidad de la biomasa así obtenida. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura R.3.2. Para la mayoría de especies analizadas, el aceite de argán no presentó ningún efecto sobre la viabilidad celular, únicamente se observó un aumento de la viabilidad en *W. anomalus* y *H. vineae*. En el caso de *W. anomalus* la viabilidad aumentó notablemente, hasta aproximadamente un 70 % de células viables, un valor que es prácticamente el doble del observado en células sin tratar y superior al de la cepa comercial de *S. cerevisiae*. Por otro lado, a pesar del considerable aumento de la viabilidad observado en *H. vineae*, que pasó del 1.83 ( $\pm$  0.51) % al 13.11 ( $\pm$  1.14) % de células viables, la viabilidad de esta especie, de claro interés enológico, siguió siendo la más baja de todas las especies analizadas.



**Figura R.3.2:** Porcentaje de células viables recuperadas tras el proceso de deshidratación en condiciones control (barras azules) y en presencia de aceite de argán (barras naranjas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco (\*) ( $p < 0.05$ ).

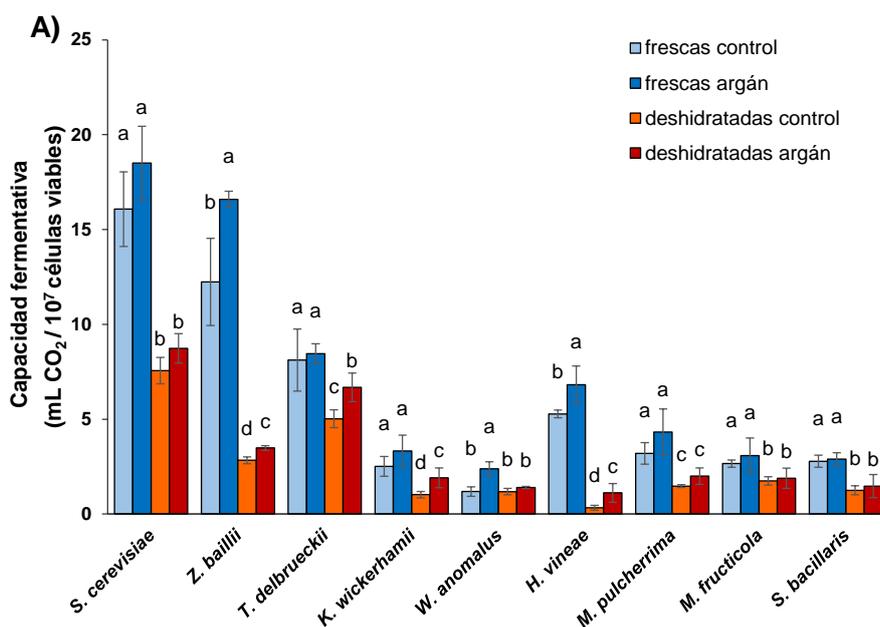
### 3.2 Análisis de la capacidad fermentativa de la biomasa cultivada en presencia de aceite de argán

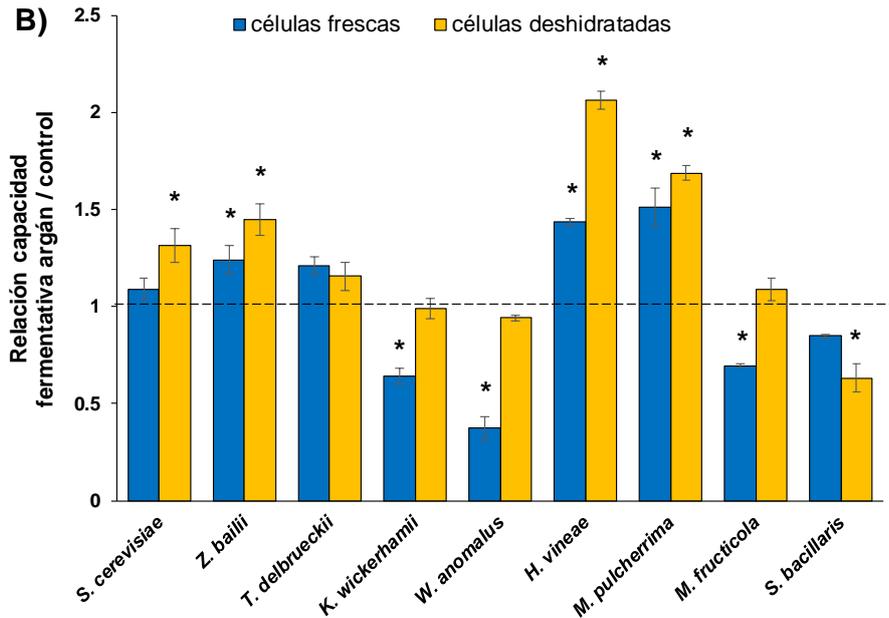
Se analizó la capacidad fermentativa en mosto sintético (MS300) de la biomasa fresca y deshidratada de las distintas especies cultivadas en presencia de aceite de argán. Debido a la heterogeneidad de los valores de capacidad fermentativa detectados entre especies y para facilitar la interpretación del efecto del tratamiento con aceite de argán, además de los valores totales de capacidad fermentativa (Figura R.3.3.A) se presenta la relación entre la capacidad fermentativa detectada en células cultivadas en presencia de aceite de argán frente a la detectada en condiciones control (capacidad fermentativa argán / capacidad fermentativa control) tanto en células frescas como deshidratadas (Figura R.3.3.B). Por tanto, valores por encima de 1 implican un aumento de la capacidad fermentativa en presencia de aceite de argán y valores por debajo de 1 una disminución de la misma.

En la Figura R.3.3.A se recogen los valores totales de capacidad fermentativa obtenidos. Tal y como se comentó en el Apartado 1.5, existen grandes diferencias en la capacidad fermentativa entre especies, y ninguna fue tan buena fermentadora como la cepa comercial de *S. cerevisiae* empleada. Por lo general, el comportamiento de las células cultivadas en presencia de aceite de argán se ajusta a lo anteriormente descrito tanto en células frescas como deshidratadas, con algunas diferencias. Aunque tal y como se describió en el Apartado 1.5 se pueden diferenciar dos grupos caracterizados por su elevada o baja capacidad fermentativa.

En lo que se refiere al efecto del cultivo en presencia de aceite de argán, la Figura R.3.3.B permite ver con mayor facilidad su efecto sobre la capacidad fermentativa de las distintas especies. En primer lugar, en *S. cerevisiae*, el cultivo con aceite de argán ejerce un efecto beneficioso sobre el mantenimiento de una buena capacidad fermentativa en las células recuperadas tras la deshidratación, mientras que no se observan diferencias en la producción de CO<sub>2</sub> en células frescas con o sin aceite de argán (Figura R.3.3.A). Y, como cabe esperar en base a esta observación, la capacidad fermentativa de las células deshidratadas tratadas con aceite de argán fue mayor que en las células cultivadas en condiciones control (Figura R.3.3.B) una observación que concuerda con lo descrito en el trabajo de Gamero-Sandemtrio et al. (2015). En cuanto a las especies no-*Saccharomyces*, el efecto del aceite de argán sobre la capacidad fermentativa fue variable entre especies. Entre las especies con una elevada capacidad fermentativa de base, se encontró un aumento estadísticamente significativo de la producción de CO<sub>2</sub> en células frescas y deshidratadas cultivadas en presencia de aceite

de argán de las especies *Z. bailii* y *H. vineae* (Figura R.3.3.B). En *T. delbrueckii* no se observaron variaciones estadísticamente significativas en ninguna de las dos condiciones tras el tratamiento con aceite de argán. En el caso de *Z. bailii*, en células tratadas con aceite de argán, la deshidratación supuso una pérdida de capacidad fermentativa, tal y como ocurre en condiciones control (Figura R.3.3.A). Por el contrario, en *H. vineae* el tratamiento con aceite de argán permite a las células deshidratadas mantener una elevada capacidad fermentativa, a diferencia de lo que ocurre en condiciones control, en las que se observa una pérdida de la misma tras la deshidratación, esta mejora estaría de acuerdo con una reducción del daño oxidativo derivada del cultivo en presencia de aceite, lo que confiere a las células obtenidas al final del proceso de propagación una mayor vitalidad. En este caso, parece clara la correlación existente entre el aumento de la viabilidad y del crecimiento observados en esta especie y la mayor capacidad fermentativa de la LSA como consecuencia del crecimiento en presencia de aceite de argán. Parece claro que en aquellas especies que presentaron una elevada capacidad fermentativa de partida el cultivo en presencia de aceite de argán ejerce un positivo efecto sobre la misma, probablemente derivado del efecto protector del aceite. En *S. cerevisiae*, se ha descrito que el daño oxidativo afecta específicamente a la actividad de enzimas glicolíticas, que resultan inactivadas por carbonilación (Gómez-Pastor et al., 2012). Una reducción del daño en estas enzimas podría implicar un aumento de los flujos glicolíticos, que favorecería un aumento de la capacidad fermentativa en aquellas especies cuyo metabolismo es preferentemente fermentativo.





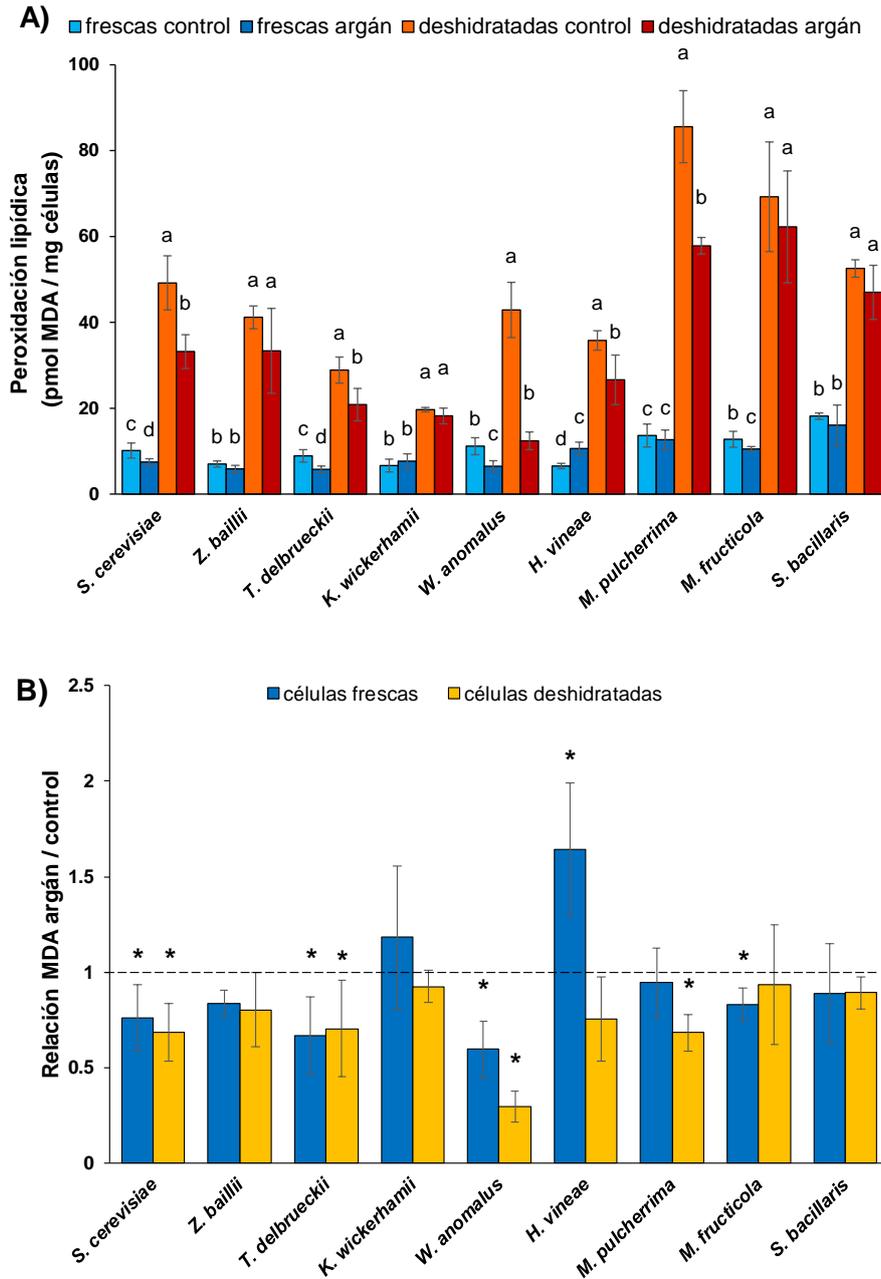
**Figura R.3.3:** Análisis del efecto del aceite de argán sobre la capacidad fermentativa de células frescas y deshidratadas. **A)** Capacidad fermentativa (mL CO<sub>2</sub> / 1x10<sup>7</sup> células viables) tras 6 horas en MS300. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ). **B)** Relación capacidad fermentativa argán / capacidad fermentativa control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con la condición control.

Por otro lado, en las especies no-*Saccharomyces* que presentaron baja capacidad fermentativa (*K. wickerhamii*, *W. anomalus*, *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*) el aceite de argán tuvo, en general, un efecto positivo. En células frescas de estas especies la presencia de aceite de argán resultó en una disminución de la capacidad fermentativa, salvo en el caso de *M. pulcherrima*, en la que, en presencia de aceite de argán la capacidad fermentativa fue mayor en células frescas, además de serlo en células deshidratadas. En células deshidratadas se observó una ligera disminución de la capacidad fermentativa en *S. bacillaris*, mientras que las otras tres especies no presentaron variaciones estadísticamente significativas (Figura R.3.3). En estas especies, en las que el metabolismo en estas condiciones parece ser respiratorio o mixto fermentativo-respiratorio, es posible que el efecto protector del aceite de argán también favorezca un mayor flujo glicolítico que en este caso, aumentaría la respiración y explicaría la ligera disminución de la capacidad fermentativa observada. En el caso de *M. pulcherrima*, en la que se observa el efecto opuesto, quizás otros factores, como la disponibilidad de oxígeno, se conviertan en limitantes y se desvíe parte de los azúcares para su metabolismo por vía fermentativa.

### 3.3 Determinación del daño oxidativo sobre los lípidos en células cultivadas en presencia de aceite de argán

Debido al efecto beneficioso del aceite de argán sobre ciertos parámetros fisiológicos estudiados, procedimos a estudiar el efecto de este compuesto sobre los biomarcadores de estrés oxidativo descritos en apartados anteriores, para determinar si la mejora de comportamiento tecnológico observada estuvo asociada a una mejora en los parámetros de respuesta a estrés oxidativo, como se había descrito previamente para cepas vínicas de *S. cerevisiae*.

En primer lugar, se abordó la cuantificación de la peroxidación lipídica de células frescas y deshidratadas cultivadas en presencia de aceite de argán. En biomasa fresca tratada con aceite de argán prácticamente no se observaron diferencias en los niveles de MDA entre especies, como ocurría en condiciones control, aunque se reduce de manera significativa en *T. delbrueckii*, *W. anomalus* y *M. fructicola*. Sorprendentemente, el nivel de peroxidación lipídica aumenta en células frescas de *H. vineae*. Como era previsible en base a lo observado en condiciones control, los niveles de MDA aumentaron como consecuencia de la deshidratación en células cultivadas en presencia de aceite de argán (Figura R.3.4.A). De nuevo, las diferencias entre especies observadas en condiciones control se mantuvieron en las células deshidratadas con aceite de argán, siendo *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris* las especies que presentaron los niveles de MDA más elevados. En estas condiciones *H. vineae* sí que ve disminuidos sus niveles de peroxidación por el aceite de argán, como ocurre para *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *H. vineae* y *M. pulcherrima*.



**Figura R.3.4:** Análisis del efecto del aceite de argán sobre los niveles de MDA en células frescas y deshidratadas. **A)** Niveles de peroxidación (pmol de MDA / mg de células). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ). **B)** Relación MDA argán / MDA control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con la condición control.

Estos resultados se observan más fácilmente al representar los valores relativos (Figura R.3.4.B). El cultivo en presencia de aceite de argán, en general, resultó en una disminución de los niveles de MDA tanto en células frescas como deshidratadas. Esta disminución del daño oxidativo podría estar asociada a la mejora de los parámetros tecnológicos descritos anteriormente. *W. anomalus* fue la especie en la que la caída de los niveles de MDA fue más pronunciada, aunque el crecimiento de *W. anomalus* no varió en presencia de aceite, fue una de las especies en las que se observó un mayor incremento de la viabilidad de la LSA en presencia de aceite, lo cual podría ser explicado por la disminución del daño oxidativo observado. El único caso en el que se detectó un aumento significativo de la peroxidación lipídica fue en células frescas de *H. vineae*, si bien el valor total siguió siendo bajo y no pareció tener un efecto perjudicial sobre el crecimiento o la viabilidad de esta especie.

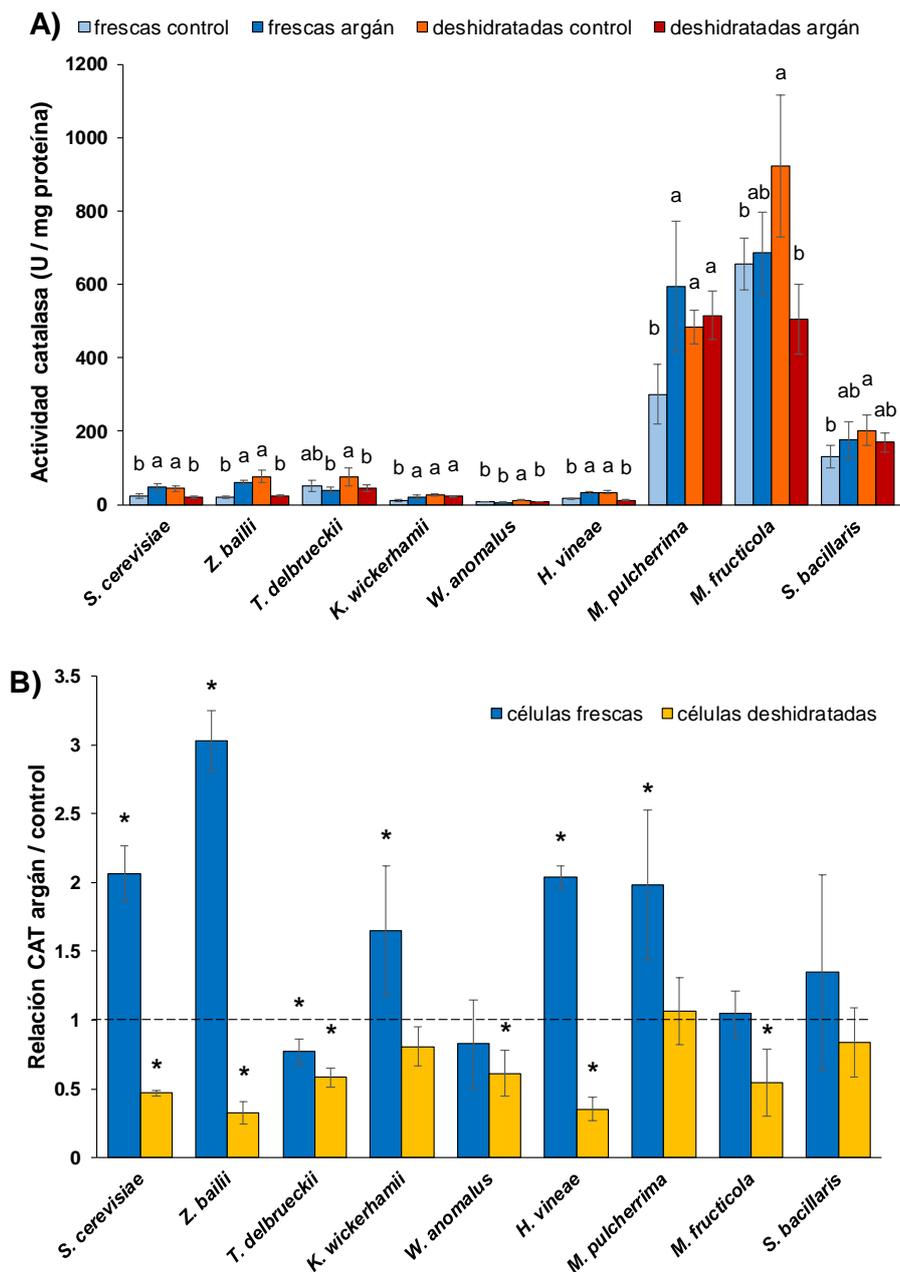
### **3.4 Determinación de actividades enzimáticas de defensa antioxidante en células cultivadas en presencia de aceite de argán**

#### **3.4.1 Actividad catalasa**

Se analizó el efecto del aceite de argán sobre la actividad catalasa de las levaduras de interés. En células cultivadas con aceite de argán se mantuvieron las grandes diferencias en los valores totales de actividad detectados en condiciones control, siendo la actividad de *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris* un orden de magnitud superior al resto (Figura R.3.5.A). Como se puede apreciar en la Figura R.3.5.B, el aceite de argán moduló la actividad catalasa en todas las especies. Se observó un incremento de la actividad catalasa en las células frescas de *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *K. wickerhamii*, *H. vineae* y *M. pulcherrima*, por otro lado, en *T. delbrueckii* se observó un ligero descenso de la actividad. No se observó ningún efecto estadísticamente significativo sobre la actividad de *W. anomalus*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*. En células deshidratadas, en general, la presencia de aceite de argán resultó en niveles de actividad catalasa menores que en condiciones control, como en el caso de *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *H. vineae* y *M. fructicola*. En el resto de especies no se observaron diferencias estadísticamente significativas, no produciéndose en ningún caso un aumento. Esto, sumado a la inducción observada en células frescas, hizo que el valor total de actividad de las células deshidratadas con argán fuera, en la mayoría de los casos, inferior a la actividad de las células frescas, un comportamiento totalmente opuesto al observado cuando las levaduras se cultivaron en condiciones control, en las

que la actividad de las células deshidratadas fue superior a la de las células frescas, como se ha comentado anteriormente (Apartado 2.2.1).

La inducción de la actividad catalasa observada en la biomasa fresca tratada con aceite de argán está probablemente relacionada con las mejoras de comportamiento tecnológico observadas, ya que niveles altos de actividad catalasa en células frescas caracterizan a levaduras con un buen comportamiento en la producción de LSA (ver Apartado 2.2.1). Es posible que las levaduras tomen los ácidos grasos (principalmente oleico) del aceite para usarlos como fuente de energía una vez consumida la sacarosa. El paso inicial de la degradación de ácidos grasos en el peroxisoma es la oxidación del acil-CoA a trans-2-enoil-CoA, cuyo subproducto tóxico es el peróxido de hidrógeno, degradado por la catalasa peroxisomal Cta1p (Klug y Daum, 2014). Esto podría explicar el aumento de los niveles de actividad enzimática en células cultivadas en presencia de aceite de argán. Por otro lado, el descenso de actividad catalasa observado en la biomasa deshidratada, tanto en las especies no-*Saccharomyces* como en la cepa comercial de *S. cerevisiae*, se ajusta a lo descrito para distintas cepas de esta especie (Gamero-Sandemetro et al., 2015). Esta disminución de la actividad podría ser una consecuencia del menor daño oxidativo que sufren las células en presencia de aceite de argán, haciendo innecesaria la inducción de la actividad catalasa tras la deshidratación, como sí que ocurre en condiciones control.



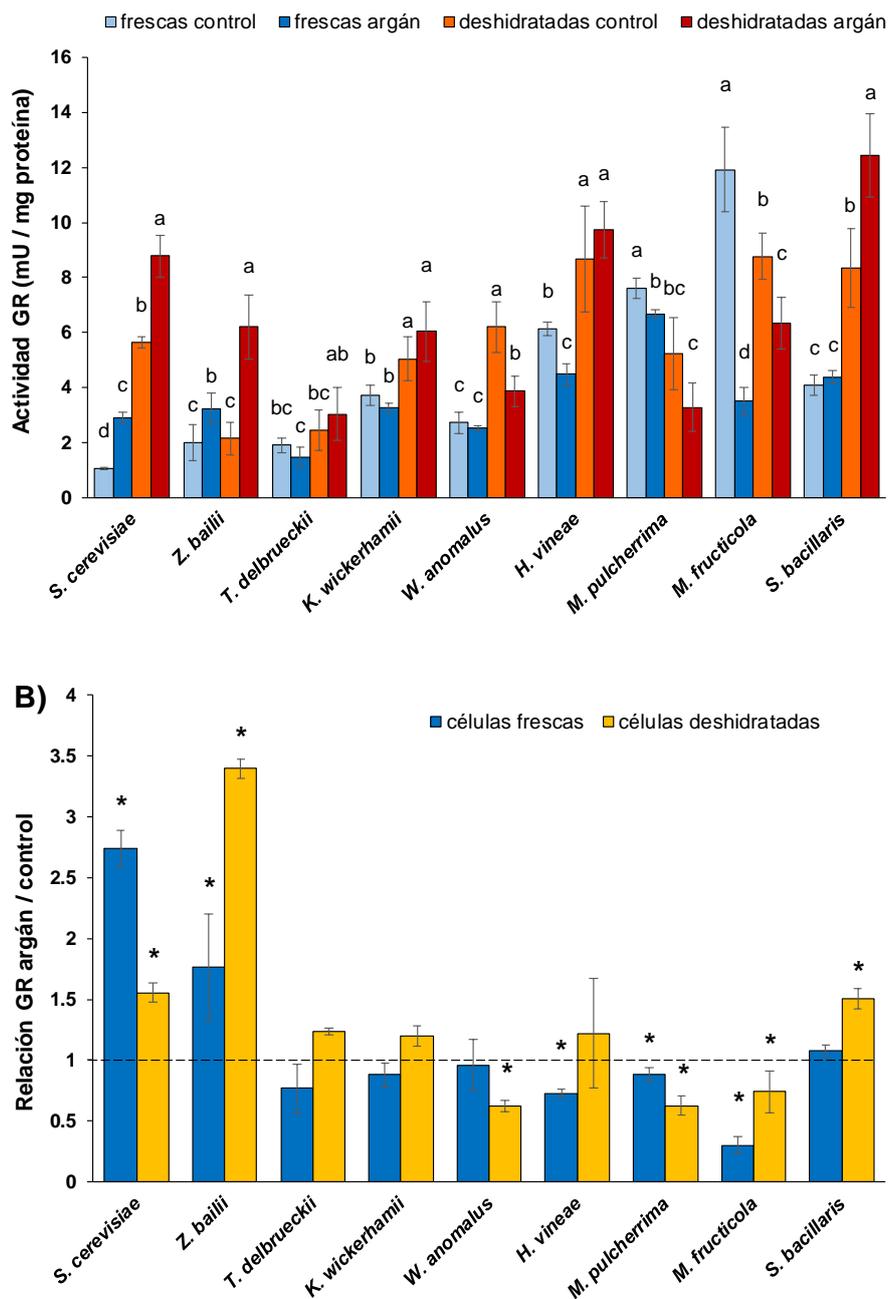
**Figura R.3.5:** Análisis del efecto del aceite de argán sobre la actividad catalasa en células frescas y deshidratadas. **A)** Niveles de actividad catalasa (U / mg de células). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ). **B)** Relación CAT argán / CAT control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con la condición control.

### 3.4.2 Actividad glutatión reductasa

Se analizó el efecto del aceite de argán sobre la actividad glutatión reductasa (GR) de las levaduras seleccionadas. Igual que se observó en condiciones control, la actividad GR fue muy variable entre las distintas especies (Figura R.3.6.A). En células frescas cultivadas con aceite de argán, *H. vineae*, *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris* presentaron una actividad GR superior a la de la cepa control, pero debido al aumento observado en ésta como consecuencia del cultivo con aceite de argán, el resto de especies presentaron niveles de actividad similares (*Z. bailii*, *K. wickerhamii*, *W. anomalous*) o inferiores (*T. delbrueckii*). En células deshidratadas, la actividad de *S. cerevisiae* fue superior a la de la mayoría de especies, salvo la de *H. vineae* (similar) y la de *S. bacillaris* (superior a la del control).

Al contrario de lo que ocurría en los parámetros redox presentados hasta el momento, no se observó una respuesta común a la presencia de aceite de argán en la actividad GR de las distintas especies estudiadas. Mientras que en *S. cerevisiae* y *Z. bailii* se observó un claro aumento de la actividad GR tanto en células frescas como deshidratadas en presencia de aceite de argán (Figura R.3.6.B), en *T. delbrueckii*, *K. wickerhamii*, *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola* se observó un descenso de la actividad GR en células frescas con aceite, mientras que en células deshidratadas la actividad aumentó (*T. delbrueckii*, *K. wickerhamii* y *S. bacillaris*) o disminuyó (*W. anomalous*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*) en función de la especie. Cabe destacar que las especies del género *Metschnikowia* fueron las únicas en las que la actividad GR bajó en las dos condiciones, aunque los valores absolutos fueron diferentes entre ellas.

## Resultados y Discusión



**Figura R.3.6:** Análisis del efecto del aceite de argán sobre la actividad glutatión reductasa en células frescas y deshidratadas. **A)** Niveles de actividad glutatión reductasa (mU / mg de células). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ). **B)** Relación GR argán / GR control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con la condición control.

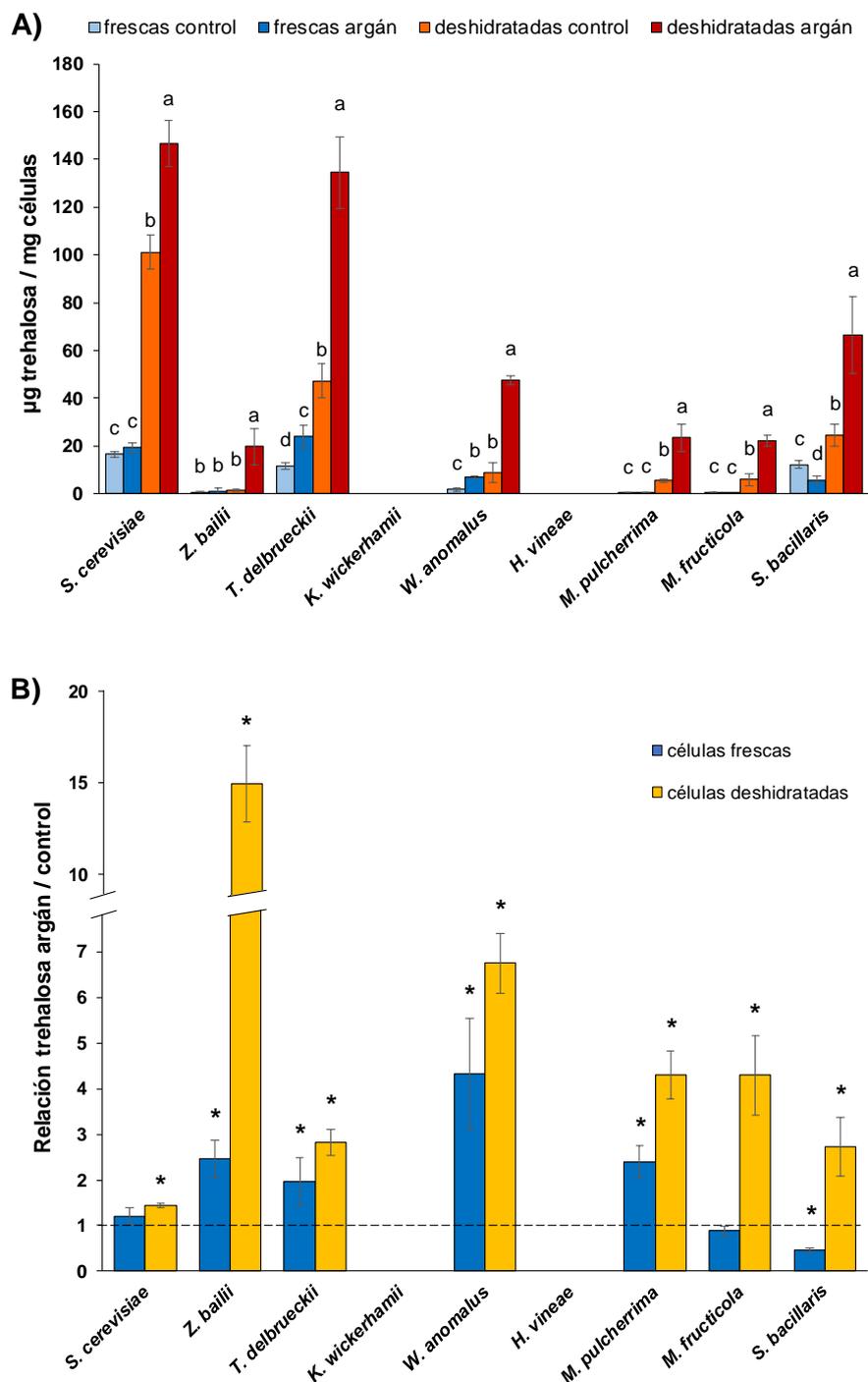
### 3.5 Determinación de moléculas protectoras frente a estrés en células cultivadas en presencia de aceite de argán

#### 3.5.1 Niveles de trehalosa

El análisis de los niveles de trehalosa reveló el efecto positivo del aceite de argán sobre la acumulación de este metabolito. De nuevo, no se consiguió detectar trehalosa en *K. wickerhamii* y *H. vineae* en ninguna condición (Figura R.3.7.A). Del mismo modo que con los parámetros descritos hasta el momento, las diferencias entre especies se mantuvieron proporcionales a las observadas en condiciones control (Figura R.3.7.A). Igual que sucedió en condiciones control, en presencia de aceite de argán, la acumulación de trehalosa aumentó como consecuencia de la deshidratación, siendo de nuevo *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y, en menor medida, *S. bacillaris* las especies que presentaron una mayor acumulación en ambas condiciones.

Si se analiza el efecto del aceite de argán sobre la acumulación de trehalosa, se puede observar que en células frescas resultó en una mayor acumulación de este metabolito en *T. delbrueckii* y *W. anomalus* (Figura R.3.7.A). Únicamente se observa una caída significativa de los niveles de trehalosa en células frescas de *S. bacillaris*, mientras que no varía significativamente en el resto. Por otro lado, el cultivo en presencia de aceite de argán supuso un incremento de los niveles de trehalosa en las células deshidratadas de todas las especies (salvo en aquellas que no la producen) (Figura R.3.7.B). Como se puede observar, en general, el impacto del aceite de argán sobre el incremento en los niveles de trehalosa fue mayor en aquellas especies que acumularon menos trehalosa en condiciones control. Destaca, por ejemplo, *W. anomalus*, cuya biomasa cultivada en presencia de aceite de argán y deshidratada acumuló niveles de trehalosa similares a los detectados en *T. delbrueckii* en condiciones control, lo cual ayudaría a explicar la gran mejora de la viabilidad de la LSA observada en esta especie. Otro caso destacado es el de *Z. bailii*, la especie en la que se detectó un mayor aumento de la acumulación de trehalosa, siendo los niveles detectados en células deshidratadas cultivadas con aceite de argán hasta 15 veces superiores a los detectados en condiciones control, aunque en este caso la mayor acumulación no supuso un aumento de la viabilidad.

## Resultados y Discusión



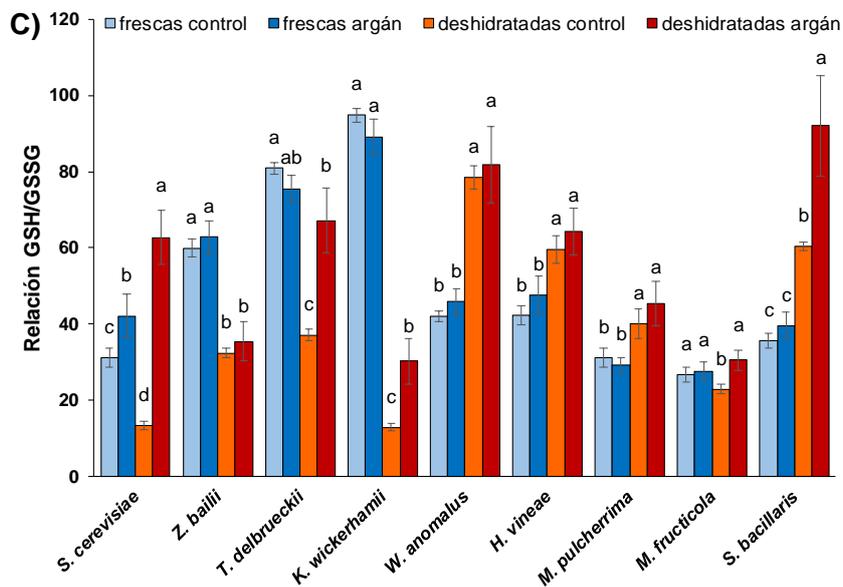
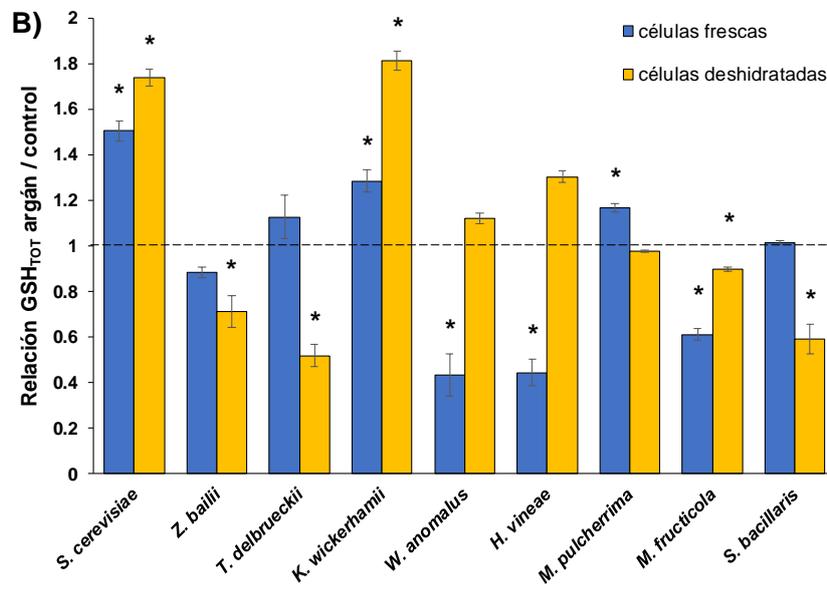
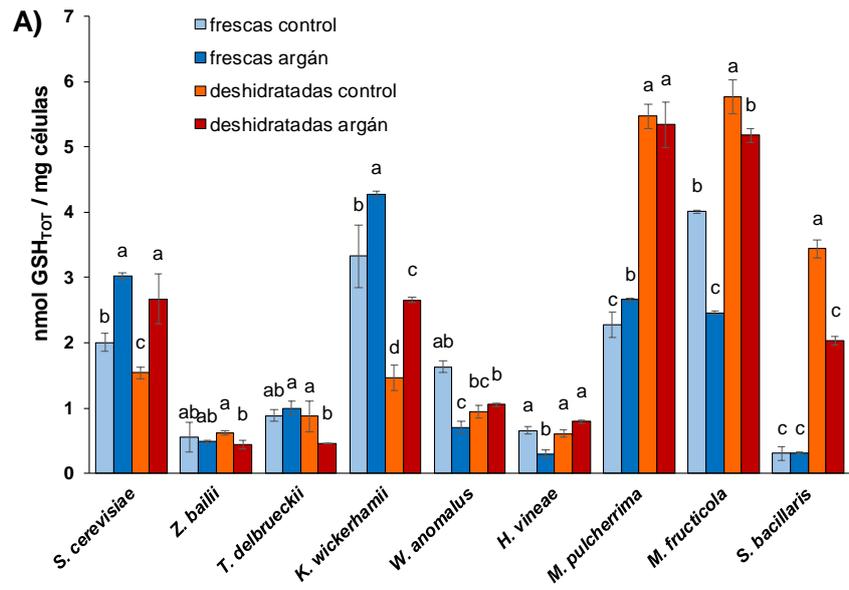
**Figura R.3.7:** Análisis del efecto del aceite de argán sobre los niveles de trehalosa en células frescas y deshidratadas. **A)** Niveles de trehalosa ( $\mu\text{g}$  trehalosa / mg de células). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ). **B)** Relación TRE argán / TRE control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con la condición control.

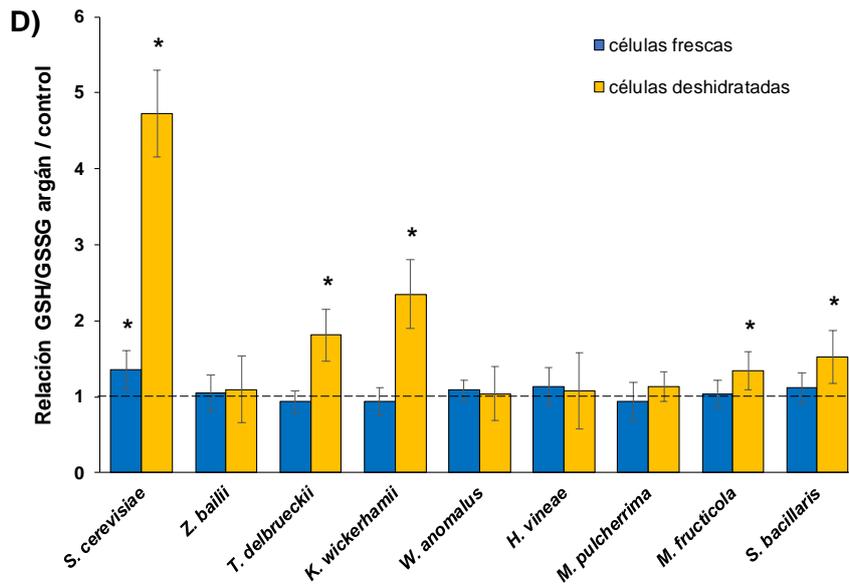
### 3.5.2 Niveles de glutatión

Se analizaron los niveles de glutatión en células cultivadas en presencia de aceite de argán. En base a los resultados presentados en el Apartado 2.3.1, y para facilitar la interpretación del efecto del aceite de argán sobre los niveles de glutatión, se ha centrado el estudio en el efecto de este compuesto sobre los niveles de glutatión total y en la relación GSH/GSSG.

En la Figura R.3.8.A se recogen los datos de los niveles de glutatión total, mientras que en la Figura R.3.8.B se representa la relación  $GSH_{TOT} \text{ argán} / GSH_{TOT} \text{ control}$ , que permiten discernir el efecto del tratamiento con aceite de argán sobre la acumulación de  $GSH_{TOT}$ . Como se puede observar, el aceite de argán no parece tener un efecto compartido sobre la acumulación de glutatión en las diferentes especies estudiadas. Se observó un incremento de los niveles de  $GSH_{TOT}$  en células frescas y deshidratadas de *S. cerevisiae* y *K. wickerhamii*. Por el contrario, *Z. bailii* y *M. pulcherrima* presentaron menor acumulación de  $GSH_{TOT}$  en presencia de aceite de argán ambas condiciones. En algunos casos se detectó, dentro de la misma especie, una respuesta opuesta entre la biomasa fresca y deshidratada. Esto es así en el caso de *T. delbrueckii*, en la que el aceite de argán promovió un ligero aumento de los niveles de  $GSH_{TOT}$  en células frescas, mientras que en células deshidratadas se detectó una clara disminución. Todo lo contrario a lo observado en *W. anomalus* y *H. vineae* en las que, en presencia de aceite de argán, en la biomasa fresca se observó un descenso de los niveles de  $GSH_{TOT}$  y en biomasa deshidratada un aumento.

## Resultados y Discusión





**Figura R.3.8:** Análisis del efecto del aceite de argán sobre el glutatión en células frescas y deshidratadas. **A)** Niveles de glutatión total. **B)** Relación  $GSH_{TOT}$  argán /  $GSH_{TOT}$  control. **C)** Relación GSH/GSSG. **D)** Relación  $(GSH/GSSG)$  argán /  $(GSH/GSSG)$  control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con la condición control.

En la Figura R.3.8.C se presentan los resultados obtenidos del análisis de la relación GSH/GSSG de células frescas y deshidratadas en condiciones control y en presencia de aceite de argán. Se puede observar cómo, de forma general, la presencia de aceite de argán en el medio de cultivo tuvo como consecuencia un aumento de la relación GSH/GSSG, indicando un menor estrés oxidativo endógeno en presencia del aceite. El caso más claro se encontró en la cepa control, donde la relación GSH/GSSG aumentó significativamente en células frescas y deshidratadas tratadas con aceite de argán (Figura R.3.8.D). Además, cabe destacar que en este caso la relación GSH/GSSG detectada en células deshidratadas con aceite de argán fue mayor que la detectada en células frescas con aceite, un comportamiento opuesto al descrito previamente (Apartado 2.3.1) que indica un menor estrés oxidativo endógeno como consecuencia de la adición de aceite de argán al medio de cultivo. Entre las especies no-*Saccharomyces* el efecto del tratamiento con aceite de argán sobre la relación GSH/GSSG fue menos notorio que en el caso de *S. cerevisiae*. Únicamente se observó un aumento estadísticamente significativo de la relación GSH/GSSG en biomasa deshidratada de *T. delbrueckii*, *K. wickerhamii*, *M. fructicola* y *S. bacillaris* (Figura R.3.8.C y D), mientras

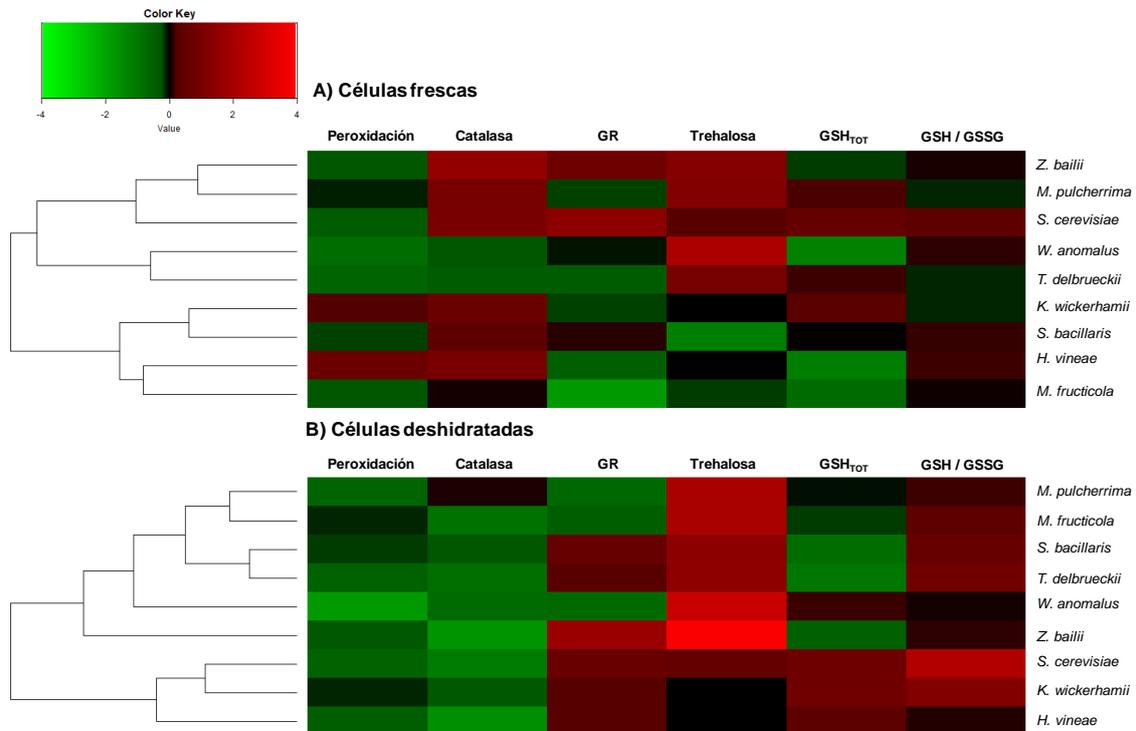
que en el resto de especies y condiciones no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

### **3.6 Análisis global del efecto del aceite de argán sobre los parámetros redox**

Con el fin de obtener una visión global del efecto del cultivo de las levaduras en presencia de aceite de argán sobre los parámetros redox anteriormente descritos se trazaron mapas de calor con los valores obtenidos en células frescas y deshidratadas de todos los parámetros. Los valores representados son los valores obtenidos en presencia de aceite de argán normalizados frente a los obtenidos en condiciones control en escala logarítmica en base 2. Los parámetros cuyo valor es mayor que el del control se representan en rojo, mientras que los que tienen valores menores que el control se representan en verde, tal y como indica la escala de color incluida en la figura. Las especies se agruparon en base a su distancia euclídea.

A partir de los datos presentados en la Figura R.3.9 se puede observar que, en general, el efecto del aceite de argán sobre los parámetros redox analizados no fue idéntico en células frescas y deshidratadas. Una característica común en ambas condiciones es que las células cultivadas en presencia de argán presentaron una reducción de la peroxidación lipídica, lo que nos indica que las levaduras se ven sometidas a un menor daño oxidativo en presencia del aceite. Una de las diferencias más notables entre células frescas y deshidratadas es el comportamiento opuesto de la actividad catalasa. Mientras que en células frescas cultivadas con aceite de argán la actividad fue mayor que en condiciones control (Figura R.3.9.A), en células deshidratadas la actividad es menor en las células procedentes de cultivos con aceite de argán que en los controles respectivos (Figura R.3.9.B). Ya se ha mencionado que la inducción de esta actividad enzimática puede darse como respuesta a la degradación peroxisomal de los ácidos grasos procedentes del aceite. Por otro lado, es posible que el menor daño oxidativo observado, junto con la inducción de otros mecanismos de defensa, haga innecesaria la inducción de la actividad catalasa que se observa generalmente tras la deshidratación. Una de las respuestas más claras al tratamiento con aceite de argán es la mayor acumulación de trehalosa, especialmente en células deshidratadas, lo cual estaría de acuerdo con la reducción del daño oxidativo observada. En células deshidratadas cultivadas con aceite de argán también se observó un aumento de la relación GSH/GSSG, que generalmente fue acompañado de un aumento del nivel de glutatión total y de la actividad glutatión reductasa. Este efecto sobre el

metabolismo del glutatión no es tan claro en células frescas, en las que la respuesta fue más dispar entre especies.



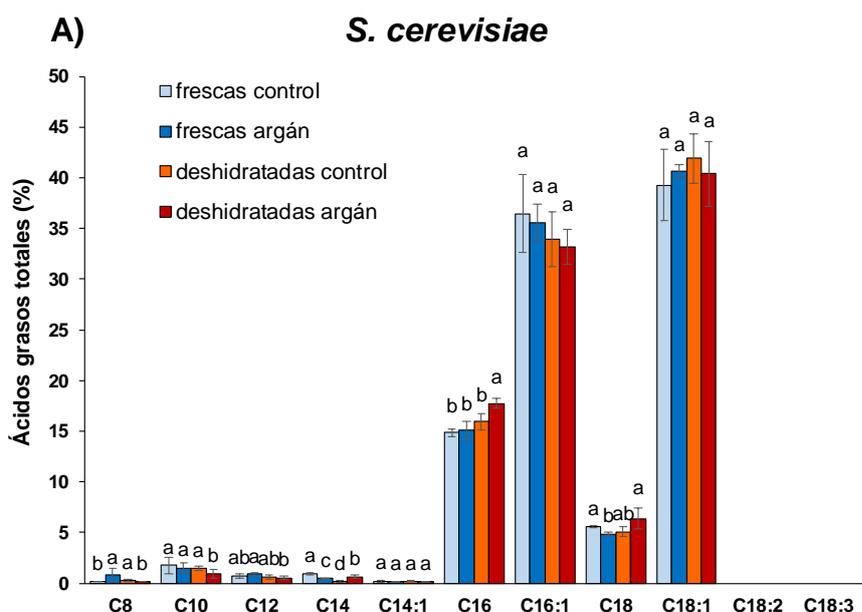
**Figura R.3.9:** Análisis comparativo del efecto del aceite de argán sobre parámetros redox (columnas) en **A)** células frescas y **B)** células deshidratadas. Se representa el  $\text{Log}_2$  de cada parámetro en presencia de aceite de argán normalizado frente a su control. La leyenda de colores indica la variación de valores desde el más bajo (verde) al más alto (rojo). El agrupamiento de las especies se obtuvo mediante distancia euclídea.

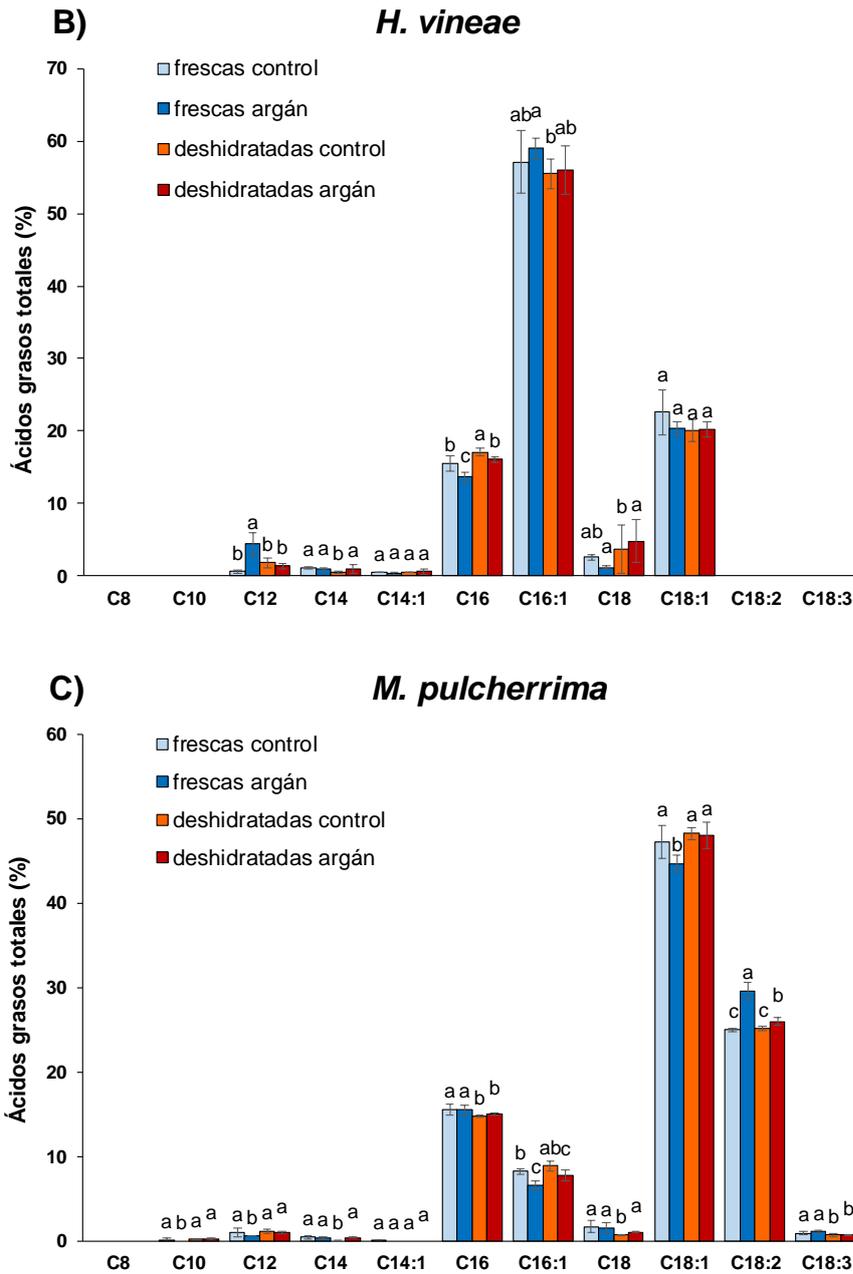
La capacidad antioxidante del aceite de argán, debida a su contenido en ácido oleico y linoleico, y su alto contenido en polifenoles y tocoferoles, ya ha sido descrita (Marfil et al., 2011). Como ya se ha mencionado, en cepas de *S. cerevisiae* y en cepas tipo de algunas levaduras no-*Saccharomyces* procedentes de la CECT, se encontraron resultados similares a los de este trabajo: que el cultivo en presencia de aceite de argán mejora el crecimiento y la capacidad fermentativa, una mejora que va asociada a una disminución de la peroxidación lipídica y a una modulación de las defensas antioxidantes (Gamero-Sandemetro et al., 2019, 2015). En base a los resultados obtenidos, parece claro que el efecto del cultivo en presencia de aceite es similar en las levaduras vínicas no-*Saccharomyces* estudiadas en este trabajo.

### 3.7 Análisis de composición lipídica total en presencia de aceite de argán

Se decidió realizar un estudio para determinar si la presencia del aceite de argán en el medio de cultivo ejerce algún efecto sobre la composición lipídica total de especies seleccionadas en base a sus comportamientos extremos tras la deshidratación. Siguiendo los resultados presentados en el Apartado 2.5 se emplearon las especies *S. cerevisiae*, *H. vineae* y *M. pulcherrima* para este estudio. Todos los ensayos de análisis de composición lipídica total fueron realizados en colaboración con el Dr. Nicolas Rozès de la Universitat Rovira i Virgili.

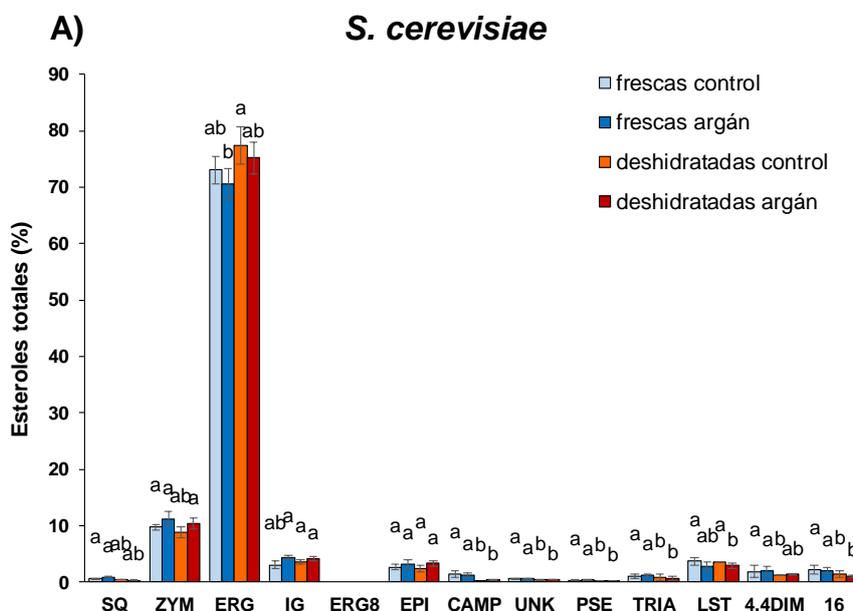
Más allá de las diferencias de composición observadas entre especies, ya detalladas en el Apartado 2.5, no se observaron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos (Figura R.3.10) y esteroides (Figura R.3.11) totales entre células cultivadas con o sin aceite de argán, del mismo modo que prácticamente no se observaron diferencias entre la biomasa fresca y deshidratada, a excepción de cierto aumento de ácido linoleico a costa de ácido oleico en células frescas de *M. pulcherrima*. Aunque no se ha estudiado el contenido lipídico de todas las especies, se puede especular que el efecto beneficioso del aceite de argán no es debido a cambios en la composición de la membrana celular, y estaría relacionado con una mejor protección frente al estrés al que se ven sometidas las levaduras a lo largo del proceso de propagación de biomasa.

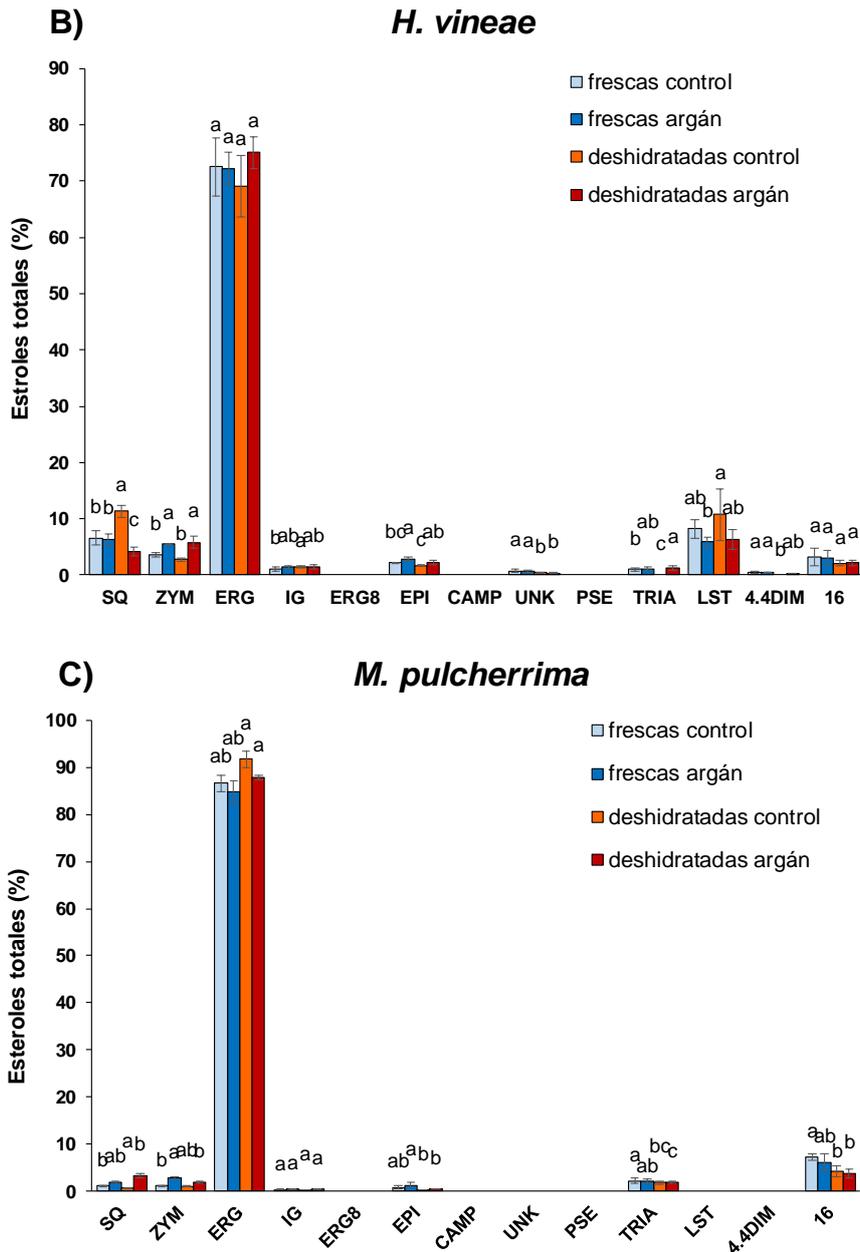




**Figura R.3.10:** Ácidos grasos totales (%) en células frescas y células deshidratadas cultivadas en presencia y ausencia de aceite de argán de **A) *S. cerevisiae***, **B) *H. vineae*** y **C) *M. pulcherrima***. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ). **C8:** ácido caprílico, **C10:** ácido cáprico, **C12:** ácido láurico, **C14:** ácido mirístico, **C14:1:** ácido miristoleico, **C16:** ácido palmítico, **C16:1:** ácido palmitoleico, **C18:** ácido esteárico, **C18:1:** ácido oleico, **C18:2:** ácido linoleico, **C18:3:** ácido gamma-linoleico.

Las levaduras pueden tomar ácidos grasos del medio por difusión o mediante transportadores. Los ácidos grasos internalizados se usan rápidamente para la síntesis de lípidos complejos, se almacenan como lípidos de reserva en partículas lipídicas o se degradan mediante  $\beta$ -oxidación en el peroxisoma (Klug y Daum, 2014). En base a nuestros resultados, parece que, en el caso de que las levaduras estuvieran incorporando los ácidos grasos presentes en el aceite de argán (oleico y linoleico, mayoritariamente) estos no se están empleando directamente para la formación de membranas. La mayoría de especies de levadura, salvo las lipofílicas, crecen de forma pobre en presencia de ácido oleico como única fuente de carbono, pero son capaces de utilizarlo para producir biomasa y energía mediante  $\beta$ -oxidación en peroxisomas (Schüller, 2003). Por tanto, una posible explicación del mayor crecimiento observado en prácticamente todas las especies (Apartado 3.1) sería que los ácidos grasos presentes en el aceite de argán estén siendo empleados como fuente de energía una vez se agotan los azúcares de la melaza o como fuente alternativa o complementaria a estos. Se ha descrito que la presencia de ácido oleico en el medio de cultivo induce la expresión de una serie de genes relacionados con la  $\beta$ -oxidación y la función peroxisomal, la mayoría de los cuales contienen en su promotor el elemento de respuesta a oleato (ORE) que une el factor de transcripción Pip2p-Oaf1p (revisado en Gurvitz y Rottensteiner, 2006).





**Figura R.3.11:** Esteroles totales (%) en células frescas y deshidratadas de **A)** *S. cerevisiae*, **B)** *H. vineae*, y **C)** *M. pulcherrima*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ). **SQ:** escualeno, **ZYM:** zimosterol, **ERG:** ergosterol, **IG:** ignosterol, **ERG8:** ergost-8-enol, **EPI:** episterol, **CAMP:** campesterol, **PSE:** 24,24-dihidrolanosterol, **TRIA:** ergosta-4,5,22-triene-3-one, **LST:** lanosterol, **4.4DIM:** 4,4-Dimetilcolesta-8,14-dienol, **16:** Ergosta-8,22-dienol.

### 3.8 Cultivo en presencia de aceites alternativos en cepas de *S. cerevisiae*

Como ya se ha mencionado, trabajos previos de nuestro grupo de investigación han descrito el efecto beneficioso del aceite de argán sobre la eficiencia tecnológica y la capacidad de respuesta a estrés de diferentes cepas de *S. cerevisiae* (Gamero-Sandemetro et al., 2015). Las cepas empleadas en dichos trabajos fueron dos cepas de interés enológico, pertenecientes a Lallemand Inc., con diferente eficiencia fermentativa respecto a la cepa comercial de referencia T73: D170 (mayor capacidad fermentativa) y D301 (menor capacidad fermentativa). A pesar del claro efecto del tratamiento con aceite de argán descrito en estas cepas, una de las principales barreras para la posible implantación del aceite de argán a escala industrial es su elevado precio, por lo que se decidió ampliar el estudio al tratamiento con otros aceites vegetales sobre esas mismas cepas, en las que el efecto del cultivo en presencia de aceite de argán está muy bien caracterizado. Los aceites se seleccionaron en base a dos criterios fundamentales: que fueran de grado alimentario y que su precio fuera menor que el del aceite de argán. Los aceites elegidos fueron: oliva, girasol, maíz y sésamo. En la Tabla R.3.1 se recoge el precio y el contenido en ácido oleico de los aceites seleccionados, según lo descrito por la bibliografía y por el fabricante.

**Tabla R.3.1:** Comparación del precio y el contenido en ácido oleico de los aceites empleados en este trabajo.

Aceite	Precio (€/L)	Ácido oleico (%)	
		Bibliografía	Fabricante
Argán	60	43 - 49 <sup>1</sup>	47
Oliva	3.2	62 - 79 <sup>2</sup>	69
Girasol	1.25	14 - 65 <sup>2</sup>	25 <sup>3</sup>
Maíz	1.9	19 - 50 <sup>2</sup>	27.4 <sup>4</sup>
Sésamo	18.75	35 - 50 <sup>2</sup>	41

<sup>1</sup> (Charrouf y Guillaume, 2010); <sup>2</sup> (López et al., 2010); <sup>3</sup> (Filip et al., 2011); <sup>4</sup> (Karoui et al., 2010).

Siguiendo con lo establecido en los ensayos anteriores, la cantidad de aceite empleada se ajustó de modo que la concentración final de ácido oleico en la melaza fuera de 6 mg/mL. Para determinar la cantidad necesaria de cada aceite se empleó el porcentaje de ácido oleico indicado por el fabricante, que, en todos los casos, se encuentra dentro de los rangos descritos en la bibliografía (Tabla R.3.1). Las cantidades de aceite añadidas a la melaza aparecen descritas en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos. El coste de aceite por litro de melaza fue de 0.76 €/L en el caso del aceite de argán, muy superior al del resto de aceites: oliva (0.027 €/L), girasol (0.026 €/L), maíz (0.047 €/L) y sésamo (0.273 €/L). A continuación, se exponen los resultados obtenidos del análisis del efecto del tratamiento con aceites alternativos sobre las tres cepas industriales de *S. cerevisiae* seleccionadas: T73, D170 y D301.

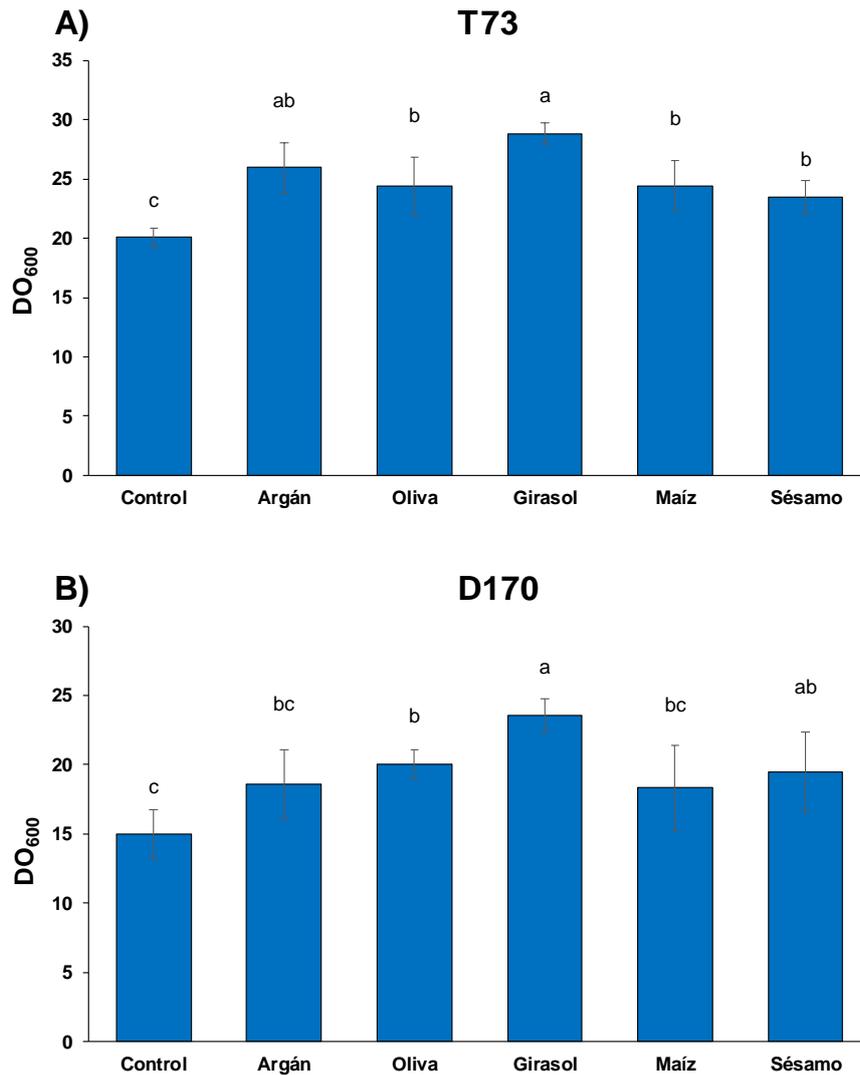
### **3.9 Crecimiento y viabilidad de distintas cepas de *S. cerevisiae* cultivadas en presencia de aceites alternativos**

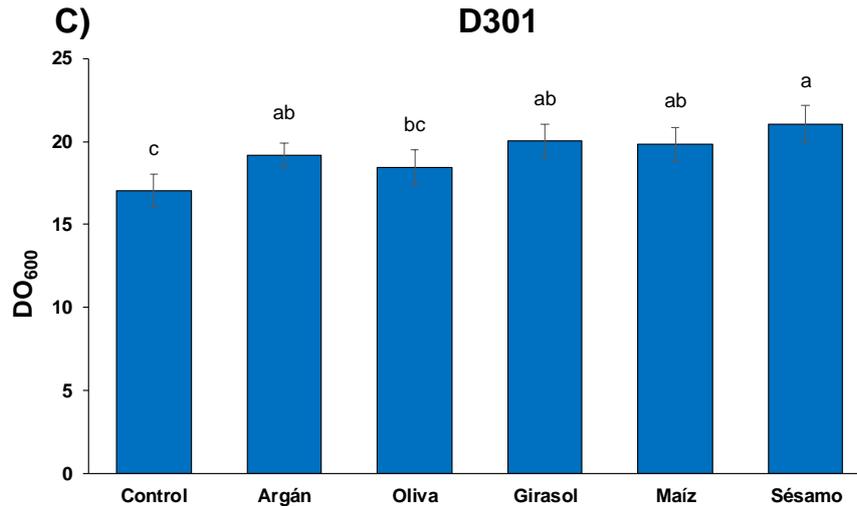
En primer lugar, se analizó en el efecto de los distintos aceites sobre el crecimiento celular de las tres cepas de *S. cerevisiae* en melaza en condiciones de laboratorio. Como se puede ver en la Figura R.3.12, la cepa T73 presentó mayor crecimiento que las otras dos en todas las condiciones. Si se analiza el efecto de los aceites, se observa que, en prácticamente todos los casos, la adición de aceite supuso un incremento del crecimiento celular.

El cultivo de la cepa T73 en presencia de los diferentes aceites resultó en un mayor crecimiento celular respecto del crecimiento en la condición control sin aceite, siendo los tratamientos con los aceites de argán y de girasol los más efectivos (Figura R.3.12.A). Los resultados obtenidos para la cepa D170 difieren ligeramente, ya que, de nuevo, el aceite de girasol fue el que tuvo un mayor efecto beneficioso sobre el crecimiento celular, y en menor medida, los de oliva y sésamo. Sin embargo, no se observó un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento celular en presencia de aceite de argán (Figura R.3.12.B), tal y como se había descrito (Gamero-Sandemetro et al., 2015). Por último, el cultivo de la cepa D301 en presencia de aceites alternativos resultó en un incremento del crecimiento celular en todos los casos, salvo en el aceite de oliva, en el que no se observaron diferencias estadísticamente significativas con el control sin aceite. En esta cepa el aceite con un mayor efecto sobre el crecimiento fue el de sésamo (Figura R.3.12.C).

## Resultados y Discusión

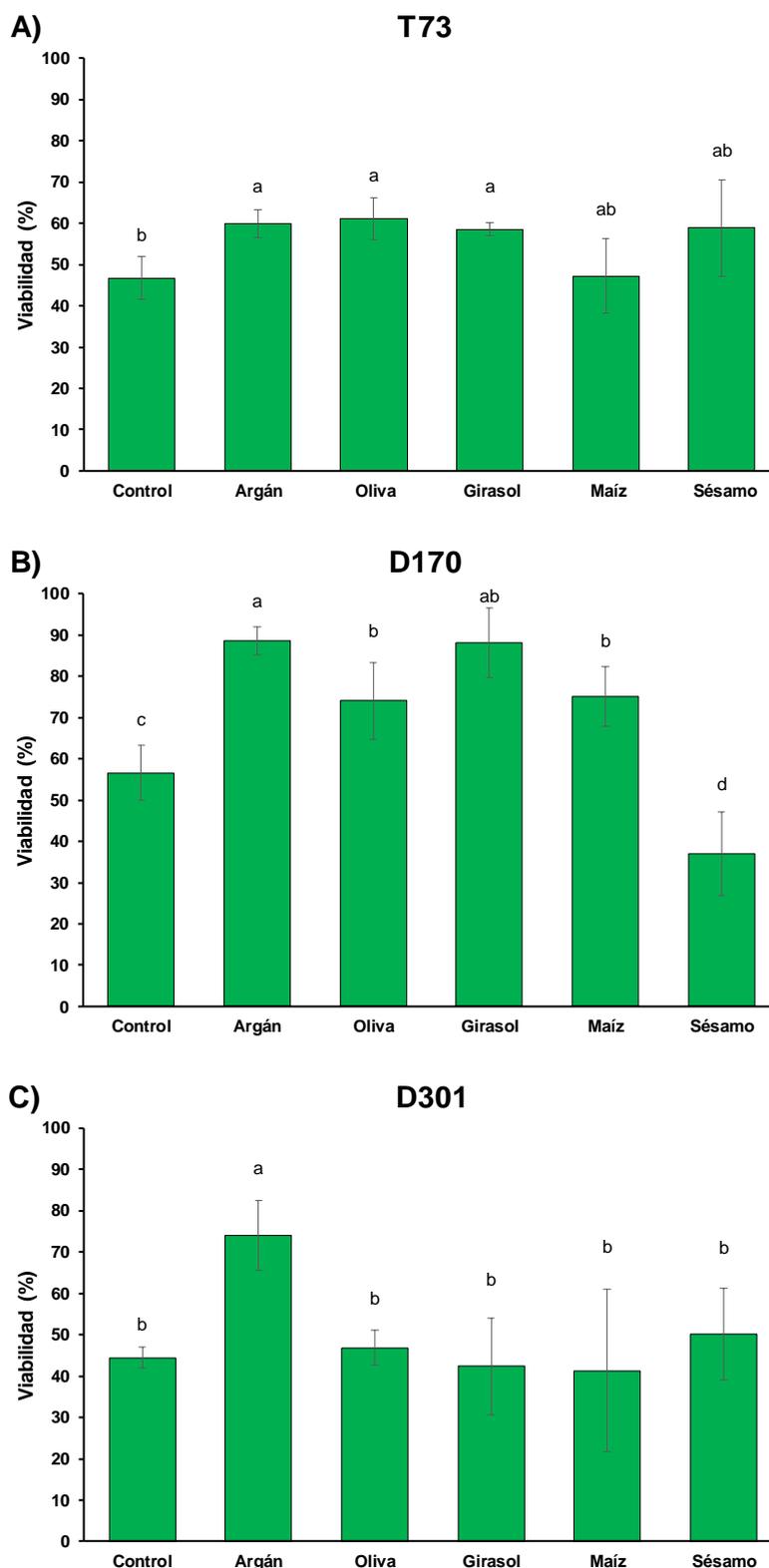
Los resultados obtenidos indican que la presencia de aceites naturales en el medio de cultivo puede tener, en general, un efecto positivo sobre el crecimiento celular de las 3 cepas analizadas. Aunque el grado de mejora del crecimiento producido por cada uno de los aceites varió entre especies, en general, el aceite de argán y el aceite de girasol parecen ser los más efectivos para la mejora del crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* analizadas.





**Figura R.3.12:** Efecto de la suplementación del medio melaza con aceites sobre el crecimiento celular ( $DO_{600}$ ) tras 24 h a 30 °C de **A)** T73, **B)** D170 y **C)** D301. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ).

Una vez analizado el efecto del tratamiento con aceites sobre el crecimiento celular, se analizó su efecto sobre la viabilidad de la LSA obtenida al final del proceso de producción. La viabilidad celular de las tres cepas en condiciones control fue similar, oscilando entre el 45 – 55 %. En general, el tratamiento con aceites resultó en una mejora de la viabilidad de las tres cepas. En la cepa T73, se observó un aumento de la viabilidad en la LSA de células cultivadas en presencia de aceite de argán, oliva y girasol, mientras que no se observan diferencias estadísticamente significativas tras el tratamiento con aceites de maíz ni de sésamo (Figura R.3.13.A). En la cepa D170 el efecto de los aceites fue más variable, se puede observar que, además del aceite de argán, tres de los aceites alternativos (oliva, girasol y maíz) mejoraron la viabilidad de la LSA respecto del control. Sin embargo, en células tratadas con aceite de sésamo se observó una disminución significativa de la viabilidad. De entre los aceites que mejoraron la viabilidad, de nuevo, el aceite de argán y el de girasol fueron los que tuvieron un efecto más destacado (Figura R.3.13.B). Por otro lado, en la cepa D301 únicamente se observó un aumento de la viabilidad en células tratadas con aceite de argán, mientras que el resto de aceites no parecieron tener un efecto ni beneficioso ni perjudicial, sobre este parámetro (Figura R.3.13.C). Cabe mencionar que en los casos en los que se mejoró la viabilidad de las cepas D170 (argán, oliva, girasol y maíz) y D301 (argán), los valores totales de viabilidad fueron superiores a los de la cepa T73 bajo los correspondientes tratamientos.

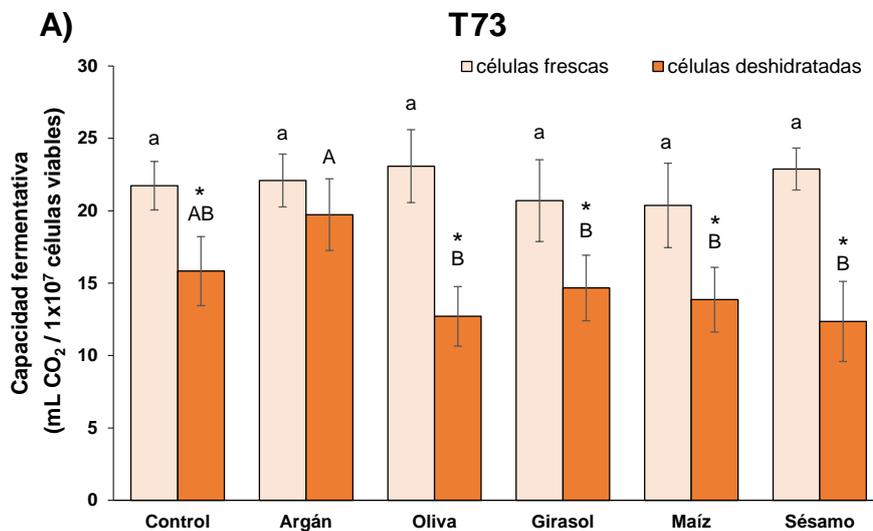


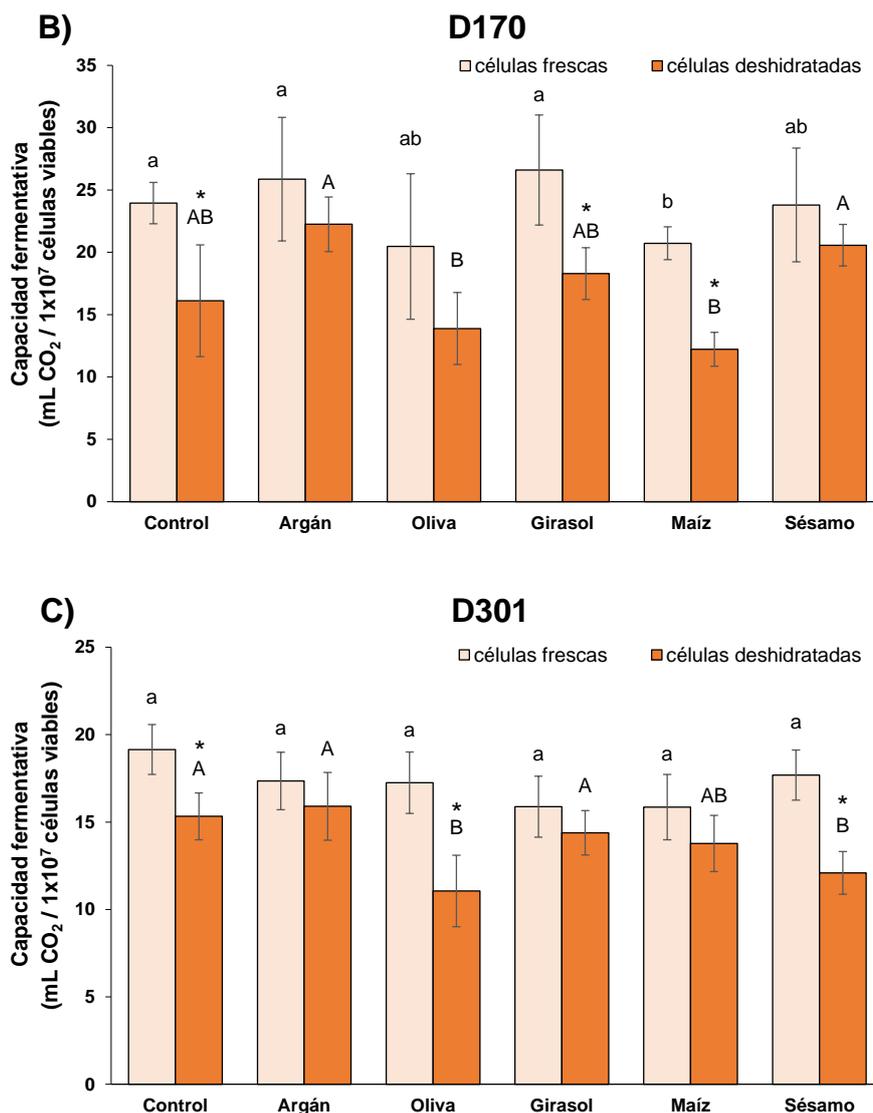
**Figura R.3.13:** Efecto de la suplementación del medio melaza con aceites sobre la viabilidad de la LSA de **A)** T73, **B)** D170 y **C)** D301. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ).

### 3.10 Capacidad fermentativa de distintas cepas de *S. cerevisiae* en presencia de aceites alternativos

Una vez analizado el claro efecto del tratamiento con aceites sobre el crecimiento celular y la viabilidad de las distintas cepas se procedió al análisis de su capacidad fermentativa en MS300, empleando para ello tanto biomasa fresca como deshidratada.

En la Figura R.3.14 se puede observar que en los ensayos realizados con biomasa fresca de las tres especies, la única diferencia estadísticamente significativa con su respectivo control se encuentra en las células de la cepa D170 tratadas con aceite de maíz, que presentaron una ligera reducción de la capacidad fermentativa. En el resto de condiciones analizadas en las tres cepas no se produjeron cambios estadísticamente significativos de la capacidad fermentativa como consecuencia del tratamiento con los distintos aceites. Del mismo modo que se ha descrito en apartados anteriores, tras la deshidratación se observó una disminución significativa de la capacidad fermentativa en la mayoría de los casos, como se describe a continuación.





**Figura R.3.14:** Producción total de CO<sub>2</sub> tras 6 horas en mosto sintético (MS300) a partir de biomasa fresca y deshidratada tratada con diferentes aceites. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones. Diferencias significativas entre células frescas y deshidratadas están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

En lo que se refiere al efecto de cada aceite sobre la capacidad fermentativa de la biomasa deshidratada, en la cepa T73 (Figura R.3.14.A) se observó que, tras el tratamiento con los aceites alternativos al aceite de argán, la producción de CO<sub>2</sub> de la biomasa deshidratada no varió significativamente respecto de los valores de la biomasa control, aunque sí que fue inferior a la de la biomasa tratada con aceite de argán, por lo que parece que el resto de aceites no son tan efectivos como el aceite de argán en mantener una elevada eficiencia fermentativa tras la deshidratación. Por su parte, en la

cepa D170 (Figura R.3.14.B) tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad fermentativa de la biomasa deshidratada tratada con los distintos aceites y la biomasa cultivada en condiciones control. Sin embargo, el aceite de argán y sésamo parecen ser más efectivos que el resto a la hora de mantener una elevada capacidad fermentativa de las células viables tras la deshidratación, ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad fermentativa de las células frescas y deshidratadas tratadas con estos aceites, como sí ocurre en el resto de condiciones. Por último, en la cepa D301 (Figura R.3.14.C), la menos eficiente fermentativamente de las tres analizadas, las células recuperadas tras la deshidratación que habían sido previamente tratadas con los aceites de argán, girasol y maíz mantuvieron una capacidad fermentativa similar a la de las células frescas, al contrario de lo que ocurre en condiciones control y en células tratadas con aceite de oliva y de sésamo. De hecho, con estos dos últimos tratamientos fueron los únicos dos casos en los que se observó una disminución estadísticamente significativa de la capacidad fermentativa en comparación con las condiciones control.

Como se puede ver, igual que se describió en apartados anteriores para el aceite de argán, el tratamiento con distintos aceites parece tener un efecto sobre la capacidad fermentativa de las cepas de *S. cerevisiae* analizadas, aunque este efecto no es compartido entre cepas y aceites. El tratamiento con aceite de argán fue el único que permitió mantener una capacidad fermentativa elevada en células deshidratadas de las tres cepas, seguramente derivado de su potencial antioxidante, el mayor de entre los aceites empleados (Cabrera-Vique et al., 2012), que como ya se vio en el Apartado 3.9 supuso una mejora en el crecimiento y la viabilidad tras la deshidratación de estas cepas.

### **3.11 Efecto del tratamiento con aceites alternativos sobre parámetros redox de cepas de *S. cerevisiae***

Una vez determinado el efecto del tratamiento con diferentes aceites sobre los parámetros fisiológicos y de eficiencia tecnológica se procedió a analizar el efecto de los aceites sobre los parámetros bioquímicos indicadores de estrés oxidativo que se han analizado a lo largo de este trabajo, para determinar las posibles causas de la mejora tecnológica descrita.

Como sucedía con los parámetros hasta ahora descritos, no existe un efecto común del tratamiento con cada aceite sobre los parámetros redox analizados a continuación, aunque se encontraron ciertas similitudes. Para facilitar la interpretación de los resultados y ver con claridad el efecto de cada aceite sobre cada uno de los biomarcadores analizados, los resultados se presentan como la relación aceite/control, es decir, los valores totales obtenidos en cada muestra se hicieron relativos al valor obtenido en condiciones control y se representa dicha relación para cada aceite. Valores por encima de 1 implican un aumento del parámetro analizado en presencia de aceites y valores por debajo de 1 implican una disminución.

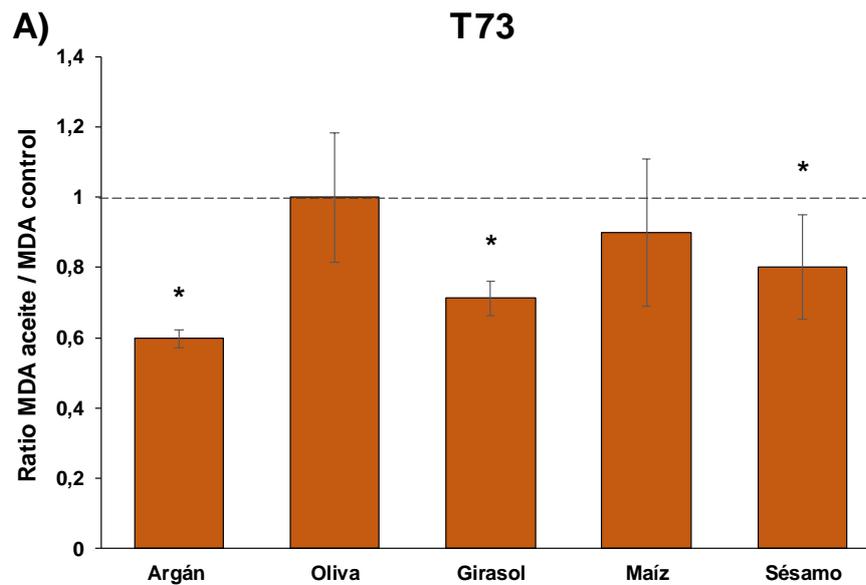
#### **3.11.1 Daño oxidativo en lípidos en presencia de aceites alternativos**

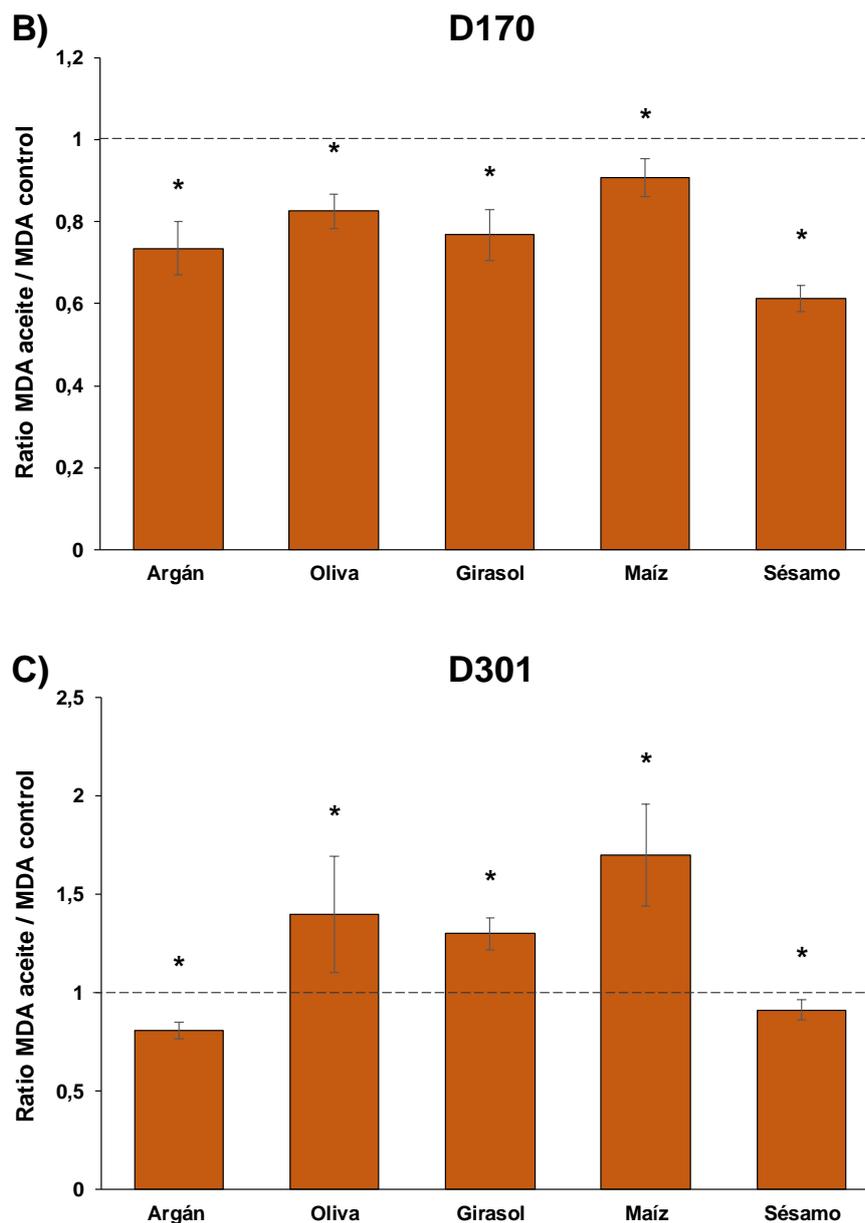
En primer lugar, se analizó el efecto del tratamiento con aceites sobre la peroxidación lipídica en células frescas y deshidratadas. Los niveles de MDA en células frescas no se vieron afectados por el tratamiento con aceites en ninguno de los casos y fueron similares en las tres cepas, oscilando entre 8 y 12 pmol de MDA/mg de células. Como cabría esperar, tras la deshidratación los niveles de MDA aumentaron significativamente. En el caso de las células deshidratadas, los valores totales de MDA difirieron entre cepas, siendo más elevados en T73 ( $75.95 \pm 13.62$  pmol/mg de células en condiciones control) que en D170 ( $52.55 \pm 3.29$  pmol/mg de células) y D301 ( $42.51 \pm 4.22$  pmol/mg de células).

Como puede observarse en la Figura R.3.15 el cultivo en presencia de aceite de argán resultó en una menor peroxidación lipídica en las tres cepas analizadas en células deshidratadas. En la cepa T73, los aceites de girasol y de sésamo también resultaron en una disminución del nivel de MDA respecto del control, aunque menor que en presencia de aceite de argán. No se observaron diferencias significativas en el nivel de MDA tras el tratamiento con los aceites de oliva y maíz respecto del control (Figura R.3.15.A). Por otro lado, en la cepa D170 el cultivo con todos los aceites ensayados resultó en una disminución de la peroxidación en células deshidratadas (Figura R.3.15.B). Por último, destaca el efecto observado en la cepa D301, en esta cepa

únicamente tuvieron un efecto positivo sobre la acumulación de MDA los aceites de argán y de sésamo, en los que se observa una pequeña disminución, mientras que el cultivo con aceite de oliva, girasol y maíz resultó en un aumento de la peroxidación lipídica (Figura R.3.15.C).

En general, se puede observar que los tratamientos que resultaron en un menor grado de peroxidación correlacionan con una mejora de los parámetros tecnológicos descritos anteriormente. El efecto protector de los distintos aceites resultaría en un menor daño oxidativo que, a su vez, tendría como consecuencia una mejora de la eficiencia tecnológica de la LSA. Un ejemplo de esto se encontró en los casos del tratamiento con aceite de argán y de girasol en la cepa T73, en los que la peroxidación disminuye y, como se ha descrito anteriormente, se observa una mejora del crecimiento, de la viabilidad y capacidad fermentativa de la LSA. Del mismo modo, la mejora en la eficiencia tecnológica de la cepa D170 tras el tratamiento con aceite de argán, oliva y girasol podría estar relacionada con un menor daño oxidativo derivado del efecto protector de los aceites. Por otro lado, la cepa D301, que es la que tiene un peor comportamiento tecnológico, no parece responder tan bien al tratamiento con aceites. Los datos de peroxidación lipídica ayudarían a explicar el menor grado de mejora tras el cultivo en presencia de aceites para esta cepa. El único aceite con el que se observó una clara mejora del crecimiento y la viabilidad fue con el aceite de argán, precisamente en el que se observa un mayor efecto de disminución de los niveles de MDA.



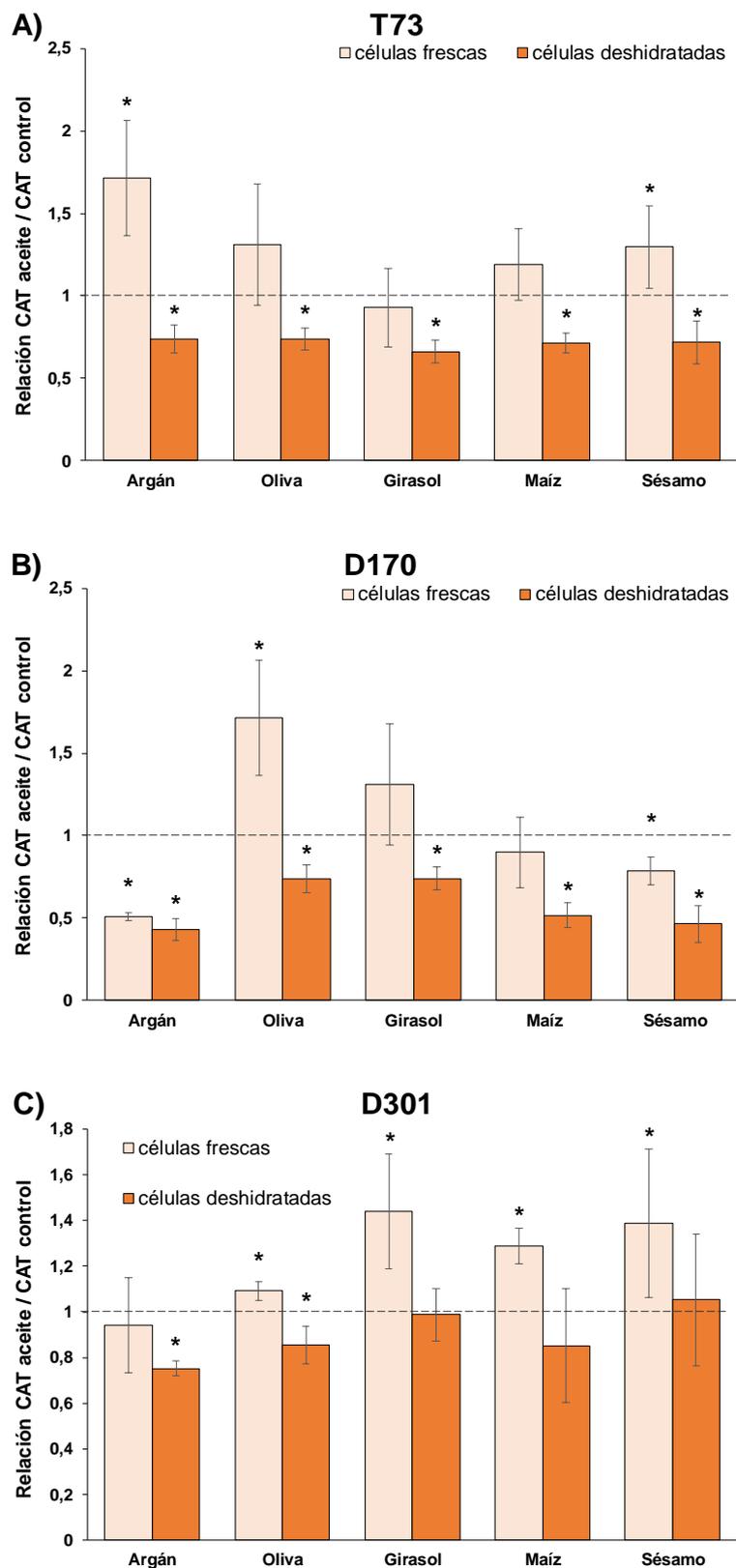


**Figura R.3.15:** Relación MDA aceite / MDA control en células deshidratadas de **A)** T73, **B)** D170 y **C)** D301. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control sin tratamiento ( $p < 0.05$ ).

### **3.11.2 Actividades enzimáticas de defensa antioxidante en presencia de aceites alternativos**

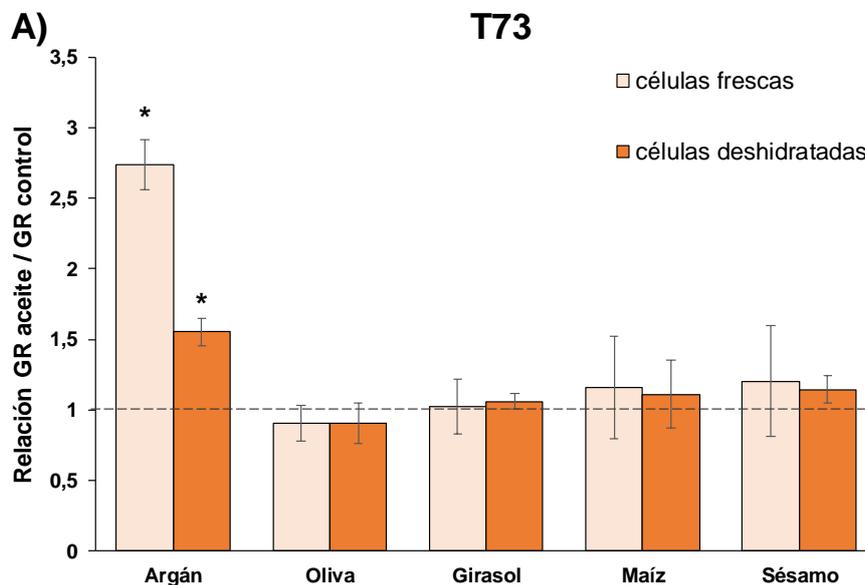
Se estudiaron los niveles de actividad catalasa y glutatión reductasa en células frescas y deshidratadas cultivadas en presencia de los distintos aceites. De nuevo, los valores de actividad enzimática obtenidos se compararon con los detectados en células frescas y deshidratadas en condiciones control sin tratamiento con aceites.

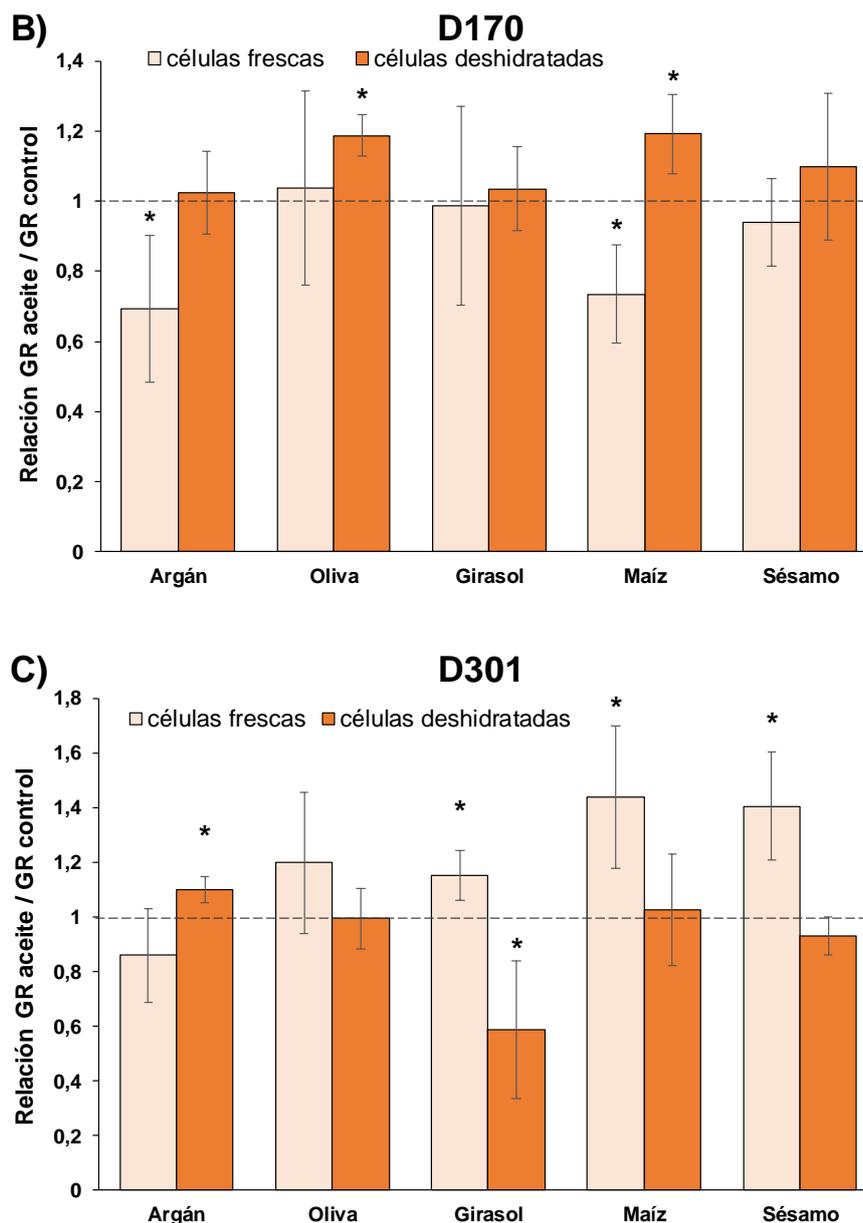
En primer lugar, nos centraremos en el estudio de la actividad catalasa. Como puede observarse en la Figura R.3.16.A, en células de la cepa T73 cultivadas en presencia de aceite de argán se observó una mayor actividad catalasa en células frescas y menor en células deshidratadas, en comparación con las células sin tratar, como ya se ha descrito en apartados anteriores. En lo que se refiere al resto de aceites, en células frescas, la única diferencia estadísticamente significativa respecto del control es la mayor actividad catalasa detectada en presencia de aceite de sésamo. Por otro lado, se detectaron valores de actividad catalasa inferiores a los del control en células deshidratadas tratadas con todos los aceites (Figura R.3.16.A). Del mismo modo, en la cepa D170 se observó una menor actividad catalasa en la biomasa deshidratada tratada con todos los aceites. En esta cepa, además, se observó una menor actividad catalasa en células frescas tratadas con aceites de argán y de sésamo (efecto contrario al observado en la cepa T73), así como valores de actividad significativamente mayores en presencia de aceite de oliva (Figura R.3.16.B). Por último, en la cepa células frescas de D301 no vimos ningún efecto del tratamiento con aceite de argán, pero sí que se observó un aumento significativo de la actividad catalasa en células frescas tratadas con los cuatro aceites alternativos. La biomasa deshidratada tratada con aceite de argán y de oliva presentó menor actividad que la biomasa control, mientras que la tratada con aceite de girasol, maíz y sésamo no presentó diferencias significativas respecto del control (Figura R.3.16.C).



**Figura R.3.16:** Relación Catalasa aceite / Catalasa control en células frescas y deshidratadas de **A)** T73, **B)** D170 y **C)** D301. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control sin tratamiento ( $p < 0.05$ ).

En general, la mayoría de tratamientos no tuvieron efecto sobre la actividad glutatión reductasa de las levaduras. El único tratamiento que tuvo efecto sobre la actividad GR de la cepa T73 fue con aceite de argán, observándose un aumento de la actividad glutatión reductasa respecto de las células control en ambas condiciones, siendo este más pronunciado en células frescas que en células deshidratadas. No se observó ningún efecto del tratamiento con aceites de oliva, girasol, maíz o sésamo sobre la actividad GR en la cepa T73 (Figura R.3.17.A). Por otro lado, en la cepa D170, en células tratadas con los aceites de argán y de maíz se detectó una menor actividad GR en células frescas. El tratamiento con aceite de maíz tuvo el efecto opuesto en células deshidratadas, en las que se observó una mayor actividad GR en su presencia, una observación que también se da en presencia de aceite de oliva. En el resto de tratamientos no se observaron diferencias estadísticamente significativas con las células sin tratar (Figura R.3.17.B). Por último, en células frescas de la cepa D301 tratadas con aceites de girasol, maíz y sésamo se detectó una mayor actividad GR. En células deshidratadas de esta cepa, tras el tratamiento con aceite de argán, se observaron valores de actividad superiores al control, mientras que en células tratadas con aceite de girasol la actividad GR fue menor que en el control (Figura R.3.17.C).



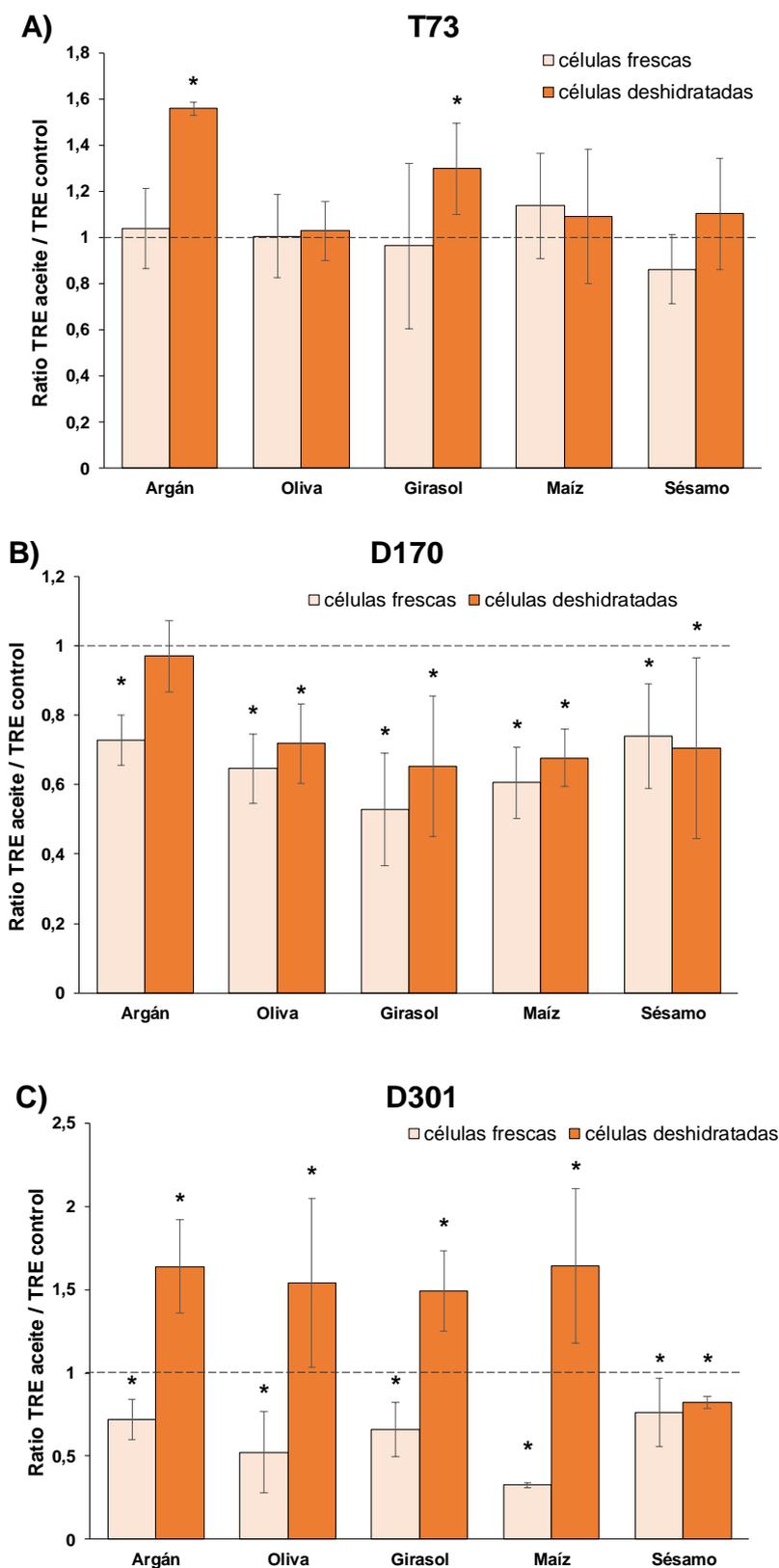


**Figura R.3.17:** Relación GR aceite / GR control en células frescas y deshidratadas de **A)** T73, **B)** D170 y **C)** D301. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control sin tratamiento ( $p < 0.05$ ).

### 3.11.3 Niveles de trehalosa en presencia de aceites alternativos

A continuación, se analizó el efecto del cultivo en presencia de aceites sobre los niveles de trehalosa en células frescas y deshidratadas. En células frescas de la cepa T73 no se observó ningún efecto sobre la acumulación de trehalosa (Figura R.3.18.A). Por otro lado, en las cepas D170 y D301 se detectó una disminución estadísticamente significativa de los niveles de trehalosa como consecuencia del tratamiento con todos los aceites (Figura R.3.18.A y B).

Tal y como ocurrió en condiciones control, tras la deshidratación, la LSA obtenida en presencia de aceites presentó niveles de trehalosa superiores a los de la biomasa fresca en todos los casos. Cabe destacar que existen diferencias significativas entre especies en los niveles de trehalosa detectados tras la deshidratación. Tomando como referencia los valores en condiciones control se puede ver que la cepa T73 acumuló mucha más trehalosa ( $83.48 \pm 9.21 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) que las cepas D170 ( $33.86 \pm 8.39 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) y D301 ( $13.55 \pm 1.18 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). Si se analiza el efecto de cada uno de los aceites, en la cepa T73 el aceite de argán resultó en un aumento significativo de los niveles de trehalosa en la LSA, el único aceite alternativo en el que se observó este comportamiento fue el aceite de girasol, aunque el efecto sobre la acumulación de trehalosa fue menor que en el caso del aceite de argán. No se observó ningún efecto en el resto de aceites (Figura R.3.18.A). En la cepa D170 el cultivo con aceites no resultó en una mayor acumulación de trehalosa en células deshidratadas en ningún caso. De hecho, se observó una disminución estadísticamente significativa de los niveles de trehalosa en células cultivadas en presencia de todos los aceites alternativos: oliva, girasol, maíz y sésamo (Figura R.3.18.B). En la cepa D301 sí que se observó un aumento estadísticamente significativo de los niveles de trehalosa en células cultivadas con aceite de argán, oliva, girasol y maíz, y no se vio efecto en aceite de sésamo (Figura R.3.18.C). A pesar del aumento detectado los niveles totales se mantienen muy por debajo de los de la cepa T73, como ya se ha comentado.

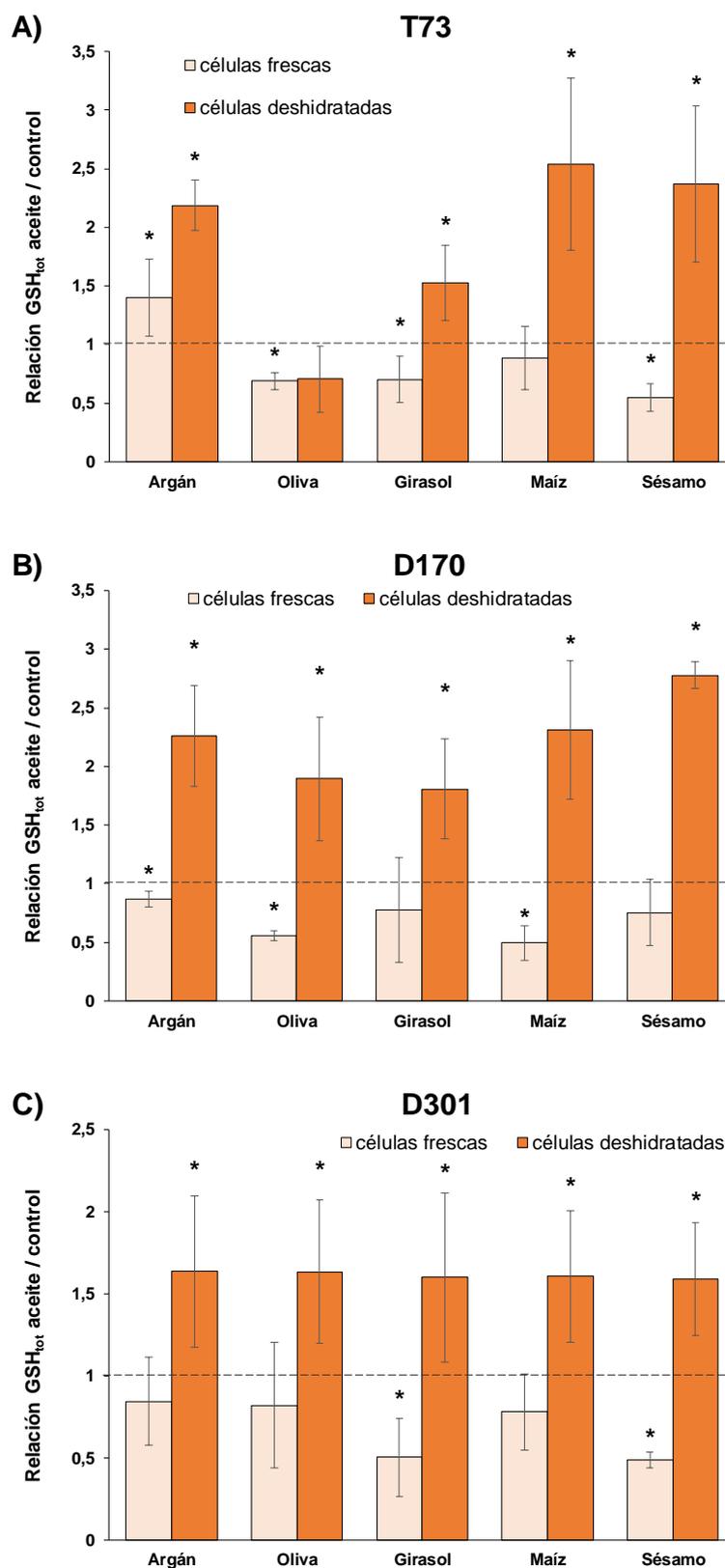


**Figura R.3.18:** Relación Trehalosa aceite / Trehalosa control en células frescas y deshidratadas de **A)** T73, **B)** D170 y **C)** D301. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control sin tratamiento ( $p < 0.05$ ).

### 3.11.4 Niveles de glutatión en presencia de aceites alternativos

Como ya se ha visto en apartados anteriores el nivel de glutatión total ( $GSH_{TOT}$ ) y la relación  $GSH/GSSG$  son buenos indicadores del estado redox intracelular, por ello se estudió el efecto del tratamiento con aceites sobre estos dos parámetros.

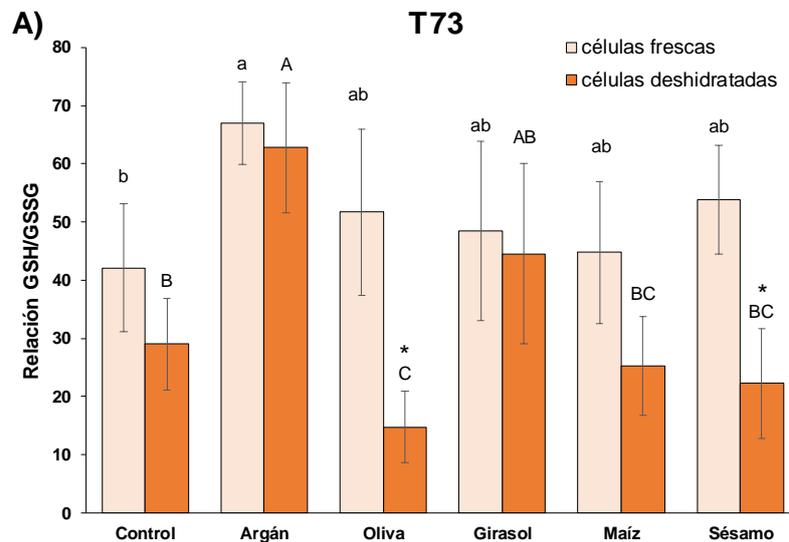
Como se puede observar en la (Figura R.3.19), en general, el tratamiento con aceites tuvo un efecto compartido en la biomasa deshidratada de las tres cepas, en las que se observó un aumento de los niveles de  $GSH_{TOT}$ . En células frescas de la cepa T73 la presencia de aceite de argán supuso un aumento de los niveles totales de glutatión, un efecto completamente opuesto al observado con los aceites alternativos empleados, en los que se vio una disminución (oliva, girasol y sésamo) o no se detectaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las células sin tratar (maíz). Por otro lado, en biomasa deshidratada, los niveles de glutatión total aumentaron significativamente en presencia de aceite de girasol, maíz y sésamo, igual que ocurrió con el aceite de argán. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en células cultivadas en presencia de aceite de oliva (Figura R.3.19.A). La respuesta en las cepas D170 y D301 fue más homogénea. En células frescas de la cepa D170 se observó una disminución estadísticamente significativa de los niveles de  $GSH_{TOT}$  en presencia de aceite de argán, oliva y maíz, y no se observó variación con los aceites de girasol y sésamo. En células deshidratadas de la cepa D170 cultivadas en presencia de aceite se detectó una mayor acumulación de glutatión en todos los casos (Figura R.3.19.B). Por último, en la cepa D301, igual que ocurrió en la cepa D170, el cultivo con todos los aceites supuso una mayor acumulación de glutatión en células deshidratadas. En células frescas de esta cepa no se observaron cambios estadísticamente significativos en presencia de aceite de argán, oliva y maíz, mientras que con aceites de girasol y sésamo se observó una menor acumulación que en condiciones control.

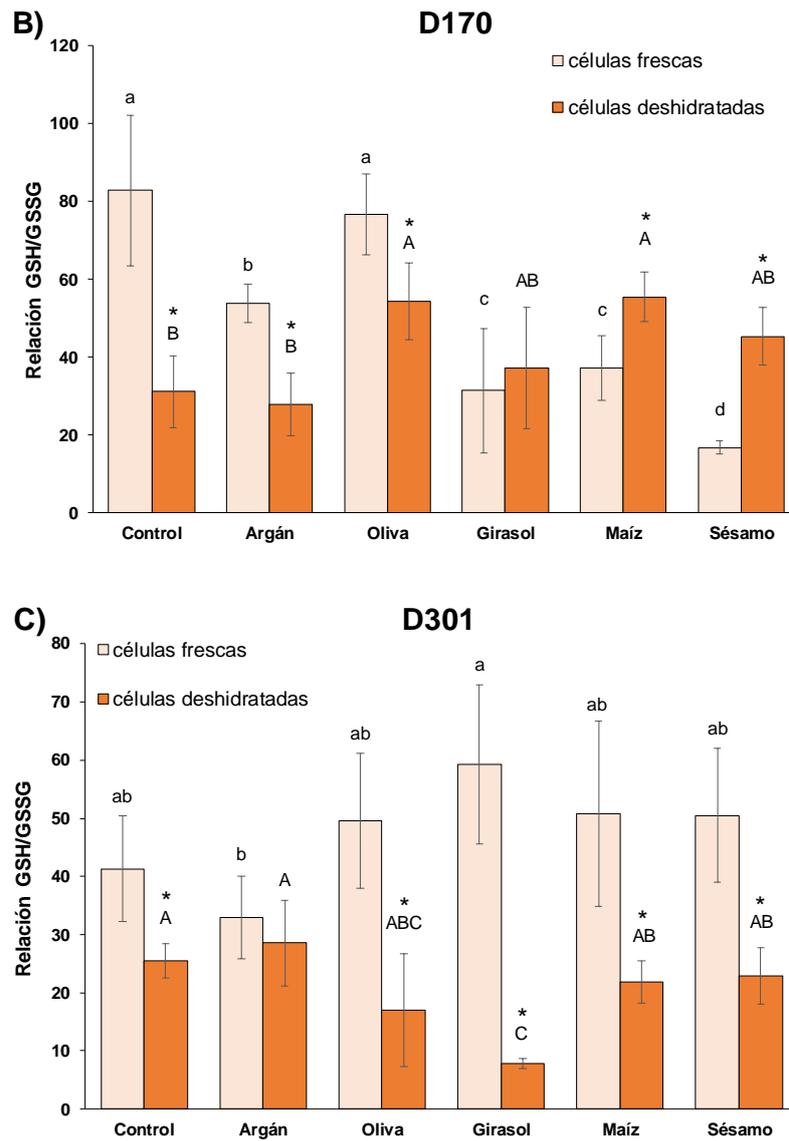


**Figura R.3.19:** Relación GSH<sub>TOT</sub> aceite / GSH<sub>TOT</sub> control en células frescas y deshidratadas de **A) T73, B) D170 y C) D301**. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control sin tratamiento ( $p < 0.05$ ).

Como puede observarse en la (Figura R.3.20) la relación GSH/GSSG varió considerablemente entre cepas y condiciones. En general, la deshidratación supuso una disminución de la relación GSH/GSSG en comparación con las células frescas, aunque se encontraron algunas excepciones, como en la cepa T73 en presencia de aceite de argán, en la que se observó un aumento de la relación, tal y como describimos en apartados anteriores, o en células de la cepa D170 cultivadas en presencia de aceite de maíz, en las que la relación GSH/GSSG también aumenta tras la deshidratación.

Si se analiza el efecto de cada uno de los aceites sobre el valor de la relación GSH/GSSG en células deshidratadas se observa que en la cepa T73 la relación es mayor en células tratadas con aceite de argán que en las células control, mientras que en células cultivadas con aceite de oliva la relación es menor. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en presencia de aceites de girasol, maíz y sésamo (Figura R.3.20.A). En la cepa D170 la relación es mayor en el caso de los aceites de oliva y maíz, y no se observan cambios estadísticamente significativos al cultivarla con aceites de argán, girasol y sésamo (Figura R.3.20.B). En la cepa D301 la única diferencia significativa se encontró en las células tratadas con aceite de girasol, que presentaron una relación menor a la del control (Figura R.3.20.C).





**Figura R.3.20:** Efecto de la suplementación del medio melaza con aceites sobre la relación GSH/GSSG en células frescas (barras azules) y deshidratadas (barras amarillas) de **A)** T73, **B)** D170 y **C)** D301. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones. Diferencias significativas entre células frescas y deshidratadas están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

### 3.12 Discusión general

La adición de compuestos de grado alimentario con actividad antioxidante es una estrategia viable para mejorar la producción industrial de levaduras vínicas, tanto desde el punto de vista de aceptación social como tecnológico. Uno de los tratamientos que ha demostrado tener un efecto positivo sobre la eficiencia tecnológica de cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* y cepas tipo de otras levaduras no-*Saccharomyces*, es el cultivo en presencia de aceite de argán (Gamero-Sandemetrico et al., 2019, 2015). En este trabajo se ha abordado la caracterización del efecto del cultivo en presencia de aceite de argán en condiciones de propagación de biomasa sobre levaduras no-*Saccharomyces* de origen vínico.

En general, el cultivo en presencia de aceite de argán resultó en un ligero aumento del crecimiento celular. Las levaduras son capaces de incorporar los ácidos grasos del medio, con el fin de ser almacenados como lípidos de reserva o como fuente de energía mediante su degradación en peroxisomas (Klug y Daum, 2014). Se ha descrito que el uso de ácido oleico como co-sustrato en medios de cultivo con glucosa aumenta la producción de biomasa, en detrimento de la de etanol, por la reducción del efecto *Crabtree* (Marc et al., 2013), lo cual ayudaría a explicar el mayor crecimiento observado en la mayoría de especies analizadas. El efecto sobre la viabilidad no fue tan claro como sobre el crecimiento celular, observándose una mejora significativa únicamente en *H. vineae* y *W. anomalus*.

La importante actividad antioxidante del aceite de argán se conoce desde hace tiempo (Drissi et al., 2004; El Abbassi et al., 2014; Marfil et al., 2011) e incluso se ha empleado para combatir el estrés oxidativo asociado a diversas patógenesis en modelos de mamíferos (Bakour et al., 2018; El Midaoui et al., 2016), lo cual lo hace ideal para combatir el estrés oxidativo que sufren las levaduras durante la propagación de la biomasa. La mejora de la eficiencia tecnológica descrita fue acompañada de una reducción del daño oxidativo sufrido por las levaduras, probablemente debida al efecto protector del aceite. Además, se detectó una modulación de los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo de la célula. Aunque la respuesta no fue idéntica en todos los casos, en general la LSA tratada con aceite de argán presentó una reducción de la actividad catalasa, un aumento de los niveles de trehalosa y un aumento de tres parámetros íntimamente relacionados: el glutatión total, la relación GSH/GSSG y la actividad GR. Como se ha descrito en apartados anteriores, estas variaciones en los parámetros redox están asociadas a un mejor comportamiento tecnológico, en especial la mayor acumulación de trehalosa y el aumento de la relación GSH/GSSG. Aunque es

poco probable que el aceite de argán tenga un efecto directo sobre todos estos mecanismos de defensa, el menor daño oxidativo asociado a la presencia de compuestos antioxidantes del aceite del medio de cultivo favorecería la modulación de los mecanismos de regulación de estos sistemas. Merece la pena destacar que, como se ha comentado, en presencia de aceite de argán se observó una mayor acumulación de trehalosa (salvo en *K. wickerhamii* y *H. vineae*). Por lo que parece evidente que las especies analizadas son capaces de acumular este disacárido, pero tal y como se planteó en el Apartado 2.3.1, no lo hacen, o al menos no al nivel de otras especies, probablemente por el estado fisiológico en el que se encuentran.

Por último, cabe mencionar que, aunque se conoce la capacidad de las levaduras de incorporar lípidos exógenos (Klug y Daum, 2014), el cultivo con aceite de argán, rico en ácido oleico (C18:1) y linoleico (C18:2), no resultó en cambios en la composición lipídica total. Estos resultados contrastan con lo observado por Redón et al., (2009), en cuyo trabajo observaron que la suplementación del medio de cultivo con diferentes ácidos grasos puros resultó en modificaciones en la composición de los lípidos de membrana, mediante incorporación de lípidos exógenos y la modulación de la biosíntesis.

Por otro lado, se ha ampliado la caracterización del uso de compuestos de grado alimentario para la mejora de la producción de biomasa a otros aceites de origen vegetal. Se seleccionaron los aceites de oliva, de girasol, de maíz y de sésamo. Si bien la capacidad antioxidante de estos aceites ya ha sido determinada mediante métodos químicos (Marfil et al., 2011; Pellegrini et al., 2003; Sánchez et al., 2007; Szydłowska-Czerniak et al., 2008; Tuberoso et al., 2007), y en ningún caso es superior a la del aceite de argán (Cabrera-Vique et al., 2012), decidimos estudiar su efecto con el fin de buscar alternativas más económicas y que pudieran tener un efecto similar al del aceite de argán. Esta caracterización se realizó en cepas de *S. cerevisiae* de diversa eficiencia biotecnológica debido a que se disponía de una caracterización previa de su comportamiento en presencia de aceite de argán (Gamero-Sandemetro et al., 2019, 2015).

Aunque no se encontró una respuesta común al tratamiento con cada uno de los aceites en las tres cepas, sí que se vieron claros efectos sobre su eficiencia tecnológica y sus parámetros de respuesta estrés, seguramente derivados de la capacidad antioxidante de los aceites empleados, que quedó probada por la reducción de la peroxidación lipídica observada en la LSA tratada con los mismos. Como cabía esperar en base a los resultados ya publicados, el aceite de argán mejoró la eficiencia

tecnológica de las tres cepas. Con el resto de aceites, en general, también se observó una mejora del crecimiento y de la viabilidad, siendo el aceite de girasol el que tuvo un mayor efecto en las cepas T73 y D170. En la cepa D301 prácticamente no se observó efecto de los aceites alternativos empleados, lo cual indicaría que el efecto de los tratamientos es dependiente de cepa. En la mayoría de los casos se encontró una correlación entre la mejora tecnológica y un mayor grado de disminución del daño oxidativo. En este caso, aunque existen diferencias entre cepas, el cultivo en presencia de argán promovió una modulación de los mecanismos redox similar a la que se ha descrito para las especies no-*Saccharomyces*: reducción de la actividad catalasa, mayor acumulación de trehalosa y glutatión y aumento de la relación GSH/GSSG. Con el resto de aceites ensayados se observa una mayor variabilidad entre cepas sobre su efecto en los parámetros redox. A pesar de que la cantidad de aceite en la melaza se ajustó en función de su contenido en ácido oleico, según lo observado por Gamero-Sandemetro et al. (2015), la capacidad antioxidante de los aceites está determinada también por la presencia de otros componentes, como los tocoferoles, por lo que es posible que las diferencias en la composición de estos compuestos antioxidantes expliquen el diferente efecto de los aceites empleados en comparación con el aceite de argán. De cualquier modo, existe un claro efecto de los aceites alternativos sobre algunos de los parámetros redox analizados, como por ejemplo un aumento de los niveles de glutatión y de trehalosa, parámetros que como se ha descrito en apartados anteriores, se han relacionado con una mejor eficiencia tecnológica y explican la mejora de la LSA observada tras el tratamiento con, por ejemplo, aceite de girasol o de oliva.

En conclusión, nuestros resultados han permitido confirmar el efecto beneficioso del aceite de argán sobre la propagación de biomasa en levaduras vínicas no-*Saccharomyces*, tal y como se había observado previamente en cepas vínicas de *S. cerevisiae*. Además, en base a los resultados obtenidos, aunque resulta difícil trazar un patrón de respuesta común al tratamiento con cada uno de los aceites, parece evidente que la presencia de otros aceites vegetales de grado alimentario durante el cultivo tiene un efecto positivo sobre la eficiencia tecnológica de la LSA obtenida. De entre los aceites analizados el aceite de girasol presentó los resultados más prometedores, atendiendo a la mejora del crecimiento y de la viabilidad observadas, así como el mantenimiento de una capacidad fermentativa adecuada tras la deshidratación. Además, teniendo en cuenta la gran diferencia de precio con el aceite de argán, se puede proponer al aceite de girasol como una alternativa viable al aceite de argán para la mejora del comportamiento de especies con contrastada eficiencia biotecnológica. Todo ello permite proponer el uso de aceites vegetales en el proceso industrial de propagación de

## Resultados y Discusión

la biomasa, así como probablemente de otros procesos que impliquen un elevado estrés oxidativo, como estrategia del comportamiento tecnológico de las levaduras.

#### 4. Adaptación del proceso de propagación de la biomasa de levadura para la mejora de su eficiencia tecnológica

En los apartados anteriores se ha estudiado el comportamiento de distintas especies de levaduras no-*Saccharomyces* en condiciones de propagación de la biomasa a escala de laboratorio. Las condiciones de propagación de la biomasa empleadas en este trabajo simulan las empleadas en la industria y están adaptadas a la producción de *S. cerevisiae*, por lo que cabe la posibilidad de que no sean las óptimas para la producción de todas las especies no-*Saccharomyces* empleadas en este trabajo. Por ejemplo, las melazas de caña de azúcar y de remolacha son los sustratos más extendidos en las plantas de producción de levaduras, entre otros motivos por su reducido precio (Pérez-Torrado et al., 2015). Los resultados obtenidos revelaron grandes diferencias existentes en el comportamiento tecnológico entre las distintas levaduras durante el crecimiento en melazas. Resulta particularmente interesante, por su potencial de mejora, sumado a su interés enológico, el grupo de especies formado por *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola* que, como se ha visto en apartados anteriores, presentaron, todas ellas, una pobre eficiencia para metabolizar la sacarosa presente en la melaza.

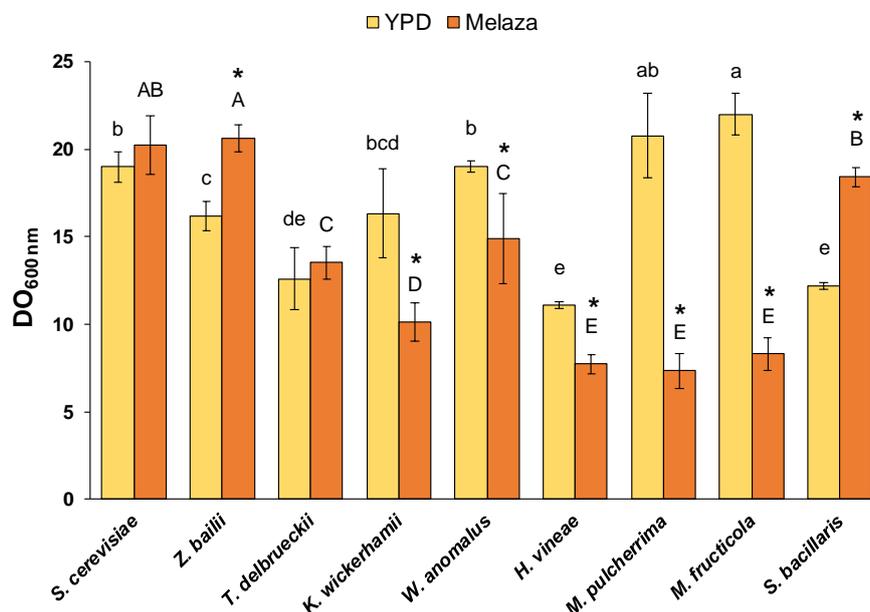
En esta sección se presentan los resultados obtenidos tras aplicar modificaciones industrialmente asequibles, basadas en la caracterización bioquímica y fisiológica descrita en secciones anteriores, sobre las condiciones de propagación de la biomasa, en concreto, sobre el medio de cultivo, así como alternativas al protocolo de deshidratación.

##### 4.1 Análisis de diferencias de crecimiento debidas a la fuente de carbono

Dado que algunas de las especies de interés presentaron un bajo rendimiento en melaza y una baja eficiencia de consumo de sacarosa, se decidió analizar el crecimiento en medio completo de laboratorio (YPD), que es el medio estándar de referencia para el crecimiento de levaduras y cuya única fuente de carbono es la glucosa al 2 %, con el fin de discernir entre deficiencias en la utilización de la sacarosa y una eficiencia menor del metabolismo glicolítico.

En la Figura R.4.1 se muestran los resultados obtenidos al analizar el crecimiento celular tras 24 horas de cultivo a 30 °C en YPD. Además, para facilitar la comparación, se incluyen los datos de crecimiento en melaza, presentados anteriormente en la Figura R.1.1.B. Recordar que la fuente de carbono en este caso es sacarosa al 6 %. Como se puede observar, existen diferencias evidentes en el crecimiento celular entre los dos

medios. Las únicas dos especies en las que el crecimiento en YPD fue similar al observado en melaza fueron el control comercial de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Se encontraron dos especies (*Z. bailii* y *S. bacillaris*) en las que el crecimiento en YPD fue menor al detectado en melaza, lo cual indica que estas especies aprovechan los nutrientes presentes en la melaza de manera más efectiva que los encontrados en YPD, y la mayor densidad celular debe reflejar la mayor cantidad de fuente de carbono. Por otro lado, especies con un pobre crecimiento en melaza, como *K. wickerhamii*, *W. anomalus*, *H. vineae*, *M. pulcherrima* o *M. fructicola* presentaron un mayor crecimiento celular en YPD, algo particularmente patente en el género *Metschnikowia*. Cabe destacar que en YPD las dos especies *Metschnikowia* fueron las que presentaron una mayor densidad celular, seguidas de *S. cerevisiae*. El mayor crecimiento observado en *K. wickerhamii* o *W. anomalus* hace que alcanzan valores de  $DO_{600}$  similares a los de la cepa comercial, mientras que *Z. bailii* y *T. delbrueckii* presentaron un crecimiento ligeramente inferior. Por último, las especies con un menor crecimiento fueron *S. bacillaris* y, a pesar de la mejora observada, *H. vineae*.



**Figura R.4.1:** Crecimiento celular ( $DO_{600}$ ) tras 24 h en medio YPD a 30 °C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies y diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

Las diferencias observadas de crecimiento entre medios podrían ser explicadas por las diferencias en la fuente de carbono principal en cada uno de los medios. Las especies en las que el crecimiento en YPD es mayor que en melaza son aquellas que presentaron niveles de actividad invertasa bajos (descrita en el apartado 1.3). Por tanto, la incapacidad de metabolizar rápidamente la sacarosa y un mejor aprovechamiento de la glucosa hacen que el crecimiento en YPD sea mayor. Por otro lado, resulta significativo que, en la mayoría de los casos, las especies en las que se detectó una elevada actividad invertasa no se vieron diferencias (*S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*) o incluso se vio un menor crecimiento en YPD (*S. bacillaris*).

#### **4.2 Adaptación del medio de propagación de biomasa mediante la hidrólisis ácida de la melaza**

Como se ha visto en el apartado anterior, la composición del medio de cultivo tiene una importancia capital en la capacidad de crecimiento de las levaduras. Por ello, se planteó la realización de tratamientos de la melaza, tecnológicamente asequibles, con el fin de mejorar la eficiencia en la producción de LSA de las especies estudiadas. En vista del pobre crecimiento de algunas especies, probablemente debido a su incapacidad para metabolizar adecuadamente la sacarosa de la melaza, se optó por llevar a cabo un tratamiento de hidrólisis de la melaza para que aquellas levaduras incapaces de metabolizar la sacarosa tuvieran disponibles sus monómeros, la glucosa y la fructosa. La sacarosa puede hidrolizarse usando ácidos, enzimas, resinas de cationes o temperaturas superiores a los 160 °C, aunque los procesos de hidrólisis industriales nunca suelen superar los 120 °C, para minimizar la degradación de la fructosa y la glucosa (Bower et al., 2008). La hidrólisis de melazas es una estrategia biotecnológica que se ha empleado, por ejemplo, en procesos de desnitrificación de aguas residuales (Quan et al., 2005) o como sustrato para la producción de bioetanol (Yan et al., 2011).

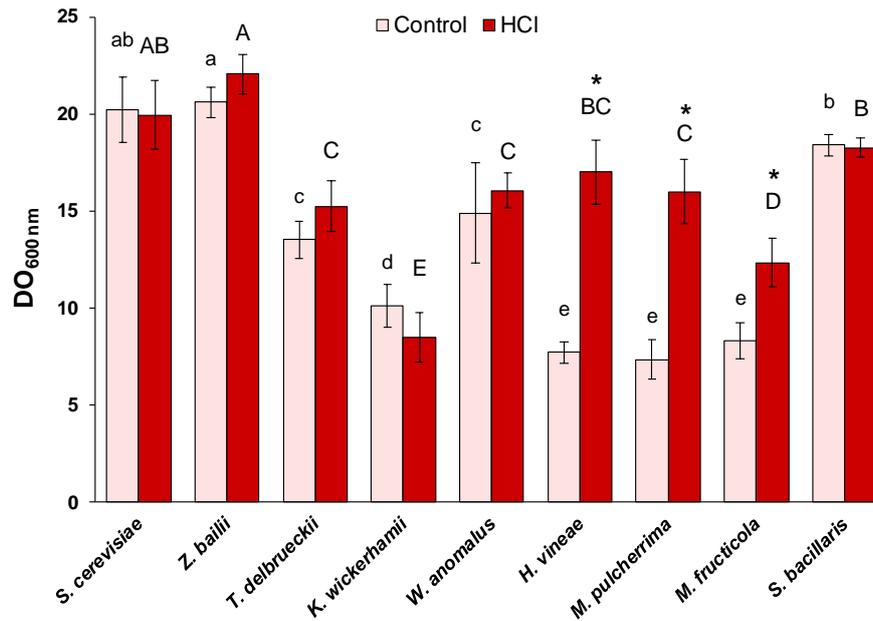
En nuestro caso, se optó por realizar hidrólisis ácida empleando ácido clorhídrico (HCl). Se ensayaron diferentes tratamientos con ácido clorhídrico a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos de incubación. En la Tabla R.4.1 se recogen los valores de sacarosa residual en la melaza tras cada uno de los tratamientos ensayados. Se seleccionó el tratamiento con HCl 1 % durante 60 min a 80 °C, por ser suficiente para hidrolizar por completo la sacarosa presente en la melaza (valor inicial = 60 g/L). Además, en este caso, se observó un aumento de la concentración de azúcares

reductores de 17.44 ( $\pm$  2.09) g/L hasta 74.96 ( $\pm$  2.06) g/L, que indicó que se liberaron glucosa y fructosa y no se produjo degradación de importancia.

**Tabla R.4.1:** Sacarosa residual (g/L) en la melaza tras tratamientos de hidrólisis con ácido clorhídrico en diferentes condiciones. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes.

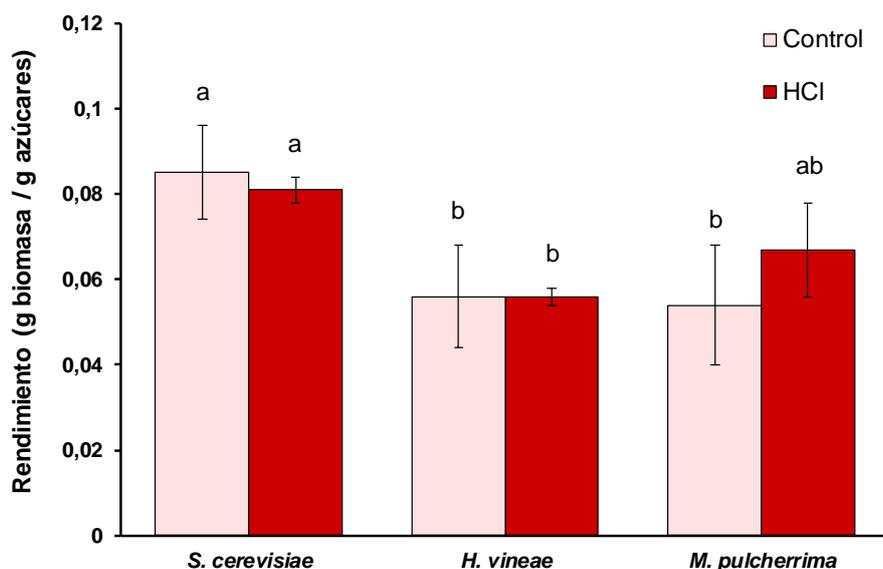
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ácido Clorhídrico		
		0.5 %	1 %	2 %
80	15	27.53 ( $\pm$ 3.51)	12.36 ( $\pm$ 2,41)	0
	30	17.27 ( $\pm$ 4.81)	4.51 ( $\pm$ 1.66)	0
	60	3.78 ( $\pm$ 1.96)	0	0
95	15	15.48 ( $\pm$ 1.76)	0	0
	30	10.96 ( $\pm$ 3.71)	0	0
	60	6.44 ( $\pm$ 0.85)	0	0

En primer lugar, se analizó el crecimiento de todas las especies no-*Saccharomyces*, así como el de la cepa comercial de *S. cerevisiae*, en melaza tratada con HCl. En la Figura R.4.2 se recogen los datos de crecimiento celular obtenidos tras 24 horas de cultivo. Como se puede ver, en la mayoría de los casos no se observaron diferencias significativas en el crecimiento celular entre los dos medios de cultivo. Sin embargo, se encontraron tres especies en las que el crecimiento en melaza hidrolizada fue significativamente mayor: *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*. Como se ha mencionado anteriormente estas tres especies presentaron valores de actividad invertasa muy bajos y fueron incapaces de metabolizar por completo la sacarosa presente en el medio tras 72 horas de cultivo (Apartado 1.3, Figura R.1.3.A). Igual que sucedió cuando se analizó el crecimiento en medio YPD, al ser cultivadas en melaza hidrolizada estas especies fueron capaces de alcanzar un crecimiento celular mucho mayor, aunque en este caso ligeramente inferior al de la cepa comercial de *S. cerevisiae* para todas ellas.



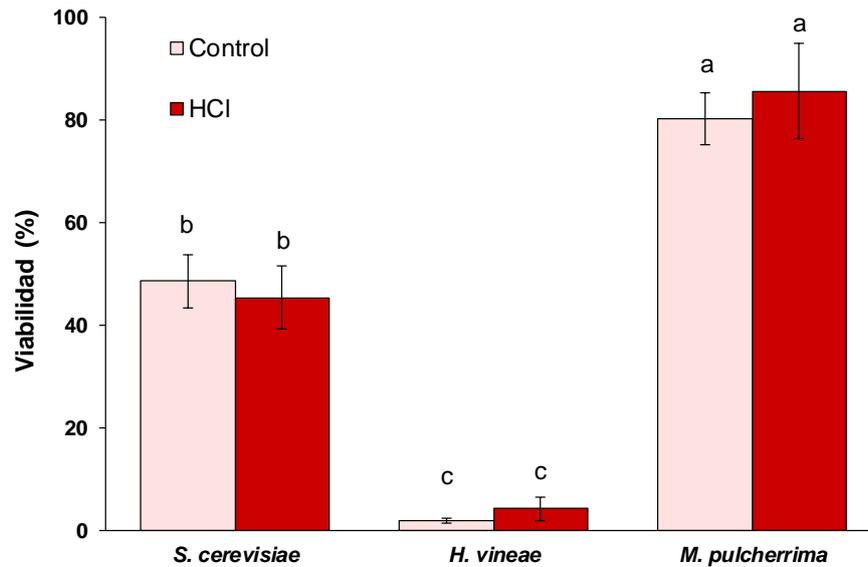
**Figura R.4.2:** Crecimiento celular ( $DO_{600}$ ) tras 24 h a 30 °C en melaza y melaza hidrolizada con HCl. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies y diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

En base a la mejora del crecimiento celular observada, se procedió a una caracterización más completa de los parámetros tecnológicos de *H. vineae* y *M. pulcherrima* en melaza hidrolizada con HCl. Se mantuvo la cepa comercial de *S. cerevisiae* como cepa de referencia. En primer lugar, se estudió el rendimiento, definido como g de biomasa producidos por g de azúcares consumidos. Como puede observarse en la Figura R.4.3 el rendimiento de las tres especies fue el mismo en melaza hidrolizada que en condiciones control, de manera que el perfil metabólico de cada cepa no se veía alterado por el tratamiento. El mayor crecimiento sin que varíe el rendimiento se explica por un mayor consumo de la fuente de carbono, a las 24 h de cultivo tan solo se detectaron 2,39 ( $\pm 0,36$ ) y 4,67 ( $\pm 0,77$ ) g/L de azúcares reductores residuales en *H. vineae* y *M. pulcherrima*, respectivamente, frente a los más de 30 g/L de sacarosa residual en la melaza control. Por lo que con este tratamiento se consiguió un mayor consumo de azúcares sin cambiar el rendimiento energético ni el metabolismo de la levadura. Por otro lado, igual que ocurría en condiciones control, en *S. cerevisiae* prácticamente no se encontraron azúcares residuales tras 24 h de cultivo y su rendimiento fue mayor que el de las otras dos especies.



**Figura R.4.3:** Rendimiento (g biomasa / g azúcares) tras 24 h de crecimiento en melaza y melaza hidrolizada a 30 °C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los parámetros más importantes a la hora de evaluar el potencial uso de las levaduras como inóculos comerciales es la viabilidad de la LSA obtenida al final del proceso de propagación. En este caso, además, este parámetro resulta de especial interés debido a los potenciales efectos negativos que podría tener el uso de ácido clorhídrico. En la Figura R.4.4 se muestran los resultados del análisis de la viabilidad de la LSA de células procedentes del cultivo en melaza hidrolizada. Además de tener un efecto positivo sobre el consumo de azúcares en las especies no-*Saccharomyces*, la hidrólisis de la melaza no tiene ningún efecto negativo sobre la viabilidad. Como ocurrió en condiciones control, la viabilidad de *S. cerevisiae* fue cercana al 50 %, mientras que la de *M. pulcherrima* fue muy superior (cerca del 90 %) y la de *H. vineae* prácticamente nula.



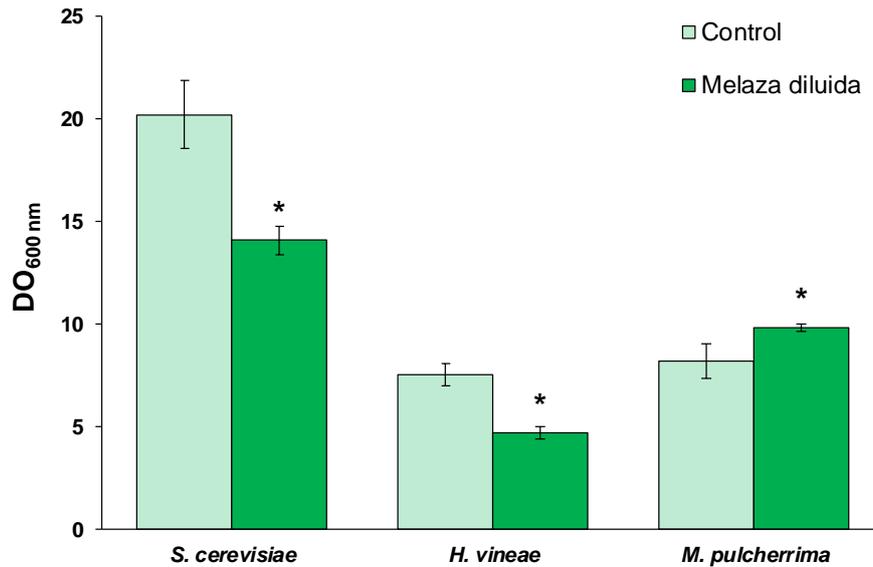
**Figura R.4.4:** Porcentaje de células viables recuperadas tras el proceso de deshidratación de células procedentes de cultivo en melaza hidrolizada. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies ( $p < 0.05$ ).

En conclusión, el cultivo en melaza hidrolizada resultó ser una estrategia prometedora para la mejora de la obtención de biomasa de aquellas especies que presentaron un crecimiento deficiente en melaza, en concreto, aquellas en las que el bajo crecimiento está asociado a un catabolismo deficiente de la sacarosa. Tras la hidrólisis ácida, estas especies disponen de glucosa y fructosa libres en el medio de cultivo, lo que se traduce en un mejor crecimiento y en una mayor cantidad de biomasa final. Además, la LSA obtenida presentó valores de viabilidad iguales a los controles, lo que indica que el tratamiento ácido de la melaza no produce efectos tóxicos perjudiciales a la levadura. En casos como el de *H. vineae*, en el que la viabilidad tras la deshidratación es extremadamente baja, esta estrategia que permite la obtención de más biomasa fresca debería complementarse con estrategias de mejora del proceso de deshidratación para conseguir una mejora real de la producción de LSA a nivel industrial. En el caso de especies con una buena viabilidad tras la deshidratación, como las del género *Metschnikowia*, la hidrólisis de la melaza es una alternativa interesante para aumentar la producción de biomasa.

#### **4.3 Adaptación del medio de propagación de biomasa mediante dilución de la melaza**

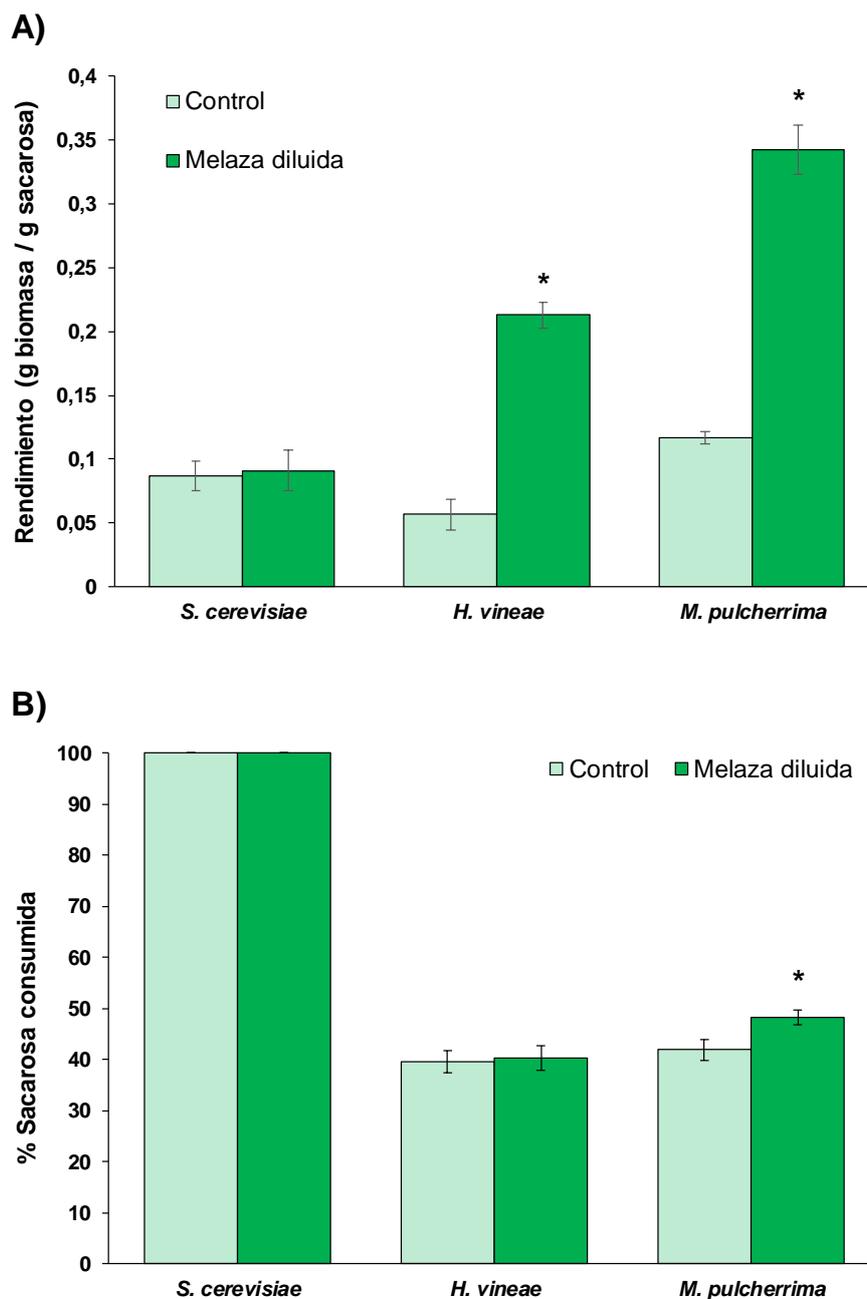
Como ya se ha mencionado, *H. vineae* y *M. pulcherrima* se caracterizan por un peor aprovechamiento de la sacarosa presente en la melaza en nuestras condiciones de trabajo a escala de laboratorio. Como se describe en el apartado 1.3, incluso tras 72 horas de cultivo se siguió observando un alto porcentaje de sacarosa residual en el medio de cultivo. Por ello, se decidió cultivar estas especies en melaza diluida hasta una concentración final de sacarosa de 20 g/L, en contraposición con la concentración habitual de 60 g/L. Con este procedimiento se pretende analizar el posible efecto negativo de alguna sustancia en la melaza susceptible de ser diluida y el efecto de una menor concentración de azúcares en el medio de cultivo. Como se especifica en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos, la melaza empleada en este apartado se preparó diluyéndola hasta 20 g/L de sacarosa y se suplementó con sales y vitaminas a las mismas concentraciones que en la melaza estándar.

En la Figura R.4.5 se recogen los datos de crecimiento celular obtenidos tras 24 horas de cultivo. Como se puede observar, el crecimiento de *S. cerevisiae* se vio reducido en la melaza diluida, como cabría esperar de la menor disponibilidad de sacarosa en el medio, aunque la disminución de crecimiento no es directamente proporcional, ya que la melaza se diluyó a un tercio y el crecimiento solo disminuye al 70 %. En *H. vineae* se observó también un menor crecimiento celular, que es bajo en condiciones control, como se ha visto en experimentos anteriores. Por otro lado, es significativo e interesante el ligero aumento del crecimiento celular detectado en *M. pulcherrima*.



**Figura R.4.5:** Crecimiento celular (DO<sub>600</sub>) tras 24 h a 30 °C en melaza y melaza diluida. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

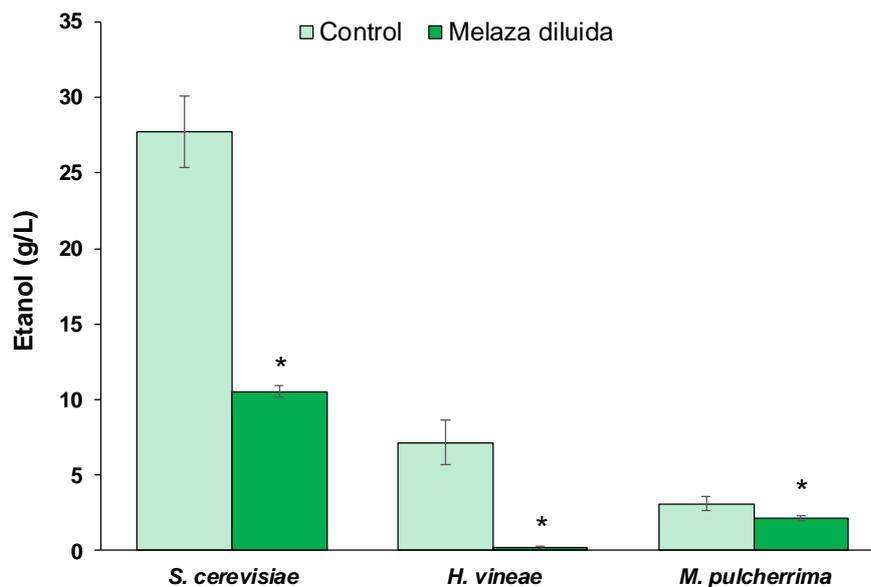
Los resultados de crecimiento celular adquieren mayor significado al expresarlos en forma de rendimiento, en gramos de biomasa producida por gramos de sacarosa consumida, para las tres especies. Se observó que, como aparece representado en la Figura R.4.6.A, el rendimiento de *S. cerevisiae* se mantuvo constante, sin embargo el rendimiento de *H. vineae* y *M. pulcherrima* en melaza diluida fue significativamente superior al de las condiciones control. Para intentar explicar este fenómeno se midió el porcentaje de sacarosa consumida en estas condiciones (Figura R.4.6.B). Como se puede observar en la figura, ninguna de las dos especies no-*Saccharomyces* consumió la sacarosa del medio por completo, de hecho, el porcentaje de sacarosa consumida fue similar en ambas condiciones, lo cual implica que consumiendo una cantidad total de sacarosa mucho más baja se produce la misma cantidad de biomasa. Este hecho podría explicarse gracias a una transición a un metabolismo respiratorio, que permita un mayor aprovechamiento energético.



**Figura R.4.6:** Aprovechamiento de la sacarosa en melaza diluida. **A)** Rendimiento (g biomasa / g sacarosa). **B)** Porcentaje de sacarosa consumida tras 24 h de cultivo a 30 °C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

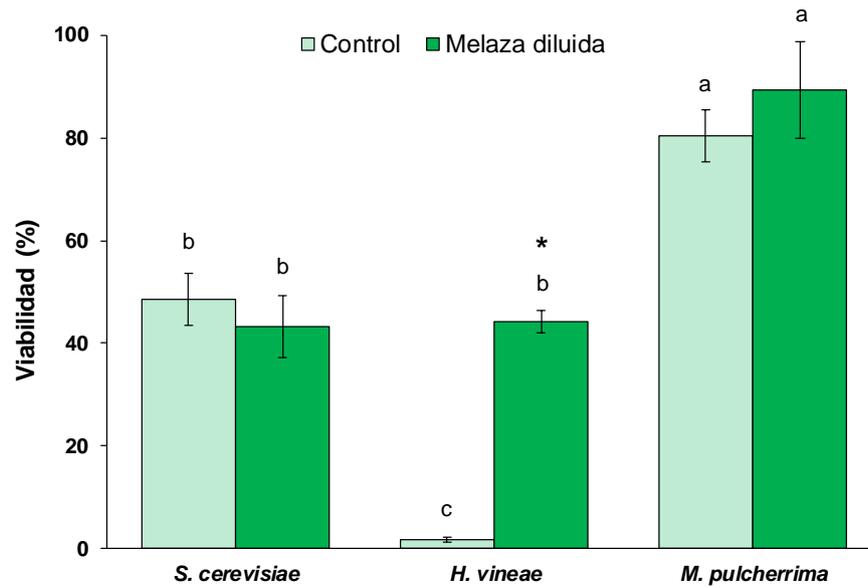
Las diferencias metabólicas entre ambas condiciones quedan patentes al estudiar la producción de etanol (Figura R.4.7). Como se puede observar, en condiciones control *S. cerevisiae* produce una elevada cantidad de etanol, que se ve reducida en la melaza diluida por la menor disponibilidad de fuente de carbono. En el caso de *H. vineae* se observa un efecto similar, en condiciones control, el metabolismo de esta especie es fermentativo, como se deduce de la producción de etanol observada, aunque esta sea significativamente menor a la de *S. cerevisiae*, probablemente por la incapacidad de metabolizar correctamente la sacarosa. En melaza diluida parece claro que *H. vineae* presenta un metabolismo respiratorio, como se deduce de la ausencia de formación de etanol y del incremento del rendimiento ya descrito. Por otro lado, el comportamiento de *M. pulcherrima* en condiciones control es prácticamente igual al descrito para *H. vineae*, pero en melaza diluida esta parece presentar un metabolismo mixto respiro-fermentativo, ya que se observa una menor producción de etanol, pero, de nuevo, el rendimiento aumenta considerablemente, lo que parece indicar que parte de la sacarosa consumida se metaboliza por vía respiratoria. En este caso, es posible que la disponibilidad de oxígeno se convierta en el factor limitante para mantener un metabolismo completamente respiratorio y cause que parte de la sacarosa consumida se metabolice por vía fermentativa.

Los mecanismos de regulación metabólica en estas especies no se conocen en profundidad, por lo que tan solo se puede especular con qué sucede a nivel molecular en *H. vineae* y *M. pulcherrima* en respuesta a la disminución de los niveles de azúcares en el medio. En *S. cerevisiae*, en respuesta a niveles bajos de glucosa, la ruta de la AMPK/SNF1 promueve, entre otras, el consumo de fuentes de carbono alternativas y la respiración (Broach, 2012; Conrad et al., 2014). Es posible que la disminución de la concentración de azúcares en la melaza empleada en estos ensayos sea detectada por las células y sea suficiente para que se produzca una reordenación del metabolismo celular que favorezca la respiración de los azúcares, lo que explicaría el aumento del rendimiento energético observado y la menor producción de etanol. Además, la baja actividad invertasa detectada en estas especies (Apartado 1.3) contribuiría a mantener niveles bajos de glucosa, que favorecerían el metabolismo respiratorio. Sería por tanto interesante investigar los mecanismos de control metabólico en función de la disponibilidad de fuente de carbono en estas especies.



**Figura R.4.7:** Niveles de etanol en melaza y melaza diluida tras 24 horas de cultivo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

Finalmente, el estudio de la viabilidad de la LSA, es decir, tras deshidratar la biomasa obtenida, reveló que el cultivo en melaza diluida no tiene ningún efecto perjudicial sobre este parámetro en *S. cerevisiae* y *M. pulcherrima* (Figura R.4.8). Por otro lado, resulta especialmente interesante el resultado obtenido en *H. vineae*. Como puede observarse, esta especie no solo no sufre efectos perjudiciales por el cultivo en melaza diluida, sino que la viabilidad de la LSA aumentó considerablemente en esas condiciones de cultivo. De hecho, la viabilidad de *H. vineae* en melaza diluida ( $44.27 \pm 7.27$  %) es comparable a la de la cepa comercial de *S. cerevisiae* en condiciones control ( $48.51 \pm 5.11$  %).



**Figura R.4.8:** Porcentaje de células viables recuperadas tras el proceso de deshidratación de células procedentes de cultivo en melaza diluida. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies. Diferencias estadísticamente significativas entre condiciones están marcadas con un asterisco (\*) ( $p < 0.05$ ).

En la Introducción, ya se ha mencionado que una práctica común en la industria para minimizar el posible efecto de los inhibidores presentes en la melaza consiste en la mezcla de diferentes lotes de melaza de distinto origen. Es posible, por tanto, que la melaza empleada tenga un efecto inhibitor específico sobre *H. vineae*, y que en la melaza diluida este efecto se vea minimizado, permitiendo así una mayor viabilidad de la LSA. Más allá del posible efecto de los inhibidores otra explicación probable es que el metabolismo respiratorio que se da en estas condiciones promueva la inducción de mecanismos de defensa antioxidantes, como por ejemplo la actividad catalasa, que ejerzan un efecto positivo sobre la capacidad de supervivencia de las células al proceso de deshidratación.

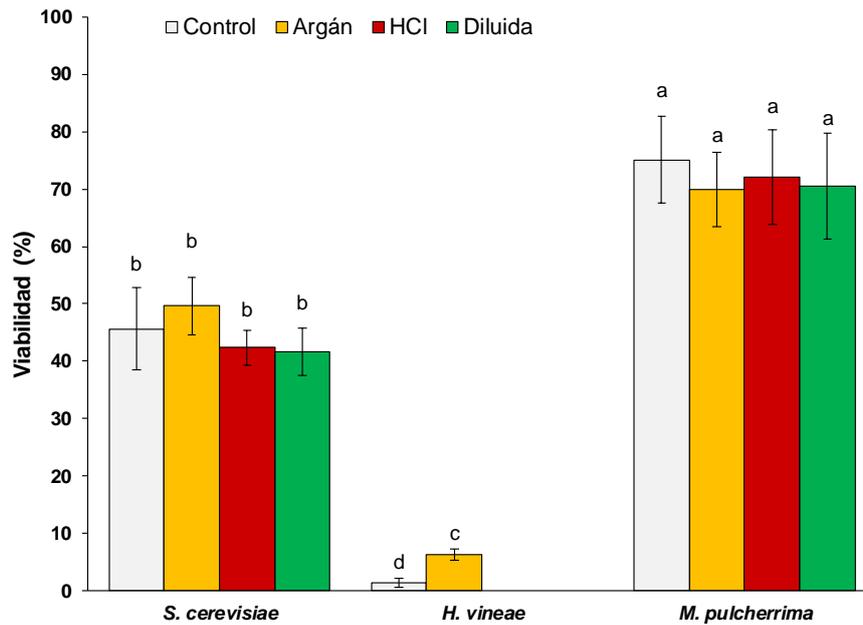
Por último, merece la pena destacar que, como ya se ha mencionado, la melaza empleada en los ensayos descritos en este apartado se preparó con vitaminas y sales a la misma concentración que en la melaza estándar, por lo que la relación carbono/nitrógeno en este caso es menor. Por ello, se analizó el efecto de la dilución de las sales y las vitaminas en la misma proporción (1/3) que la sacarosa. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros analizados entre ambos casos (datos no mostrados), por lo que parece que las diferencias

observadas entre la melaza diluida y las condiciones control son debidas a la diferente concentración de azúcares.

#### 4.4 Adaptación del proceso de deshidratación mediante *spray dryer*

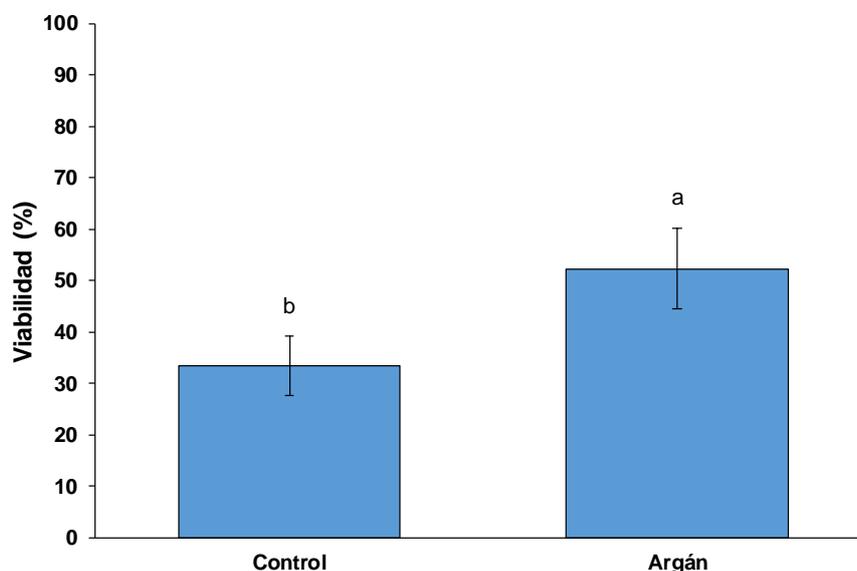
Como ya se ha mencionado, el uso de deshidratadores de lecho fluidizado es el método más extendido en la industria para la deshidratación de biomasa de levadura (Law y Mujumdar, 2006). A lo largo de este trabajo se ha empleado un deshidratador de lecho fluidizado de escala de laboratorio, que ha permitido simular las condiciones de deshidratación industriales. Sin embargo, existen numerosos trabajos en los que se han empleado otros métodos de secado sobre levaduras vínicas, como por ejemplo la liofilización (Ale et al., 2015), el secado por chorro de aire (*air-blast*; Kim et al., 2019; Lee et al., 2016) o el secado mediante pulverización (*spray dryer*; Luna-Solano et al., 2005; Romano et al., 2015). Gracias a la estancia realizada en el laboratorio de las doctoras Patrizia Romano y Angela Capece, en la Università degli Studi della Basilicata, se pudieron realizar pruebas de deshidratación mediante *spray dryer* con algunas de las especies empleadas en este trabajo. Las condiciones de deshidratación empleadas en este apartado se recogen en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos.

Los ensayos de secado mediante *spray dryer* se realizaron con las especies seleccionadas en apartados anteriores: *S. cerevisiae*, *H. vineae* y *M. pulcherrima*. Además, se analizaron cuatro condiciones de cultivo distintas en cada caso: condiciones control, cultivo en presencia de aceite de argán, en melaza hidrolizada y en melaza diluida. En la Figura R.4.9 se recogen los datos de viabilidad de la LSA obtenida en cada caso. Como se puede observar, tras la deshidratación mediante *spray dryer* se mantienen las diferencias de viabilidad observadas en el deshidratador de lecho fluidizado. La viabilidad de *M. pulcherrima* fue la más elevada, con alrededor de 70 – 75 % de células viables en las cuatro condiciones, similar a la obtenida en lecho fluidizado. En el caso de *S. cerevisiae*, la viabilidad también fue similar a la obtenida mediante lecho fluidizado y similar entre las cuatro condiciones. Por último, en *H. vineae* solo se pudo recuperar un porcentaje muy bajo de células viables en condiciones control y en biomasa tratada con aceite de argán (aproximadamente 2 y 6 %). En la biomasa cultivada en melaza hidrolizada y melaza diluida no fuimos capaces de recuperar LSA viable. Es especialmente significativo que no se consiguiera recuperar células viables en melaza diluida, teniendo en cuenta los resultados mostrados en el apartado anterior, en el que, como se ha descrito, en estas condiciones la viabilidad aumentó hasta aproximadamente un 40 %.



**Figura R.4.9:** Porcentaje de células viables recuperadas tras la deshidratación mediante *spray dryer* de células procedentes de diferentes tipos de cultivo: tratadas con aceite de argán, en melaza hidrolizada (HCl) y en melaza diluida. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas entre especies y condiciones ( $p < 0.05$ ).

Con el fin de ampliar la caracterización de la deshidratación mediante *spray dryer* de la levadura con mayores problemas en la deshidratación, se decidió realizar ensayos con biomasa de *H. vineae* cultivada en YPD. En este caso únicamente se trabajó en condiciones control y en presencia de aceite de argán. Como se puede observar en la Figura R.4.10, fuimos capaces de recuperar células viables en mayor porcentaje en ambas condiciones. Además del mayor crecimiento de *H. vineae* observado en YPD en comparación con la melaza (apartado 4.1), parece que el cultivo en este medio tiene un efecto positivo sobre la capacidad de las levaduras de hacer frente a las condiciones de deshidratación mediante *spray dryer*. Además, la viabilidad de las células cultivadas en presencia de aceite de argán ( $52.30 \pm 5.78$ ) fue superior a las células control ( $33.48 \pm 7.89$ ), probablemente debido al efecto protector del aceite de argán, descrito anteriormente.



**Figura R.4.10:** Porcentaje de células viables de *H. vineae* recuperadas tras la deshidratación mediante *spray dryer* de células procedentes de cultivo en YPD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos experimentos independientes. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En conclusión, a pesar de que las diferencias entre las condiciones de deshidratación entre ambos procesos (lecho fluidizado y *spray dryer*) son evidentes, se ha visto que, en general, la viabilidad de la LSA procedente de cultivos en melaza es similar en ambos casos. Como ya se ha mencionado, la única diferencia significativa se encontró en el caso de las células de *H. vineae* cultivadas en melaza diluida, incapaces de sobrevivir a la deshidratación mediante *spray dryer*. No obstante, los resultados presentados en este apartado resaltan la importancia de las condiciones de cultivo para la supervivencia a la etapa de deshidratación al final de la propagación de biomasa. Resultaría interesante analizar la viabilidad de la LSA de *H. vineae* cultivada en YPD y deshidratada mediante lecho fluidizado, así como realizar una caracterización bioquímica y molecular de dicha biomasa, para encontrar cambios que pudieran explicar las diferencias de comportamiento observadas. Además, como se ha mencionado con anterioridad, en esta especie el uso de coadyuvantes durante el proceso de deshidratación, como la leche en polvo o la trehalosa, podría ser una alternativa interesante para mejorar la viabilidad de la LSA obtenida.

#### 4.5 Discusión general

En esta sección se han presentado los resultados obtenidos al realizar modificaciones sobre el medio de cultivo con el fin de mejorar la producción de biomasa, modificaciones que derivan de la caracterización fisiológica y bioquímica de las levaduras no-*Saccharomyces* realizada previamente. Como cabría esperar, el crecimiento celular de las distintas especies analizadas varía en función del medio de cultivo empleado, como se ha visto al analizar el crecimiento en medio YPD cuya fuente de carbono principal (glucosa) difiere de la de la melaza (sacarosa), con las importantes consecuencias que tiene esa diferencia en la regulación metabólica. Debido al uso generalizado de la melaza en la producción industrial de biomasa de levadura decidimos realizar adaptaciones de ese medio que sean industrialmente asequibles en base a motivos tecnológicos, de escalado y de coste.

El primer tratamiento realizado fue la hidrólisis ácida de la melaza, con el fin de liberar la glucosa y fructosa de la misma. Este tratamiento resultó en un mayor crecimiento celular de aquellas especies incapaces de metabolizar por completo la sacarosa del medio, posiblemente debido a su baja actividad invertasa (Apartado 1.3, Figura R.1.4). Al analizar en profundidad la eficiencia tecnológica de *H. vineae* y *M. pulcherrima* en estas condiciones se vio un aumento del crecimiento, sin que su viabilidad se viera afectada, por lo que la hidrólisis de la melaza supondría una buena alternativa para mejorar la producción de *M. pulcherrima*, cuya viabilidad tras la deshidratación es alta. En este caso, nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Schnierda et al., (2014) en cuyo trabajo realizaron una hidrólisis enzimática de la melaza que permitió un mayor aprovechamiento de los azúcares y resultó en un mayor crecimiento de esta especie. En el caso de *H. vineae*, a pesar de la mejora en la producción de biomasa, la baja viabilidad de la LSA supondría el factor limitante a la hora de su uso como inóculo. No obstante, parece evidente que el principal factor limitante para una producción óptima de biomasa de esta especie es su pobre aprovechamiento de la sacarosa.

En vista del bajo consumo de sacarosa de estas especies, se ensayó el cultivo en melaza diluida, a una concentración de 20 g/L de sacarosa. En este caso las diferencias de crecimiento total de las dos especies de levaduras no-*Saccharomyces* fueron mínimas, lo que supuso que su rendimiento fuera mucho mayor. Este aumento del rendimiento tendría un claro impacto económico en el proceso ya que con un gasto menor de sustrato se produce la misma cantidad de biomasa. Los resultados obtenidos parecen indicar que la menor concentración de azúcares promueve cambios a nivel metabólico que favorecen un catabolismo respiratorio o mixto fermentativo-respiratorio

de la sacarosa. Esta transición metabólica explicaría el mayor rendimiento observado, así como la reducción de la producción de etanol. *S. cerevisiae* es la única especie post-WGD (*Whole Genome Duplication*, duplicación del genoma completo) de entre las analizadas (Shen et al., 2016; Wolfe y Shields, 1997). Tras la duplicación del genoma, en el ancestro de *S. cerevisiae* se produjo una pérdida de función genética de numerosos de los genes duplicados, sin embargo, se conservaron genes que codifican enzimas glicolíticas, lo que resultó en un aumento del flujo glicolítico, que favorece la fermentación de azúcares en las especies post-WGD, ya que el aumento de la concentración de piruvato favorece su flujo hacia acetaldehído mediante la piruvato descarboxilasa (Conant y Wolfe, 2007). Esto, sumado a su diferente regulación transcriptómica (Ihmels et al., 2005) explica la preferencia por un metabolismo fermentativo incluso en presencia de oxígeno. Este hecho es uno de los factores que explica la capacidad de *S. cerevisiae* de crecer de forma óptima a altas concentraciones de azúcares en el medio, mientras que otras especies presentan un crecimiento más lento. La regulación de los flujos metabólicos en las especies no-*Saccharomyces* no se conoce en profundidad, por lo que sería interesante estudiar el efecto de la concentración de sacarosa y otras fuentes de carbono sobre la regulación del metabolismo y el efecto que tiene en la producción de biomasa.

A lo largo de este trabajo se ha descrito como *H. vineae* se caracteriza por su baja viabilidad tras la deshidratación. Como se describió en apartados anteriores, el tiempo de deshidratación se adaptó a cada especie para alcanzar una LSA con una humedad final de aproximadamente el 10 %. Sin embargo, otros parámetros como la temperatura de trabajo o el flujo de aire se mantuvieron constantes en todas las especies. La optimización de estos parámetros a cada una de las especies podría llevar a mejoras considerables de la eficiencia tecnológica de la LSA obtenida, como sucede en *S. cerevisiae* (Akbari et al., 2012; Luna-Solano et al., 2005). A esto se le podría sumar el uso de coadyuvantes en el proceso de secado cuya utilidad ya se ha descrito tanto en *S. cerevisiae* como en levaduras vínicas no-*Saccharomyces* (Lee et al., 2016; Roca-Domènech et al., 2018, 2016; Romano et al., 2015). Además de las posibles mejoras derivadas de la optimización del secado, las diferencias observadas en el comportamiento de la LSA de *H. vineae* en función de las condiciones de cultivo revelan la importancia de las mismas sobre el posterior comportamiento durante la deshidratación. Se ha visto como mediante la técnica alternativa de deshidratación de *spray dryer* no fuimos capaces de recuperar prácticamente biomasa viable. Sin embargo, al cambiar las condiciones de cultivo (en melaza diluida o YPD) fuimos capaces de recuperar células con una viabilidad relativamente elevada. Es posible que

esta mejora de la viabilidad sea debida a que alguna sustancia presente en la melaza ejerza un efecto inhibitorio sobre *H. vineae*, que se ve minimizado al diluirla. No obstante, parece más probable que el metabolismo respiratorio que se da al cultivarla empleando melaza diluida, que se observa por la falta de producción de etanol en comparación con las condiciones control (Figura R.4.7), promueva la inducción de mecanismos celulares de defensa antioxidante que mejoren la capacidad de esta especie para hacer frente a las condiciones de deshidratación. Adicionalmente, la dilución puede causar un ayuno de algún nutriente que favorezca una entrada controlada en fase estacionaria que active la respuesta a estrés y mejore la tolerancia a desecación. Sin duda, sería interesante investigar los efectos que las modificaciones realizadas en esta sección ejercen sobre los parámetros bioquímicos y moleculares de respuesta a estrés descritos en apartados anteriores. Sería necesario estudiar estos mecanismos a fondo para determinar si, como ocurre en otros casos, existe una correlación entre estos y la mejor eficiencia tecnológica observada. Como se ha visto en este trabajo, la mejora resultante de tratamientos como la adición de aceites vegetales está ligada a cambios sobre los biomarcadores de estrés oxidativo. Por tanto, cabría esperar que la mejora de la viabilidad de la LSA observada aquí fuera asociada a una mejora de dichos parámetros de defensa frente a estrés oxidativo.

Más allá del papel que puedan jugar factores como la capacidad de respuesta a estrés oxidativo sobre la eficiencia tecnológica, en vista de los resultados presentados en esta sección, parece evidente que la composición del medio de cultivo ejerce una influencia capital en el posterior desempeño tecnológico de las levaduras. Las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo son aquellas que se han determinado como óptimas para el cultivo de *S. cerevisiae*. Adaptarlas a los requerimientos de cada una de las especias analizadas probablemente resultaría en cambios en su capacidad de hacer frente al proceso de deshidratación, como ya se ha visto. A pesar del uso extendido de la melaza en industria, nada garantiza que esta pueda ser usada eficientemente como medio para la producción de todo tipo de organismos. La alta osmolaridad (Scoma et al., 2017) y la presencia de compuestos tóxicos (Teclu et al., 2009) pueden tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de ciertas levaduras. Además, los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo indican que la sacarosa, en la concentración empleada para la producción de *S. cerevisiae*, no es la fuente de carbono idónea para una producción óptima de todas las levaduras no-*Saccharomyces*, ya que algunas especies presentan dificultades para metabolizarla.

Como ya se ha comentado, existen trabajos en los que se han realizado modificaciones sobre la composición de la melaza para optimizar el crecimiento de

diferentes especies no-*Saccharomyces* (Schnierda et al., 2014), y recientemente se han empleado medios sintéticos que simulan la melaza para la producción de bioetanol (Lino et al., 2018), lo cual podría ser una alternativa interesante a la hora de adaptar la composición del medio para estudiar especies con un peor comportamiento en melazas industriales. Otra alternativa sería el uso de medios de cultivo alternativos, como la pulpa de manzana proveniente de las industrias de zumos, que como la melaza es rica en azúcares y económica (Bravo et al., 2019). Además de la composición del medio, también sería interesante determinar las condiciones de cultivo óptimas para cada especie en lo que se refiere a otros parámetros como el tiempo de cultivo, la temperatura, el pH o la aireación. Los resultados presentados hasta el momento han permitido determinar que las diferencias de crecimiento que presentan las levaduras no-*Saccharomyces* dependen de múltiples factores, como la capacidad de hidrolizar la sacarosa o la ruta metabólica que siguen los azúcares en función de las condiciones de cultivo. De cualquier modo, la posibilidad de realizar estudios de carácter global a diferentes niveles, como genómico, transcriptómico o metabolómico, en condiciones de propagación de la biomasa, ayudaría a entender el comportamiento de cada una de estas especies y a tener una visión global de los requerimientos de cada una. Este conocimiento podría permitir diseñar estrategias de cultivo adaptadas a cada caso, que permitieran optimizar la eficiencia tecnológica de las levaduras para su producción a nivel industrial.

## 5. Validación de la propagación de biomasa en fermentador

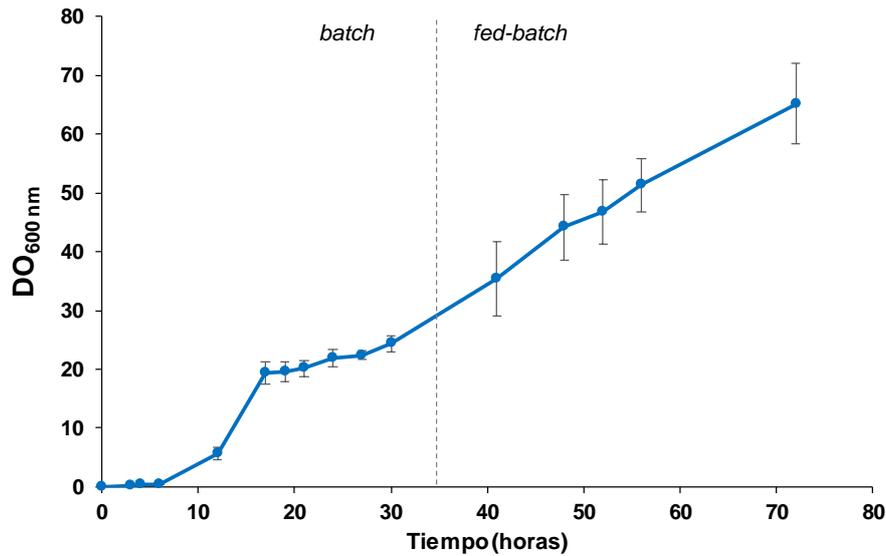
Uno de los principales objetivos de este trabajo es la caracterización del comportamiento de especies de levaduras vínicas no-*Saccharomyces* en condiciones de propagación de la biomasa que ha de ser utilizada como inóculo en la fermentación del mosto de uva. Como se ha descrito en la Introducción, el proceso industrial de producción de levaduras se realiza en grandes tanques de fermentación en diferentes etapas, empezando por un cultivo en *batch*, con todos los nutrientes presentes en el medio de cultivo desde el inicio, y una segunda fase con alimentación o *fed-batch*, en la que la concentración de azúcares se mantiene baja para minimizar el efecto *Crabtree* y maximizar el consumo de azúcares por respiración para aumentar el rendimiento energético y obtener grandes cantidades de biomasa. El protocolo de propagación a escala de laboratorio en matraz empleado en los experimentos descritos hasta este momento simplifica este proceso industrial y permite analizar múltiples cepas y condiciones en paralelo. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se ha descrito como los resultados de análisis moleculares en ensayos de simulación a escala de laboratorio se asemejan a resultados obtenidos a escala de planta piloto (Garre et al., 2010; Gómez-Pastor et al., 2010b). A pesar de sus limitaciones, la caracterización del comportamiento de las levaduras en ensayos en fermentador es necesaria para poder determinar el potencial uso de especies de levaduras vínicas no convencionales a nivel industrial. Los resultados obtenidos a escala de biorreactor ayudarán a determinar las condiciones de trabajo óptimas para poder realizar un escalado de la producción de biomasa de estas levaduras, primero a escala de planta piloto y finalmente a escala industrial. Para la simulación en biorreactor del proceso de propagación de biomasa de *S. cerevisiae* se ha diseñado un proceso simplificado que consta de las fases *batch* y *fed-batch* en el mismo tanque. Los parámetros de crecimiento, tal y como aparecen descritos en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos, fueron los previamente determinados como óptimos para el crecimiento de *S. cerevisiae* en condiciones industriales (Pérez-Torrado et al., 2005): temperatura de 30 °C, saturación de oxígeno al 20 %, pH 4.5 y agitación de 300 rpm. Estas condiciones de cultivo se aplicaron para el cultivo de las levaduras no-*Saccharomyces*, aunque debido a las diferentes características metabólicas de estas no se realizó la fase *fed-batch*. La biomasa obtenida al final del proceso de propagación se deshidrató mediante un deshidratador de lecho fluidizado siguiendo las condiciones establecidas anteriormente en este trabajo

En base a los resultados desarrollados en secciones anteriores, las simulaciones de producción de biomasa en biorreactor se han realizado con las especies *S. cerevisiae*,

*H. vineae* y *M. pulcherrima*, como representantes de comportamientos extremos de eficiencia tecnológica. Además, en los tres casos se han aplicado tratamientos que, como se ha descrito en apartados anteriores, han resultado en mejoras de la eficiencia tecnológica de estas especies en simulaciones a escala de laboratorio, como son el cultivo con aceite de argán, en melaza hidrolizada y en melaza diluida.

### 5.1 Propagación de *S. cerevisiae* a escala de biorreactor

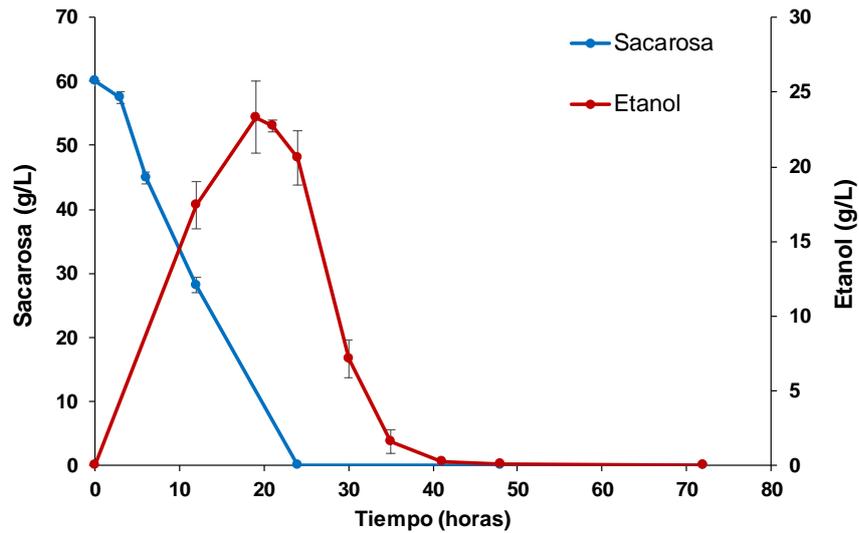
En primer lugar, se analizó el crecimiento en fermentador de la cepa comercial de *S. cerevisiae* T73, para ratificar el comportamiento previamente descrito en trabajos de nuestro laboratorio. Como puede observarse en la Figura R.5.1, durante la primera fase del crecimiento (*batch*) se alcanzaron niveles de crecimiento celular ( $DO_{600}$ ) similares a los obtenidos en condiciones de laboratorio, con una densidad óptica alrededor de 20, lo cual confirma que las simulaciones realizadas a escala de laboratorio son un buen punto de partida para estudiar el comportamiento industrial de las levaduras. Por otro lado, una vez iniciada la fase *fed-batch* (alrededor de las 35 - 40 horas) se observó un aumento constante de la densidad celular mientras se mantuvo la alimentación, alcanzándose al final del cultivo densidades celulares significativamente superiores a las observadas en la fase *batch*. Este aumento de la densidad celular durante la fase *fed-batch* resalta la importancia de la transición a esta fase en la que, gracias a que se mantiene la concentración de azúcares por debajo del umbral en el cual se produce la represión por glucosa, se consigue mantener un metabolismo respiratorio que da lugar a una oxidación completa de los monosacáridos y, por tanto, un mayor rendimiento energético que resulta en una elevada producción de biomasa.



**Figura R.5.1:** Curva de crecimiento celular ( $DO_{600}$ ) en biorreactor de *S. cerevisiae*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

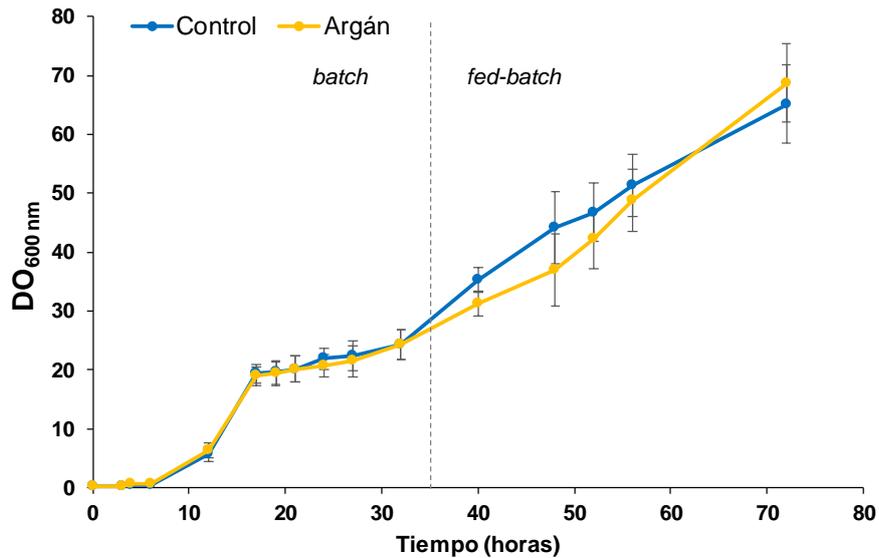
Tal y como se describió en cultivos a escala de laboratorio, *S. cerevisiae* consume rápidamente la sacarosa del medio durante la fase *batch* del crecimiento, metabolizándola por completo antes de las 24 horas de cultivo, como se puede ver en la Figura R.5.2. Durante la fase *batch*, a pesar de la aireación del biorreactor, la oxidación de los azúcares se produce mediante la vía fermentativa, con producción de etanol debido al efecto *Crabtree*. La producción de etanol alcanzó su máximo (20 – 25 g/L) en torno a las 20 horas de cultivo. Una vez se agotó la sacarosa del medio, se produjo el denominado cambio diáuxico y la levadura pasó de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio y empezó a oxidar el etanol producido, que se consumió en torno a las 35 – 40 horas de cultivo. Durante la mayor parte de la fase *fed-batch*, no se detectó producción de etanol, confirmando que el metabolismo es respiratorio.

## Resultados y Discusión



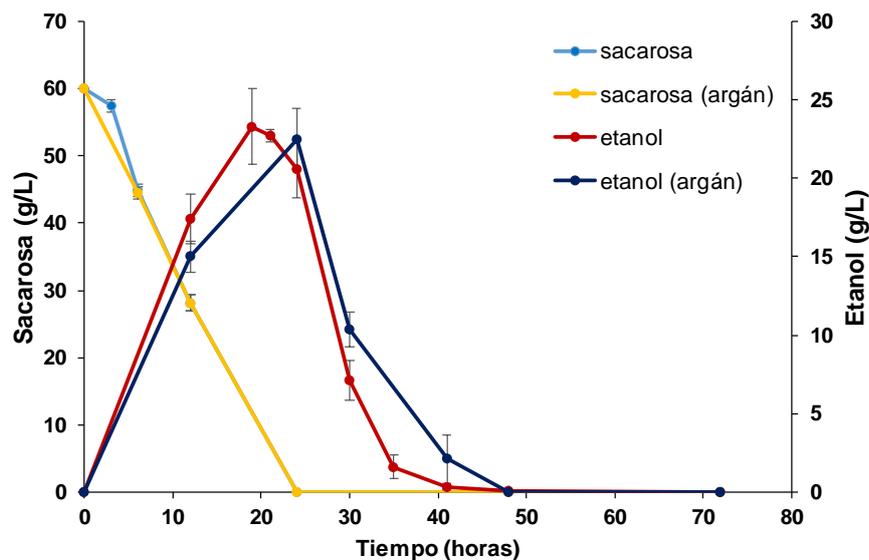
**Figura R.5.2:** Determinación del contenido de sacarosa (azul) y etanol (rojo) durante el proceso de producción de biomasa en biorreactor de *S. cerevisiae*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En base al efecto beneficioso del cultivo en presencia de aceite de argán descrito en apartados anteriores, se decidió analizar el efecto del tratamiento con este aceite en ensayos de crecimiento en biorreactor. Los resultados del cultivo en presencia de aceite de argán se recogen en la Figura R.5.3. Como se puede observar, a diferencia de lo observado en condiciones de laboratorio, no se encontraron diferencias de crecimiento estadísticamente significativas entre las células tratadas con aceite de argán y las células control.



**Figura R.5.3:** Curva de crecimiento celular ( $DO_{600}$ ) en biorreactor de *S. cerevisiae* en condiciones control (azul) y en presencia de aceite de argán (amarillo). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Como cabría esperar, el perfil de consumo de sacarosa fue prácticamente idéntico al observado en condiciones control, agotándose alrededor de las 24 horas de cultivo (Figura R.5.4). La producción de etanol también es comparable en ambas condiciones, no obstante, en células cultivadas con aceite de argán el consumo posterior de etanol una vez se ha consumido la sacarosa parece ser ligeramente más lento que en condiciones control. Es posible que la presencia de ácido oleico, que podría causar un aumento de los niveles de acetil-CoA intracelular como consecuencia de su  $\beta$ -oxidación, retrase la respiración del etanol producido, que se acaba consumiendo por completo. Igual que sucede en condiciones control, no se detectó producción de etanol durante la fase *fed-batch*, confirmando así el metabolismo respiratorio



**Figura R.5.4:** Determinación del contenido de sacarosa y etanol durante el proceso de producción de biomasa en biorreactor de *S. cerevisiae* en presencia de aceite de argán y en condiciones control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En la Tabla R.5.1 se recogen los parámetros tecnológicos (rendimiento y viabilidad celular) obtenidos al final del crecimiento en biorreactor, así como los valores obtenidos en simulaciones a escala de laboratorio, para facilitar su comparación. Como cabría esperar por el mayor rendimiento energético de la respiración, el rendimiento en biomasa, expresado como gramos de biomasa seca producida por gramos de sacarosa consumida, fue significativamente mayor tras la fase *fed-batch* que en la fase *batch* y que en condiciones de laboratorio. Cabe destacar que no se observaron diferencias de rendimiento entre los ensayos a escala de laboratorio y la fase *batch* de los ensayos en biorreactor, lo que viene a confirmar la idoneidad de nuestros ensayos a escala de laboratorio para la simulación del crecimiento industrial de *S. cerevisiae*. Por otro lado, se puede observar como la LSA obtenida al final de la fase *fed-batch* presenta una viabilidad significativamente mayor que la observada en condiciones de laboratorio y en la fase *batch*. Estos resultados estarían de acuerdo con trabajos previos de nuestro laboratorio, en los que estudios transcriptómicos confirmaron la inducción de numerosos genes de respuesta a estrés a lo largo del proceso, especialmente durante el cambio diáxico que tiene lugar cuando se agotan los azúcares en la fase *batch* (Gómez-Pastor et al., 2010a). Esta inducción, sumada a la acumulación de metabolitos de reserva a lo largo del proceso de propagación (Pérez-Torrado et al., 2009) hace que las levaduras obtenidas al final de la fase *fed-batch* estén mejor preparadas para hacer frente a la

deshidratación. No obstante, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros tecnológicos analizados entre las levaduras cultivadas en condiciones control y las cultivadas en presencia de aceite de argán. Estos resultados no coinciden con lo descrito en condiciones de laboratorio, en las que se observó que el cultivo en presencia de aceite de argán supuso un aumento del crecimiento celular, también difieren de lo observado por Gamero-Sandemtrio et al., (2019) en cuyo trabajo se observó un aumento del rendimiento en biomasa cuando las levaduras se cultivaron en presencia de aceite de argán. Aunque es posible que las diferencias en las condiciones de cultivo entre los ensayos en biorreactor y a escala de laboratorio puedan explicar que el efecto del aceite de argán sobre los parámetros tecnológicos estudiados se vea minimizado, sería interesante realizar un análisis de los biomarcadores de estrés oxidativo descritos en apartados anteriores, para determinar si se reproduce el efecto observado en ensayos a escala de laboratorio.

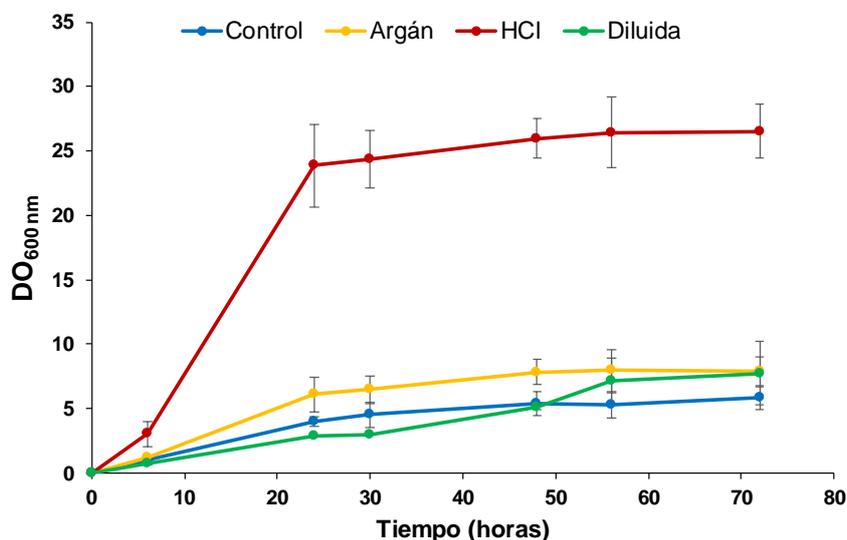
**Tabla R.5.1:** Parámetros tecnológicos del proceso de producción de *S. cerevisiae*. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre cada una de las condiciones de cultivo ( $p < 0.05$ ).

<i>S. cerevisiae</i>	Condición	Rendimiento (g biomasa / g sacarosa)	Viables tras la deshidratación (%)
Melaza	Laboratorio	0.09 ( $\pm 0.01$ ) <sup>b</sup>	48.55 ( $\pm 5.11$ ) <sup>b</sup>
	Batch	0.08 ( $\pm 0.01$ ) <sup>b</sup>	40.17 ( $\pm 4.74$ ) <sup>b</sup>
	Fed-Batch	0.14 ( $\pm 0.02$ ) <sup>a</sup>	66.76 ( $\pm 8.23$ ) <sup>a</sup>
Melaza + Aceite de argán	Laboratorio	0.09 ( $\pm 0.01$ ) <sup>b</sup>	51.5 ( $\pm 7.05$ ) <sup>ab</sup>
	Batch	0.09 ( $\pm 0.01$ ) <sup>b</sup>	42.64 ( $\pm 3.33$ ) <sup>b</sup>
	Fed-Batch	0.13 ( $\pm 0.03$ ) <sup>a</sup>	68.79 ( $\pm 4.67$ ) <sup>a</sup>

## 5.2 Propagación de *H. vineae* a escala de biorreactor

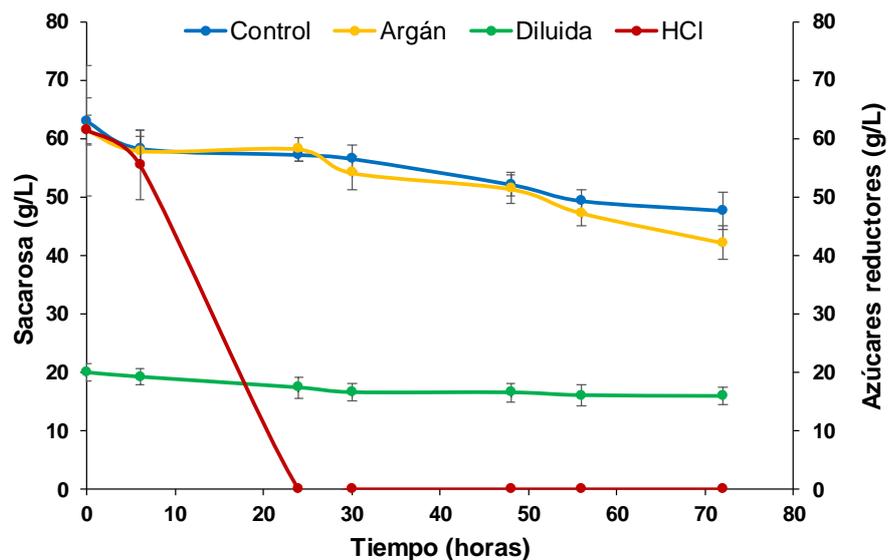
Como se ha descrito en apartados anteriores, *H. vineae* se seleccionó en base a su interés enológico y a su viabilidad extremadamente baja tras la deshidratación, sumada a su pobre crecimiento en melaza, lo que hace que sea la especie que presenta mayor margen de mejora de su comportamiento en condiciones de propagación. Por ello, además de la adición de aceite de argán se analizó el uso de melaza hidrolizada y diluida.

En la Figura R.5.5 se recogen las cinéticas de crecimiento de *H. vineae* en biorreactor en cultivo en *batch* bajo las diferentes condiciones analizadas. Como se puede observar, el crecimiento alcanzado en condiciones control, en presencia de aceite de argán y en melaza diluida fue muy bajo, sin diferencias estadísticamente significativas entre condiciones y comparable al obtenido a escala de laboratorio (apartado 1.2). Por otro lado, se observó como el crecimiento celular alcanzado en levaduras cultivadas en melaza hidrolizada fue significativamente mayor que en el resto de condiciones, igual que sucedió en ensayos a escala de laboratorio, y en este caso comparable al crecimiento alcanzado por *S. cerevisiae* en la fase *batch* de cultivo en biorreactor. Estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de que el pobre crecimiento de *H. vineae* es debido a la incapacidad de metabolizar eficientemente la sacarosa presente en la melaza.



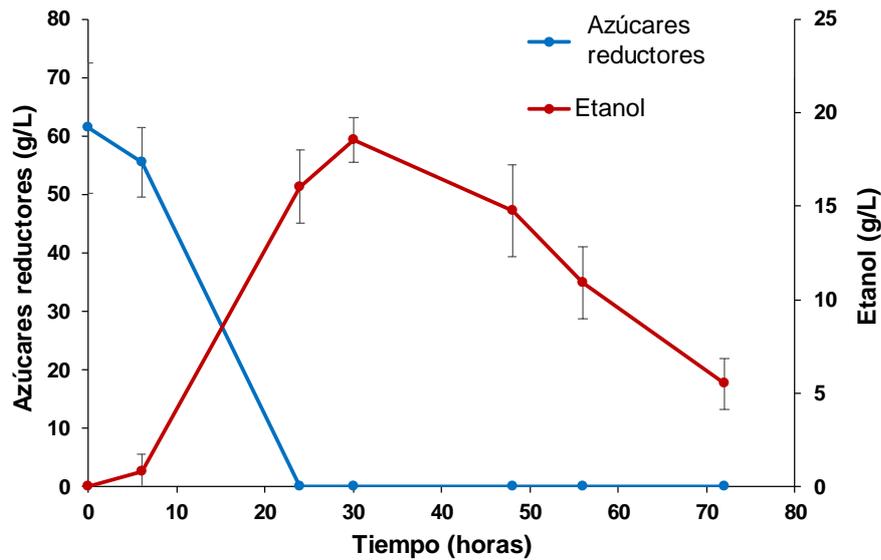
**Figura R.5.5:** Curva de crecimiento celular ( $DO_{600}$ ) en biorreactor de *H. vineae* en condiciones control (azul), con aceite de argán (amarillo), en melaza hidrolizada (rojo) y melaza diluida (verde). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos experimentos independientes.

De hecho, si se analizan los datos de consumo de azúcares, se puede ver como en células cultivadas en melaza hidrolizada los azúcares reductores se agotaron tras 24 horas de cultivo, mientras que el consumo de sacarosa en las otras tres condiciones fue muy lento y no se llegó a consumir por completo en los tiempos de cultivo analizados (Figura R.5.6). Cabe mencionar que, en estas condiciones, el consumo de sacarosa, a pesar de ser muy lento, fue constante a lo largo del tiempo, por lo que existe la posibilidad de que con suficiente tiempo de cultivo esta se agotase por completo y el crecimiento celular aumentase hasta niveles similares a los obtenidos con melaza hidrolizada. No obstante, no parece una alternativa económicamente viable debido a los largos tiempos de cultivo necesarios para alcanzar densidades celulares elevadas. Dado que la sacarosa no fue completamente consumida no se procedió al cultivo en fase de *fed-batch*.



**Figura R.5.6:** Determinación del contenido de sacarosa durante el proceso de producción de biomasa en biorreactor de *H. vineae* en condiciones control (azul), con aceite de argán (amarillo) y melaza diluida (verde). En rojo se representa el contenido de azúcares reductores en melaza hidrolizada. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos experimentos independientes.

Las diferencias a nivel metabólico entre condiciones van más allá de la tasa de consumo de sacarosa o de azúcares reductores. En las células cultivadas en melaza hidrolizada se detectó producción de etanol, algo que no se observó en el resto de condiciones. En la Figura R.5.7 se recogen las cinéticas de consumo de azúcares y producción de etanol en estas condiciones. Igual que ocurrió en *S. cerevisiae*, en los cultivos de *H. vineae* en melaza hidrolizada los niveles máximos de etanol se alcanzaron en torno a las 24 horas de cultivo, cuando ya se habían consumido por completo los azúcares del medio. Por tanto, parece evidente, que en estas condiciones de cultivo *H. vineae* está metabolizando los azúcares del medio de cultivo por la vía fermentativa, aún en condiciones aeróbicas, debido al efecto *Crabtree*. Estos resultados estarían de acuerdo con la capacidad fermentativa relativamente elevada mostrada por esta especie en mosto sintético (apartado 1.5). Sin embargo, tal y como se observa en la Figura R.5.7 el cambio de metabolismo fermentativo a oxidativo es más lento en *H. vineae* que en *S. cerevisiae* (Figura R.5.2), donde a los dos días ya no quedaba etanol. En el apartado 1.6.4 se describe que esta especie es capaz de crecer a concentraciones bajas de etanol, pero es sensible a concentraciones relativamente elevadas, lo cual explicaría, en parte, que la transición a la respiración del etanol sea más lenta y que requiera más tiempo para alcanzar la velocidad máxima de consumo de etanol. Además, en los tiempos de ensayo no se llegó a detectar el consumo completo del etanol producido. En las otras condiciones de cultivo, es posible que la ausencia de formación de etanol sea debida a la baja actividad invertasa de esta especie, que causa que los niveles de glucosa intracelular se mantengan lo suficientemente bajos como para no sobrepasar el umbral a partir del cual se produce el efecto *Crabtree*, de modo que el piruvato se metabolice mediante la piruvato deshidrogenasa y entre al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y no mediante la piruvato descarboxilasa.



**Figura R.5.7:** Determinación del contenido de azúcares reductores (azul) y etanol (rojo) durante el proceso de producción de biomasa en biorreactor de *H. vineae* cultivada en melaza hidrolizada. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos experimentos independientes.

El estudio del rendimiento de la biomasa producida (Tabla R.5.2), entre 0.08 – 0.09 gramos de biomasa seca por gramo de sacarosa consumida, reveló que no existen diferencias en este parámetro entre las muestras control, las crecidas con aceite de argán y las crecidas en melaza hidrolizada. Sin embargo, como ya se observó en ensayos a escala de laboratorio, el rendimiento de las muestras cultivadas en melaza diluida fue mucho mayor. Como ya se ha mencionado, es posible que en estas condiciones la menor concentración de azúcares en el medio de cultivo promueva una regulación del metabolismo que favorezca un consumo más eficiente de la fuente de carbono. Por otro lado, destaca la elevada viabilidad de la LSA procedente de cultivos en biorreactor, que en todas las condiciones de cultivo fue significativamente superior a la observada en ensayos a escala de laboratorio, y cercana a la de la cepa comercial de *S. cerevisiae* empleada en este trabajo. Ya se ha mencionado que a lo largo del proceso de propagación se inducen genes de respuesta a estrés y de producción de metabolitos de reserva que tienen un papel importante en la tolerancia a la deshidratación. Por tanto, el mayor tiempo de cultivo en biorreactor frente a los ensayos en matraz podría ser una posible explicación a las diferencias de viabilidad observadas. Además, una de las principales diferencias con los ensayos a escala de laboratorio es la aireación controlada del medio, que no solo se realiza para promover la respiración de los azúcares, si no que permite a las células producir ergosterol (Dimster-Denk y Rine, 1996), cuya importancia sobre la fluidez de membrana y la supervivencia a condiciones de estrés ya

ha sido resaltada anteriormente y que podría ayudar a explicar las diferencias de viabilidad de la LSA entre ambas condiciones.

**Tabla R.5.2:** Parámetros tecnológicos del proceso de producción de *H. vineae*. Se compara el crecimiento en matraz en condiciones de laboratorio con el crecimiento en *batch* en fermentador. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de dos experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ).

<i>H. vineae</i>	Condición	Rendimiento (g biomasa / g sacarosa)	Viables tras la deshidratación (%)
Melaza	Laboratorio	0.06 ( $\pm 0.01$ ) <sup>c</sup>	1.83 ( $\pm 0.51$ ) <sup>d</sup>
	Batch	0.08 ( $\pm 0.02$ ) <sup>c</sup>	43.25 ( $\pm 10.99$ ) <sup>ab</sup>
Melaza + Aceite de argán	Laboratorio	0.07 ( $\pm 0.02$ ) <sup>c</sup>	13.11 ( $\pm 1.14$ ) <sup>c</sup>
	Batch	0.08 ( $\pm 0.01$ ) <sup>c</sup>	42.93 ( $\pm 7.02$ ) <sup>ab</sup>
Melaza + HCl	Laboratorio	0.06 ( $\pm 0.01$ ) <sup>c</sup>	4.16 ( $\pm 2.19$ ) <sup>d</sup>
	Batch	0.09 ( $\pm 0.02$ ) <sup>c</sup>	36.81 ( $\pm 1.33$ ) <sup>b</sup>
Melaza diluida (20 g/L)	Laboratorio	0.21 ( $\pm 0.01$ ) <sup>b</sup>	44.27 ( $\pm 7.27$ ) <sup>ab</sup>
	Batch	0.57 ( $\pm 0.08$ ) <sup>a</sup>	53.54 ( $\pm 8.52$ ) <sup>a</sup>

En conclusión, la propagación de biomasa de *H. vineae* en biorreactor presenta ciertas similitudes con el cultivo a escala de laboratorio, en especial en lo que se refiere al crecimiento celular y el rendimiento al final del proceso. Como se ha podido determinar, el crecimiento de esta especie en biorreactor fue muy pobre en aquellas condiciones en las que la sacarosa fue la principal fuente de carbono del medio de cultivo, debido a la baja tasa de consumo de este disacárido, por su pobre actividad invertasa. Sin embargo, se ha visto como el crecimiento mejoró en melaza hidrolizada, una mejora que fue acompañada de la mayor viabilidad de la LSA observado en ensayos en biorreactor, aunque en el caso de la biomasa cultivada en melaza hidrolizada la viabilidad fue la más baja entre las cuatro condiciones ensayadas. Debido al comportamiento observado en condiciones control, en este trabajo no se realizó cultivo de *H. vineae* con alimentación, sin embargo, sería interesante incorporar la fase *fed-batch* cuando el crecimiento se realiza en melaza hidrolizada. El comportamiento observado en estas condiciones se asemeja al de *S. cerevisiae*, con una primera fase fermentativa y una posterior transición a metabolismo respiratorio para metabolizar el etanol producido. Seguramente esto ayudaría a aumentar la producción y el rendimiento de biomasa de *H. vineae* en biorreactor. La viabilidad tras la deshidratación es

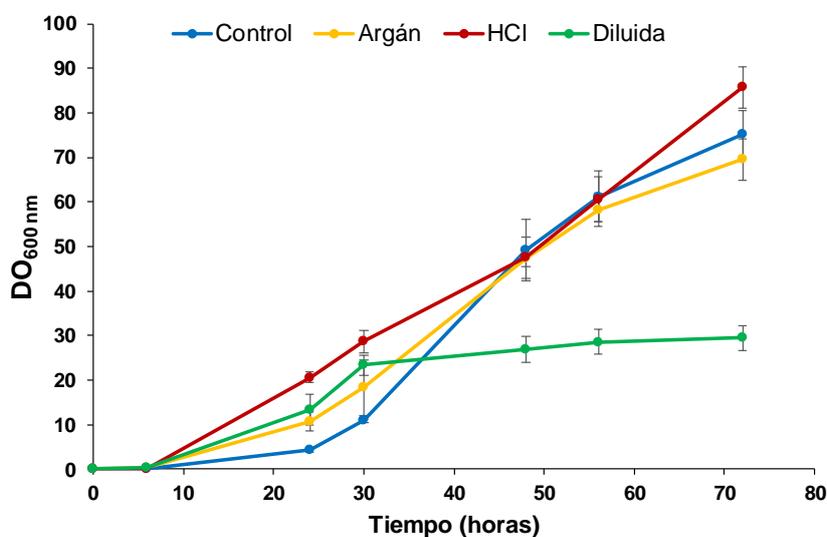
consistentemente mayor en el crecimiento en fermentador, lo que supone una mejora tecnológica evidente. En cualquier caso, en base a los resultados obtenidos en este trabajo parece evidente que la melaza no es el medio de cultivo idóneo para la producción de biomasa de *H. vineae* a nivel industrial, ya que se produce en mayor cantidad cuando la fuente principal de carbono son monosacáridos libres (glucosa y fructosa). No obstante, cabe la posibilidad de explorar otras cepas de esta misma especie para tratar de encontrar alguna con una elevada actividad invertasa, lo que solventaría el principal impedimento para la propagación de esta especie en melaza.

### 5.3 Propagación de *M. pulcherrima* a escala de biorreactor

Como se ha descrito en apartados anteriores, en ensayos a escala de laboratorio *M. pulcherrima* mostró un comportamiento óptimo tras la deshidratación. No obstante, existen posibilidades de mejora en la eficiencia tecnológica de esta especie, ya que el crecimiento celular en dichos ensayos de propagación de biomasa fue significativamente inferior al de *S. cerevisiae*, debido a un consumo incompleto de la sacarosa del medio de cultivo, como sucedió con *H. vineae*.

El crecimiento celular de *M. pulcherrima* en biorreactor difiere considerablemente del observado en condiciones de laboratorio. Cuando se empleó melaza control como medio de cultivo, el crecimiento en biorreactor presenta una fase *lag* de crecimiento que dura aproximadamente 24 horas, tras la cual se produce un crecimiento exponencial (Figura R.5.8). Al final del proceso de propagación en *batch* en biorreactor *M. pulcherrima* alcanzó niveles de crecimiento celular muy elevados, similares a los alcanzados por la cepa comercial de *S. cerevisiae* tras la fase *fed-batch*. Igual que en el caso de *H. vineae*, en esta especie también se aplicaron aquellos tratamientos que habían resultado beneficiosos en ensayos a escala de laboratorio. El cultivo en presencia de aceite de argán resultó en una reducción de la duración de la fase *lag*, que fue todavía más notable en células cultivadas en melaza hidrolizada. Aunque, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento alcanzado entre estas y las condiciones control al final del proceso. En células cultivadas en melaza diluida, el crecimiento alcanzado al final del proceso fue significativamente menor que en el resto de condiciones, como cabría esperar por la menor disponibilidad de fuente de carbono, aunque la fase de latencia es más corta, probablemente debido a que la menor concentración de fuente de carbono en el medio promueve una regulación diferente del metabolismo que favorece un consumo más rápido de los azúcares. Aunque las diferencias de crecimiento celular observadas entre los ensayos de

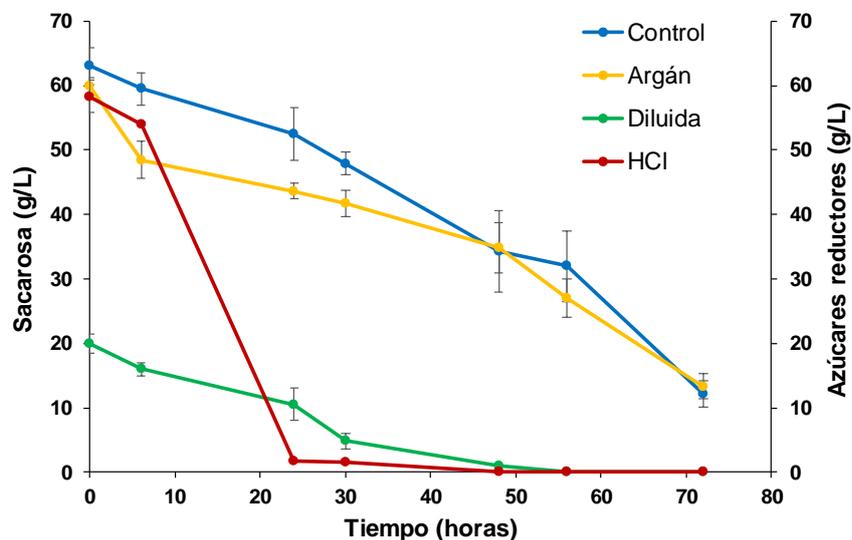
propagación en biorreactor y los ensayos a escala de laboratorio son significativas, hay numerosos factores que podrían explicarlas. En primer lugar, el tiempo de cultivo no es el mismo (24 frente a 72 horas), y el crecimiento en biorreactor a las 24 horas es comparable. Otro factor a tener en cuenta es el mayor control del que se dispone sobre los parámetros de fermentación en el biorreactor, por ejemplo, la mayor disponibilidad de oxígeno gracias a la aireación controlada del medio, hace que el oxígeno disuelto en el medio de cultivo no se convierta en un factor limitante para que se pueda mantener el metabolismo respiratorio de esta especie durante todo el proceso de propagación.



**Figura R.5.8:** Curva de crecimiento celular ( $DO_{600}$ ) en biorreactor de *M. pulcherrima* en condiciones control (azul), con aceite de argán (amarillo), en melaza hidrolizada (rojo) y melaza diluida (verde). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos experimentos independientes.

La determinación de metabolitos extracelulares reveló que *M. pulcherrima* no produjo etanol en ninguna de las condiciones ensayadas (datos no mostrados), lo cual estaría de acuerdo con el ya mencionado carácter *Crabtree* negativo de esta especie (Schnierda et al., 2014). Esta característica metabólica hace que sea innecesaria la transición a la fase *fed-batch*, ya que desde el inicio del proceso tiene lugar el consumo de los azúcares por vía respiratoria. En la Figura R.5.9 se representan las cinéticas de consumo de sacarosa en las cuatro condiciones estudiadas. Como se puede observar, en condiciones control y en presencia de aceite de argán se produce un descenso constante de los niveles de sacarosa con el tiempo. Las muestras con aceite de argán presentaron una caída inicial más pronunciada, que correlaciona con la reducción de la

fase *lag* observada en estas. Como se puede observar, en los tiempos de cultivo analizados no se consume por completo la sacarosa. Por tanto, con el fin de maximizar la producción de biomasa de *M. pulcherrima* sería necesario adaptar el tiempo de cultivo, para asegurar el consumo total de la sacarosa y que además permitiese una fase de maduración en la que se induzca la acumulación de metabolitos de reserva y la expresión de genes de respuesta a estrés, para mejorar la eficiencia tecnológica de esta especie. Por otro lado, la tasa de consumo de la sacarosa presente en la melaza diluida fue similar a la observada en las muestras control y con aceite de argán, salvo que en este caso sí que se llegó a agotar la sacarosa, en torno a las 55 horas de cultivo, debido a los menores niveles iniciales de la misma. Por último, cuando las levaduras se cultivaron en melaza hidrolizada el consumo de los azúcares fue más rápido, agotándose en torno a las 24-30 horas. Las diferencias en la tasa de consumo de azúcares entre las muestras cultivadas en melaza hidrolizada y el resto quedarían explicadas por la baja actividad invertasa que se ha observado en esta especie (Apartado 1.3) (Chua et al., 2018; Lu et al., 2016). Aunque el tratamiento de hidrólisis ácida de la melaza no parece ser estrictamente necesario para que se consuman por completo los azúcares del medio y se produzcan grandes cantidades de biomasa, sí que podría resultar útil para reducir los tiempos de cultivo.



**Figura R.5.9:** Determinación del contenido de sacarosa durante el proceso de producción de biomasa en biorreactor de *M. pulcherrima* en condiciones control (azul), con aceite de argán (amarillo) y melaza diluida (verde). En rojo se representa el contenido de azúcares reductores en melaza hidrolizada. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos experimentos independientes.

Como se ha mencionado anteriormente, *M. pulcherrima* fue una de las especies estudiadas con mejor comportamiento tras la deshidratación, en base a su elevada viabilidad. En la Tabla R.5.3 se recogen los resultados de los valores de viabilidad y rendimiento obtenidos al final del proceso de propagación en biorreactor bajo las distintas condiciones ensayadas. Igual que se observó en ensayos a escala de laboratorio, la LSA obtenida presentó valores muy elevados de viabilidad en las cuatro condiciones analizadas, sin diferencias significativas entre ellas. Un resultado que corrobora los datos obtenidos a escala de laboratorio y que confirma la gran capacidad de esta especie para hacer frente a las condiciones adversas a las que se ven sometidas las células durante el proceso de deshidratación. Además, el cultivo en biorreactor, comparado con las condiciones de laboratorio, resultó en un mayor rendimiento en las células cultivadas en condiciones control, en presencia de aceite de argán y en melaza hidrolizada, no así en las fermentaciones con melaza diluida. Este hecho se explica por el ya mencionado metabolismo respiratorio. En comparación con las condiciones control, el rendimiento fue ligeramente menor tras la aplicación de aceite de argán y la hidrólisis de la melaza, sin una mejora en la viabilidad, con lo cual estas intervenciones no supondrían una mejora tecnológica para la producción de esta especie. En ensayos a escala de laboratorio la falta de aireación del medio de cultivo estaría haciendo que la concentración de oxígeno disuelto se convierta en un factor limitante para el metabolismo de azúcares por vía respiratoria, obligando a las células a realizar una oxidación incompleta de los azúcares por la vía fermentativa, menos eficiente energéticamente. En melaza diluida, debido al elevado rendimiento detectado en condiciones de laboratorio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla R.5.3:** Parámetros tecnológicos del proceso de producción de *M. pulcherrima*. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de dos experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ).

<i>M. pulcherrima</i>	Condición	Rendimiento (g biomasa / g sacarosa)	Viables tras la deshidratación (%)
Melaza	Laboratorio	0.05 ( $\pm 0.01$ ) <sup>c</sup>	80.29 ( $\pm 5.07$ ) <sup>a</sup>
	Batch	0.33 ( $\pm 0.04$ ) <sup>ab</sup>	85.85 ( $\pm 2.94$ ) <sup>a</sup>
Melaza + Aceite de argán	Laboratorio	0.06 ( $\pm 0.01$ ) <sup>c</sup>	79.97 ( $\pm 4.98$ ) <sup>a</sup>
	Batch	0.28 ( $\pm 0.02$ ) <sup>ab</sup>	81.39 ( $\pm 4.84$ ) <sup>a</sup>
Melaza + HCl	Laboratorio	0.07 ( $\pm 0.02$ ) <sup>c</sup>	85.65 ( $\pm 9.36$ ) <sup>a</sup>
	Batch	0.23 ( $\pm 0.04$ ) <sup>b</sup>	90.11 ( $\pm 5.36$ ) <sup>a</sup>
Melaza diluida (20 g /L)	Laboratorio	0.34 ( $\pm 0.02$ ) <sup>a</sup>	89.32 ( $\pm 1.98$ ) <sup>a</sup>
	Batch	0.41 ( $\pm 0.05$ ) <sup>a</sup>	92.27 ( $\pm 7.86$ ) <sup>a</sup>

#### 5.4 Discusión general

En esta sección se ha descrito el análisis del cultivo de las especies de interés seleccionadas en ensayos de propagación de biomasa en biorreactor. Para dichos ensayos se emplearon unas condiciones de cultivo que en trabajos anteriores se determinaron como óptimas para el cultivo de *S. cerevisiae* en (Pérez-Torrado et al., 2005). Efectivamente, las condiciones empleadas resultaron idóneas para el crecimiento de la cepa comercial de *S. cerevisiae* empleada en este trabajo, una comprobación que fue imprescindible debido al cambio de equipo de trabajo respecto a trabajos anteriores de nuestro laboratorio. A diferencia de los ensayos a escala de laboratorio, el trabajo con biorreactor permite la transición a la fase *fed-batch* de crecimiento tras el consumo completo de la sacarosa y el posterior cambio diáuxico en la primera fase de crecimiento en *batch*. En la fase *fed-batch* el rendimiento de la biomasa obtenida para *S. cerevisiae* fue mucho mayor, gracias al metabolismo respiratorio que presentan las células, y la viabilidad de la LSA obtenida al final del proceso fue significativamente mayor, gracias a la adaptación a condiciones de estrés que sufren las células a lo largo de la propagación, promovida por la inducción de genes de respuesta a estrés y la acumulación de metabolitos protectores. Aunque la propagación en biorreactor supuso una mejora evidente de los parámetros tecnológicos estudiados, sería de gran interés realizar un análisis completo de los parámetros bioquímicos de defensa frente a estrés oxidativo que se han descrito a lo largo de este trabajo, para trazar una relación completa entre estos y la mejora observada en los ensayos de propagación en biorreactor.

Por otro lado, el cultivo de las dos especies no-*Saccharomyces* seleccionadas acabó de confirmar las grandes diferencias metabólicas existentes respecto a la cepa de referencia, como se ha observado a lo largo de todo este trabajo. En primer lugar, el cultivo de *H. vineae* en biorreactor confirmó que el mayor impedimento para una buena producción de esta especie es su incapacidad para metabolizar eficientemente la sacarosa de la melaza. Este hecho queda patente al analizar la baja producción de biomasa en aquellas condiciones de cultivo en las que la sacarosa es la principal fuente de carbono. Comparable a la obtenida en los respectivos ensayos a escala de laboratorio. No obstante, cuando se cultivó empleando melaza hidrolizada, el crecimiento celular fue elevado, a niveles similares a los de *S. cerevisiae* en la fase *batch*. De hecho, el comportamiento de *H. vineae* en melaza hidrolizada es muy similar al de *S. cerevisiae*, con una fermentación inicial de los azúcares, seguida de un cambio a metabolismo respiratorio para respirar el etanol producido, un comportamiento muy parecido al que muestra *H. uvarum* en cultivos en *batch* en biorreactor (Escalante et al., 2011). No obstante, debido a los tiempos de trabajo empleados no se llegó a detectar la respiración completa del etanol producido, sería necesario aumentar los tiempos de cultivo, para asegurar su consumo completo y poder realizar la transición a la fase *fed-batch*, que permitiría maximizar la producción de biomasa. En la sección anterior se describe como a escala de laboratorio el cultivo de *H. vineae* en melaza diluida, resulta en una transición a metabolismo respiratorio, que supone un aumento del rendimiento y que, seguramente, afecta al aumento de la viabilidad observado. Estos cambios se mantuvieron en ensayos a escala de biorreactor, no obstante, lo más significativo es el aumento de viabilidad en las cuatro condiciones de cultivo diferentes a escala de biorreactor respecto a los ensayos a escala de laboratorio. Es posible que las diferentes condiciones de cultivo, como por ejemplo la aireación controlada del medio, promuevan la activación de mecanismos de respuesta a estrés que promuevan este aumento de la viabilidad. Sería necesario analizar en profundidad los parámetros redox que se han estudiado en secciones anteriores de este trabajo, para determinar si existe una relación entre la mejora tecnológica observada y modificaciones en estos.

En segundo lugar, los ensayos realizados con *M. pulcherrima* han revelado que, debido a sus características metabólicas, con un consumo de azúcares que es principalmente por vía respiratoria, el comportamiento en biorreactor difiere considerablemente del de *S. cerevisiae* y *H. vineae*. No obstante, a pesar de las diferencias metabólicas, se ha observado como *M. pulcherrima* es capaz de crecer sin problemas a escala de biorreactor. A diferencia de lo que se observó a escala de laboratorio (bajo crecimiento por el consumo lento e incompleto de la sacarosa), en el

biorreactor, tras una fase *lag* prolongada, se produce el consumo de azúcares por respiración, y a tiempos de cultivo largos, se llegan a alcanzar valores de crecimiento celular similares a los de *S. cerevisiae* tras la fase *fed-batch*. Parece, por tanto, que el principal factor limitante que determinaba el bajo crecimiento de esta especie a escala de laboratorio era la disponibilidad de oxígeno. La falta de una aireación adecuada del medio de cultivo en ensayos en matraz no permite un correcto metabolismo respiratorio y un consumo completo de la sacarosa, algo que parece solventarse en los ensayos en biorreactor. Debido a nuestras condiciones de ensayo, no se alcanzó a ver el consumo completo de la sacarosa del medio, por lo que el crecimiento celular podría ser mayor si se realizasen ensayos con tiempos de cultivo más largos, en los que se permitiese la respiración completa de los azúcares y una posterior fase de maduración. Además, la viabilidad de la LSA obtenido siguió siendo muy elevada. En el caso de *M. pulcherrima*, con el tratamiento con aceite de argán no se observó ningún efecto sobre la cantidad de biomasa final, aunque sí que hubo una leve reducción de la fase *lag* inicial, como ocurrió con el cultivo en melaza hidrolizada. Este tratamiento fue, además, el más prometedor de los ensayados, ya que permitió un consumo más rápido de los azúcares, que podría permitir una reducción de los tiempos de cultivo, sin que la producción de biomasa y su viabilidad se vieran afectadas. Como ocurre en el caso de *S. cerevisiae*, en ensayos de biorreactor la dilución de la melaza tiene un efecto indeseado, una menor producción de biomasa. La principal ventaja de esta estrategia a escala de laboratorio es que la reducción de la concentración de azúcares parece promover una reordenación metabólica que favorece la respiración. Como ya se ha mencionado, en estas condiciones, la disponibilidad de oxígeno permite mantener un metabolismo respiratorio en todas las condiciones ensayadas, por lo que el rendimiento fue comparable entre condiciones.

De los resultados obtenidos en los ensayos de propagación en biorreactor se extraen, por tanto, dos conclusiones principales: la necesidad de adaptar el medio de cultivo a las características metabólicas de cada especie y la necesidad de adaptar las condiciones de cultivo a los requerimientos de cada especie, ya que las condiciones de cultivo aplicadas para *S. cerevisiae* no son necesariamente las óptimas para el cultivo de especies de levaduras no-*Saccharomyces*. La adecuación del medio de cultivo, mediante modificaciones sencillas, baratas y tecnológicamente viables, y la adaptación de las condiciones de cultivo a los requerimientos individuales de cada especie permite maximizar la producción de biomasa en un estado fisiológico adecuado para ser empleada como inóculos. Las grandes diferencias de comportamiento observadas en biorreactor, como la mayor viabilidad de *H. vineae*, seguramente estén fundamentadas

## Resultados y Discusión

en cambios a nivel bioquímico y molecular causados por las diferentes condiciones de cultivo. Por ello, sería interesante realizar una caracterización de los biomarcadores de estrés oxidativo descritos a lo largo de este trabajo en biomasa procedente de las diferentes etapas del proceso de propagación de biomasa en biorreactor y en la LSA obtenida.

## 6. Vinificaciones mixtas con Levadura Seca Activa en mosto natural

Como ya se ha mencionado en la Introducción, con el fin de producir vinos con perfiles organolépticos más complejos, en los últimos años se ha recurrido a fermentaciones en las que levaduras no-*Saccharomyces* han sido inoculadas. Ya que la mayoría de especies de levaduras no convencionales son incapaces de completar la fermentación alcohólica, al menos en tiempos económicamente razonables, numerosos estudios han explorado el uso de inóculos no-*Saccharomyces* en conjunto con cepas de *S. cerevisiae*, ya sea en fermentaciones conjuntas o secuenciales (Morata, 2019; Varela, 2016).

Una vez caracterizado el comportamiento de diferentes especies en ensayos de propagación de biomasa a escala de biorreactor se decidió realizar experimentos de vinificación con mosto natural, para determinar el comportamiento fermentativo de la LSA obtenida en las distintas condiciones descritas. Todos los ensayos de vinificación y de análisis de los vinos presentados en esta sección se llevaron a cabo durante una estancia realizada en el laboratorio de las doctoras Patrizia Romano y Angela Capece en la Università degli Studi della Basilicata, Potenza. Para los ensayos de vinificación en mosto natural se utilizaron las dos especies seleccionadas en apartados anteriores, por su interés en la industria enológica y sus comportamientos tecnológicos dispares: *H. vineae* y *M. pulcherrima*. Se realizaron fermentaciones mixtas de ambas especies con *S. cerevisiae* mediante co-inoculación, adoptando el protocolo de trabajo empleado en el laboratorio receptor. En base a los resultados obtenidos en ensayos de propagación de biomasa se decidió analizar el posible efecto de los tratamientos aplicados durante dicho proceso (cultivo con aceite de argán, en melaza hidrolizada y cultivo en melaza diluida) sobre el comportamiento fermentativo y sobre el perfil organoléptico de los vinos obtenidos, por lo que se empleó biomasa seca de las levaduras seleccionadas producida bajo dichas condiciones en las fermentaciones mixtas. Además, se realizaron fermentaciones control inoculadas únicamente con *S. cerevisiae* T73. Las fermentaciones control se inocularon con  $10^7$  células viables/mL y las mixtas con  $10^7$  células viables/mL de las especies no-*Saccharomyces* y  $10^3$  células viables/mL de *S. cerevisiae*, siguiendo lo descrito en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. El mosto empleado en los ensayos de vinificación fue de la variedad Primitivo, cuyas principales características químicas se recogen en la Tabla R.6.1.

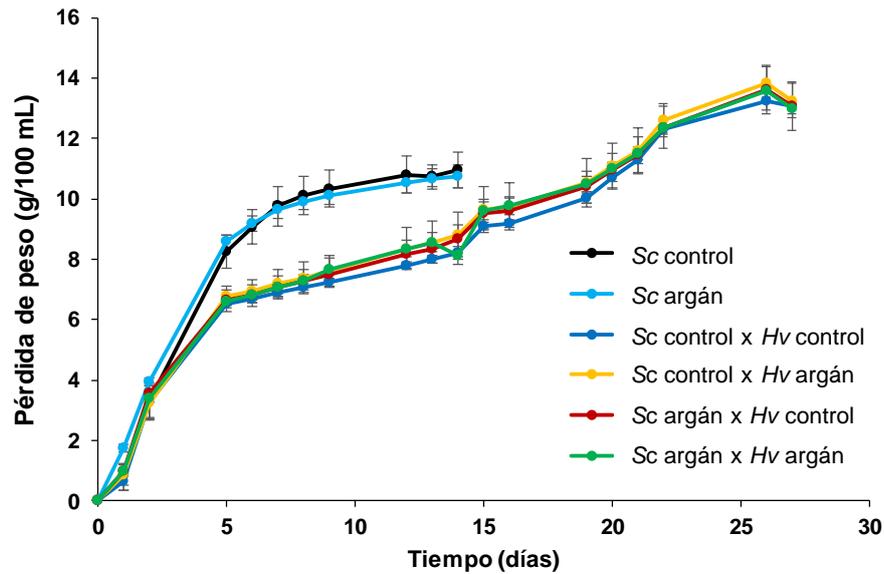
**Tabla R.6.1:** Parámetros químicos convencionales del mosto de uva empleado en las vinificaciones. Entre paréntesis se incluye la desviación estándar de tres réplicas técnicas de la medida.

° BRIX	pH	Nitrógeno alfa-aminado (g/L)	Alfa-aminoácidos (g/L)	Amonio (g/L)
22.27 (± 0.06)	3.46 (± 0.01)	228.82 (± 6.45)	129.43 (± 1.71)	99.40 (± 7.81)
Densidad (g/mL)	Acidez total (g/L)	Ácido glucónico (g/L)	Ácido málico (g/L)	Ácido tartárico (g/L)
1.10 (± 0.00)	6.71 (± 0.03)	1.75 (± 0.02)	2.03 (± 0.22)	11.14 (± 0.24)

### 6.1 Vinificaciones mixtas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora vineae*

A lo largo de este trabajo se ha descrito como la baja viabilidad de *H. vineae* tras el proceso de deshidratación es el principal factor limitante para su uso como inóculo. Por ello, debido a la baja viabilidad obtenida en la LSA de cultivada en melaza, para los ensayos de vinificación con *H. vineae* se decidió utilizar LSA procedente del cultivo en YPD y deshidratada mediante *spray dryer*. Por este motivo, en el caso de *H. vineae* solo se empleó biomasa cultivada en condiciones control y en presencia de aceite de argán en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control y en presencia de aceite de argán.

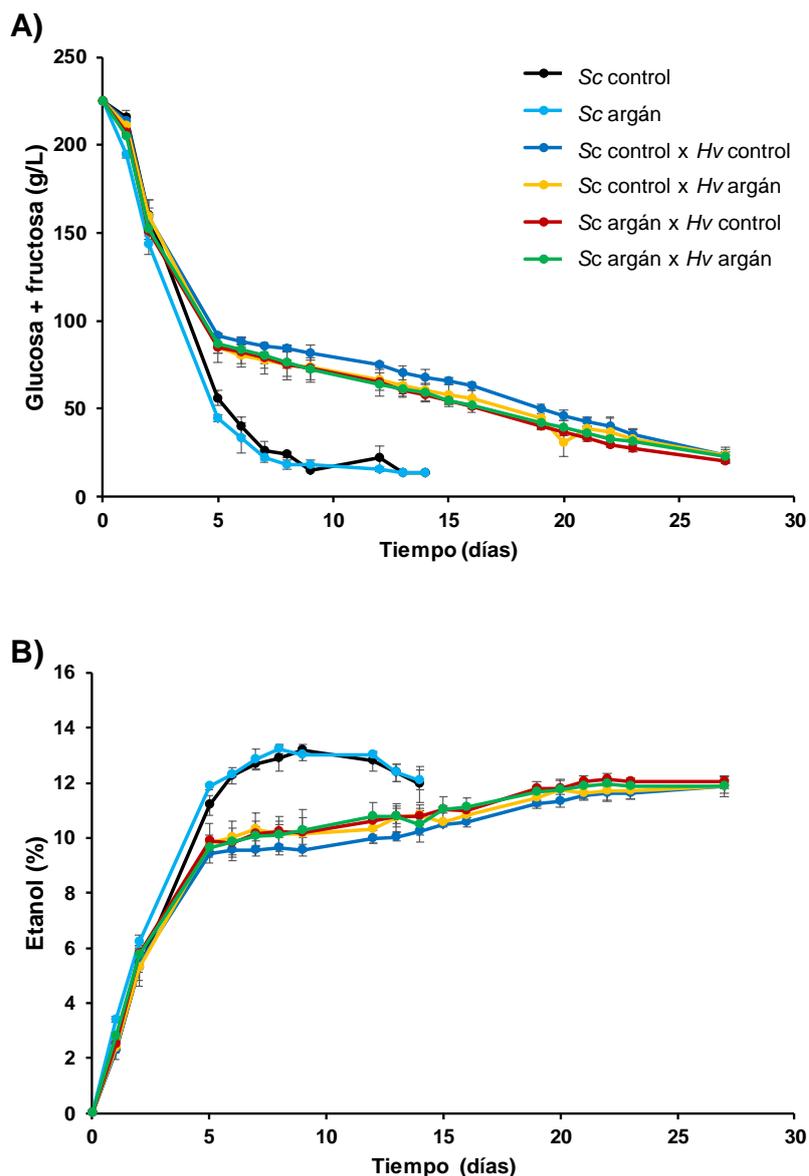
La cinética de las fermentaciones vínicas se siguió mediante la pérdida de peso del cultivo. Se observó que la cinética de las fermentaciones difiere notablemente entre las fermentaciones con inóculo puro de *S. cerevisiae* y las mixtas (Figura R.6.1). En las fermentaciones sencillas dejó de observarse pérdida de peso aproximadamente a los 11 días, indicando el final de la fermentación. En las fermentaciones mixtas las etapas iniciales presentaron una cinética comparable a la de las fermentaciones sencillas, sin embargo, a partir del quinto día de fermentación se observa una disminución de la velocidad de fermentación. La menor velocidad se tradujo en un mayor tiempo de fermentación, alargándose hasta los 27 días. En ningún caso la adición de aceite de argán alteró dicho parámetro.



**Figura R.6.1:** Pérdida de peso del cultivo en fermentaciones sencillas de *S. cerevisiae* (*Sc*) y en fermentaciones mixtas con *H. vineae* (*Hv*), desarrolladas bajo diferentes condiciones. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

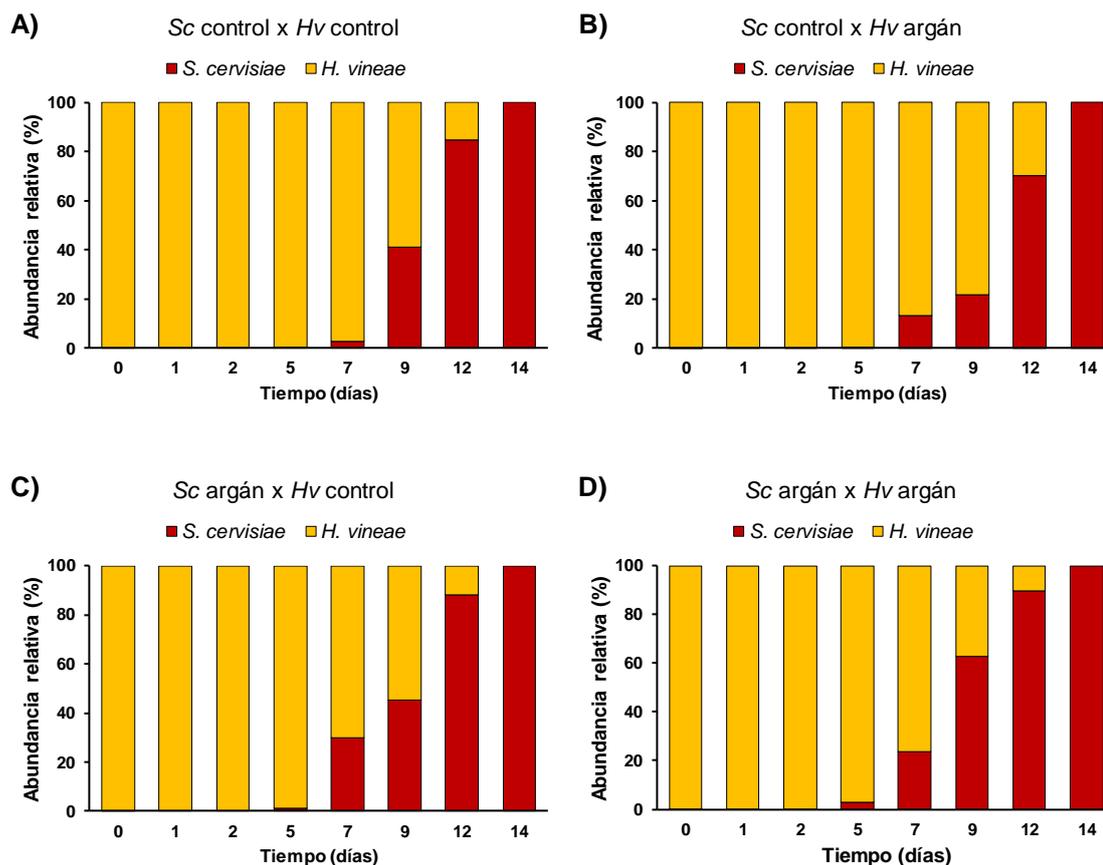
En la Figura R.6.2. se recoge la evolución de los niveles de azúcares y de etanol en el mosto en fermentación. Como cabría esperar en base a los datos de pérdida de peso, las cinéticas de consumo de azúcares y producción de etanol difirieron notablemente entre las vinificaciones sencillas y mixtas, mientras que no se observaron diferencias significativas entre las condiciones en presencia o ausencia de aceite de argán, tanto en las vinificaciones sencillas como en las mixtas. En las vinificaciones sencillas se produjo un consumo rápido de los azúcares desde el principio de la fermentación (Figura R.6.2.A), ligado a una rápida producción de etanol (Figura R.6.2.B). Por otro lado, las vinificaciones mixtas, en las cuatro combinaciones de biomasa ensayadas, presentaron un consumo inicial de azúcares y una producción de etanol similares a las vinificaciones sencillas, pero como se ha mencionado, a partir de aproximadamente el quinto día de fermentación se observó una reducción de la velocidad de consumo de azúcares y de la producción de etanol, que se mantuvo hasta el último día analizado, el 27 (Figura R.6.2). Las cuatro fermentaciones mixtas analizadas mostraron cinéticas de fermentación muy similares entre sí, aunque se observaron algunas diferencias. En la fermentación mixta con biomasa de *S. cerevisiae* y *H. vineae* cultivada en condiciones control el consumo de azúcares fue ligera, pero significativamente más lento que en aquellas fermentaciones que se inocularon con biomasa de *S. cerevisiae* cultivada en presencia de aceite de argán. Del mismo modo, la producción de etanol durante la

fermentación fue significativamente mayor en las fermentaciones mixtas inoculadas con biomasa de *S. cerevisiae* cultivada en presencia de aceite de argán que en las fermentaciones mixtas con biomasa de *S. cerevisiae* y *H. vineae* cultivada en condiciones control. Estas dos observaciones podrían ser debidas a una mayor vitalidad de la LSA derivada del cultivo en presencia de aceite de argán, que favorecería un catabolismo de los azúcares del mosto más rápido que en levaduras cultivadas en condiciones control.



**Figura R.6.2:** Determinación del contenido de **A)** glucosa y fructosa y **B)** etanol durante la fermentación de mosto natural en fermentaciones sencillas con *S. cerevisiae* (*Sc*) y fermentaciones mixtas de *S. cerevisiae* y *H. vineae* (*Hv*) a partir de biomasa procedente de diferentes condiciones de cultivo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de determinar la influencia de cada una de las especies en los parámetros de fermentación, se analizó la abundancia relativa de cada una de las especies a lo largo de las fermentaciones mixtas, tal y como se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. *H. vineae* fue la especie dominante durante las primeras etapas de la fermentación (Figura R.6.3), coincidiendo con el ya mencionado consumo rápido de los azúcares inicial. Como se puede observar, en general en las fermentaciones mixtas hasta el séptimo día de fermentación no se encontraron porcentajes importantes de *S. cerevisiae* en el mosto en fermentación, y no fue hasta el día 14 de fermentación cuando esta se impuso por completo sobre *H. vineae* y pasó a ser la única especie detectable hasta el final de la fermentación. No obstante, existen diferencias en la proliferación entre las distintas fermentaciones, probablemente asociadas a una mayor vitalidad celular, conferida por el cultivo con el aceite de argán. Cuando se empleó LSA de *S. cerevisiae* cultivada con aceite de argán esta se impone antes sobre *H. vineae* que cuando se emplea *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control (Figura R.6.3.A y C). Del mismo modo, cuando se empleó LSA de *H. vineae* cultivada con aceite de argán, su prevalencia en el mosto en fermentación fue mayor que cuando se empleó LSA cultivada en condiciones control, aunque *S. cerevisiae* es más abundante en el primer día que se detecta (día 7) (Figura R.6.3.A y B). Por último, el efecto de la mejora derivada del cultivo en presencia de aceite de argán es mayor en *S. cerevisiae*, por lo que esta se impone antes sobre *H. vineae*, en comparación con las fermentaciones mixtas con LSA cultivada en condiciones control (Figura R.6.3.A y D).



**Figura R.6.3:** Evolución de la microbiota en fermentaciones mixtas de *S. cerevisiae* (rojo) y *H. vineae* (amarillo) con el tiempo. Se representa la abundancia relativa de cada una de las especies a lo largo de 14 días en las cuatro combinaciones analizadas.

La ralentización de las fermentaciones mixtas podría ser debida a la alteración de algún parámetro enológico. Como se discutirá más adelante (ver Tabla R.6.3), las fermentaciones mixtas producen una elevada cantidad de ácido acético. Esta elevada concentración de ácido acético, y por tanto de la acidez total del vino (Tabla R.6.2), derivada de la presencia de *H. vineae* en el mosto, parece tener un claro efecto sobre la capacidad de crecimiento de *S. cerevisiae*, que estaría de acuerdo con la ya descrita reducción de la velocidad de crecimiento de esta especie incluso a concentraciones bajas de ácido acético (Narendranath et al., 2001). Por tanto, parece posible que la reducción de la velocidad de fermentación sea debido a la combinación de dos factores, por un lado, la rápida fermentación inicial de los azúcares por parte de *H. vineae* lleva a una producción de etanol hasta niveles que resultan inhibitorios para esta especie. Por otra parte, la elevada concentración de ácido acético producido por *H. vineae*, hace que la proliferación de *S. cerevisiae* sea más lenta, retrasando así el final de la fermentación.

El estudio de los parámetros químicos característicos de los vinos obtenidos al final de la fermentación reveló que los vinos obtenidos tras las fermentaciones mixtas presentaron una mayor concentración de fructosa residual que sus respectivos controles (Tabla R.6.2). Como se ha mencionado en la Introducción, el interés enológico de esta especie reside en su buena capacidad fermentativa (Martin et al., 2018) y su capacidad de producir vinos con perfiles aromáticos complejos (Lleixà et al., 2016; Viana et al., 2011). La elevada producción de etanol por parte de *H. vineae* en las etapas iniciales de las fermentaciones mixtas, comparable a la de las fermentaciones sencillas, hizo que no se encontraran diferencias en la concentración de etanol en los vinos finales. En las fermentaciones mixtas se detectó una disminución de la acidez total, debido a una menor concentración de ácido málico y láctico, y un ligero aumento del pH. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros químicos analizados entre los vinos obtenidos con fermentaciones sencillas de *S. cerevisiae* cultivadas en condiciones control o en presencia de aceite de argán.

**Tabla R.6.2:** Parámetros químicos convencionales en los vinos finales, analizados mediante espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas.

	<i>S. cerevisiae</i> control	<i>S. cerevisiae</i> argán	Sc control x Hv control	Sc control x Hv argán	Sc argán x Hv control	Sc argán x Hv argán
<b>Etanol (%)</b>	11.96 (± 0.65) <sup>a</sup>	12.01 (± 0.37) <sup>a</sup>	11.21 (± 0.12) <sup>a</sup>	11.14 (± 0.36) <sup>a</sup>	11.34 (± 0.12) <sup>a</sup>	11.25 (± 0.43) <sup>a</sup>
<b>Glucosa (g/L)</b>	2.10 (± 0.10) <sup>c</sup>	2.43 (± 0.06) <sup>b</sup>	2.83 (± 0.35) <sup>a</sup>	3.03 (± 0.47) <sup>a</sup>	2.60 (± 0.10) <sup>b</sup>	3.20 (± 0.44) <sup>a</sup>
<b>Fructosa (g/L)</b>	1.03 (± 0.15) <sup>b</sup>	1.07 (± 0.15) <sup>b</sup>	9.77 (± 1.74) <sup>a</sup>	9.50 (± 4.51) <sup>a</sup>	6.10 (± 0.96) <sup>a</sup>	9.17 (± 3.46) <sup>a</sup>
<b>Acidez total (g/L)</b>	9.85 (± 0.41) <sup>a</sup>	10.07 (± 0.13) <sup>a</sup>	8.83 (± 0.31) <sup>b</sup>	8.86 (± 0.18) <sup>b</sup>	8.99 (± 0.11) <sup>b</sup>	8.97 (± 0.18) <sup>b</sup>
<b>Ácido málico (g/L)</b>	2.00 (± 0.19) <sup>a</sup>	1.99 (± 0.07) <sup>a</sup>	1.42 (± 0.04) <sup>b</sup>	1.45 (± 0.05) <sup>b</sup>	1.49 (± 0.02) <sup>b</sup>	1.49 (± 0.03) <sup>b</sup>
<b>Ácido láctico (g/L)</b>	0.70 (± 0.10) <sup>a</sup>	0.93 (± 0.15) <sup>a</sup>	0.53 (± 0.06) <sup>a</sup>	0.60 (± 0.10) <sup>a</sup>	0.67 (± 0.06) <sup>b</sup>	0.60 (± 0.10) <sup>b</sup>
<b>pH</b>	3.31 (± 0.02) <sup>b</sup>	3.32 (± 0.03) <sup>b</sup>	3.41 (± 0.01) <sup>a</sup>	3.41 (± 0.01) <sup>a</sup>	3.45 (± 0.01) <sup>a</sup>	3.43 (± 0.01) <sup>a</sup>
<b>Densidad (g/L)</b>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>

La determinación de compuestos volátiles por cromatografía de gases, cuyos resultados se recogen en la Tabla R.6.3, terminó de confirmar las diferencias existentes entre los vinos producidos únicamente con *S. cerevisiae* y los producidos en fermentaciones mixtas. Por otro lado, no se observaron grandes diferencias entre los vinos producidos con fermentaciones sencillas de *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control y con aceite de argán. Las similitudes entre ambas condiciones confirmarían que en ningún caso el tratamiento con aceite de argán durante la propagación de la biomasa tiene un efecto perjudicial sobre la misma. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gamero-Sandemetro et al., (2019), y vienen a confirmar que el cultivo con aceite de argán no tiene un gran efecto negativo sobre los parámetros enológicos analizados en este trabajo. Igual que en las fermentaciones sencillas, las diferencias entre los cuatro tipos de fermentación mixta, fueron mínimas. Como se puede observar en la Tabla R.6.3, en comparación con las fermentaciones sencillas, las fermentaciones mixtas presentaron una concentración de ácido acético significativamente mayor. La elevada concentración de ácido acético detectada hace que se encuentre por encima del umbral de percepción en vino de entre 0.2 – 0.7 g/L (Swiegers et al., 2005), una observación que estaría de acuerdo con la elevada producción de este ácido descrita en levaduras apiculadas (Ciani y Picciotti, 1995). Por otro lado, en las fermentaciones mixtas se detectó una menor concentración de compuestos indeseados como el acetaldehído o el acetato de etilo y un aumento de acetoina. Cabe mencionar que la menor concentración de acetato de etilo observada respecto a las fermentaciones sencillas no coincide con lo descrito por Viana et al., (2011), en cuyo trabajo se encontraron elevadas concentraciones de este éster. Estos resultados sugieren que el efecto enológico de *H. vineae* es muy dependiente de las condiciones de inoculación, la composición del mosto y las condiciones de fermentación. También se observaron cambios en los niveles de los alcoholes superiores analizados (Tabla R.6.3). Por un lado, se observó una menor concentración de isoamil alcohol y pentanoles, mientras que los niveles de propanol y butanol aumentaron. A pesar de las variaciones observadas, en todas las fermentaciones mixtas los niveles de alcoholes superiores analizados se mantuvieron dentro de los valores aceptables en vino, con una suma de alcoholes superiores por debajo de 400 mg/L. Estos cambios en el perfil de alcoholes superiores podrían dar un perfil organoléptico más equilibrado al vino. Aunque en este trabajo no se han analizado, uno de los principales puntos de interés del uso de *H. vineae* es su actividad  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa, que permite la liberación de compuestos aromáticos volátiles, como terpenoides, deseables en el vino (López et al., 2015). Sería de gran interés realizar un estudio completo de los niveles de todos los compuestos aromáticos para completar la caracterización del efecto del co-cultivo con *H. vineae* sobre la calidad

del vino. En cualquier caso, las observaciones acerca de la calidad del vino son especulativas y la calidad de los vinos producidos debería ser probada mediante un panel de cata.

**Tabla R.6.3:** Determinación de compuestos volátiles en los vinos finales, analizados mediante cromatografía de gases. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas.

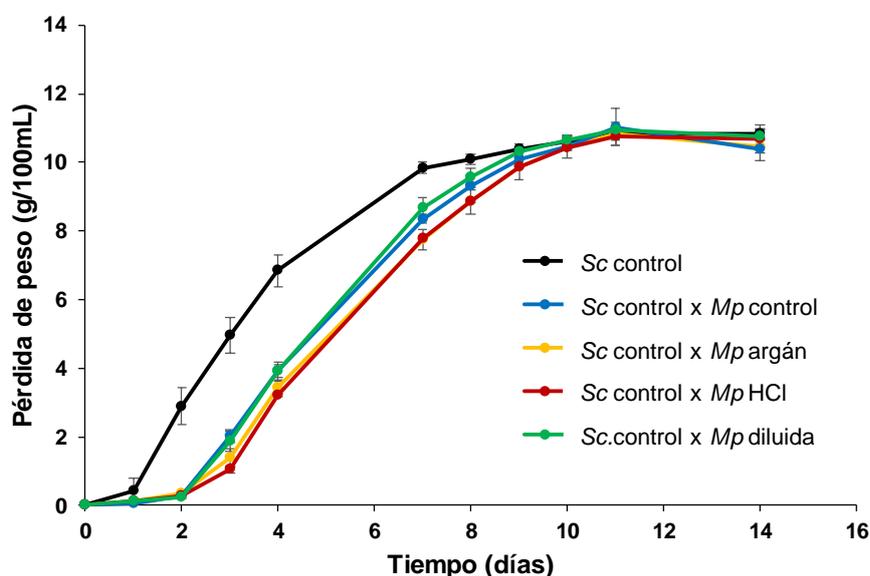
	<i>S. cerevisiae</i> control	<i>S. cerevisiae</i> argán	Sc control x Hv control	Sc control x Hv argán	Sc argán x Hv control	Sc argán x Hv argán
Acetaldehído (mg/L)	56.80 (± 6.11) <sup>a</sup>	65.37 (± 9.41) <sup>a</sup>	41.29 (± 2.04) <sup>b</sup>	41.43 (± 1.15) <sup>b</sup>	42.50 (± 3.04) <sup>b</sup>	43.32 (± 7.04) <sup>b</sup>
Metanol (mg/L)	48.53 (± 2.22) <sup>a</sup>	49.68 (± 4.23) <sup>a</sup>	37.81 (± 9.31) <sup>a</sup>	46.58 (± 0.81) <sup>a</sup>	45.06 (± 5.41) <sup>a</sup>	49.73 (± 2.18) <sup>a</sup>
N-propanol (mg/L)	16.36 (± 1.57) <sup>b</sup>	15.65 (± 1.68) <sup>b</sup>	22.35 (± 0.93) <sup>a</sup>	22.68 (± 2.19) <sup>a</sup>	21.85 (± 3.27) <sup>a</sup>	23.28 (± 1.81) <sup>a</sup>
Isobutanol (mg/L)	36.39 (± 2.55) <sup>a</sup>	35.62 (± 2.25) <sup>a</sup>	33.31 (± 3.91) <sup>a</sup>	35.91 (± 4.14) <sup>a</sup>	33.85 (± 0.84) <sup>a</sup>	36.21 (± 8.93) <sup>a</sup>
N-butanol (mg/L)	16.62 (± 2.59) <sup>b</sup>	15.91 (± 2.74) <sup>c</sup>	62.39 (± 5.13) <sup>a</sup>	56.29 (± 16.59) <sup>a</sup>	35.33 (± 3.36) <sup>b</sup>	58.20 (± 7.56) <sup>a</sup>
Pentanoles (mg/L)	71.95 (± 7.94) <sup>a</sup>	64.80 (± 13.06) <sup>a</sup>	36.59 (± 3.99) <sup>b</sup>	37.76 (± 2.01) <sup>b</sup>	33.28 (± 9.75) <sup>b</sup>	34.67 (± 0.63) <sup>b</sup>
Isoamil alcohol (mg/L)	203.93 (± 25.07) <sup>a</sup>	200.66 (± 29.05) <sup>a</sup>	136.82 (± 14.22) <sup>b</sup>	148.20 (± 10.02) <sup>b</sup>	145.58 (± 10.26) <sup>b</sup>	149.70 (± 17.45) <sup>b</sup>
Acetoína (mg/L)	6.28 (± 2.03) <sup>c</sup>	7.12 (± 0.57) <sup>c</sup>	19.89 (± 1.69) <sup>b</sup>	25.45 (± 3.95) <sup>a</sup>	21.23 (± 3.13) <sup>a</sup>	25.25 (± 1.86) <sup>a</sup>
Ácido acético (mg/L)	299.89 (± 65.59) <sup>d</sup>	245.58 (± 59.95) <sup>d</sup>	737.04 (± 53.87) <sup>c</sup>	980.32 (± 41.11) <sup>b</sup>	1136.21 (± 62.34) <sup>b</sup>	1455.18 (± 27.77) <sup>a</sup>
Acetato de etilo (mg/L)	27.10 (± 1.03) <sup>a</sup>	27.48 (± 0.99) <sup>a</sup>	10.89 (± 0.50) <sup>b</sup>	10.90 (± 0.70) <sup>b</sup>	12.11 (± 0.69) <sup>b</sup>	11.95 (± 0.40) <sup>b</sup>

## 6.2 Vinificaciones mixtas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Metschnikowia pulcherrima* cultivada en diversas condiciones

Se realizaron fermentaciones mixtas empleando LSA de *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control (en el siguiente apartado se analizará el efecto del aceite de argán sobre *S. cerevisiae* y LSA de *M. pulcherrima* cultivada bajo las cuatro condiciones de interés: control, con aceite de argán, en melaza hidrolizada y en melaza diluida. Además, se realizaron fermentaciones sencillas que se emplearon como referencia en las que el mosto natural solo se inoculó con LSA de *S. cerevisiae*.

El estudio de la pérdida de peso de los cultivos en vinificación, reveló que, igual que ocurrió en las fermentaciones mixtas con *H. vineae*, existen diferencias entre las cinéticas de las fermentaciones mixtas y sencillas (Figura R.6.4). Las vinificaciones

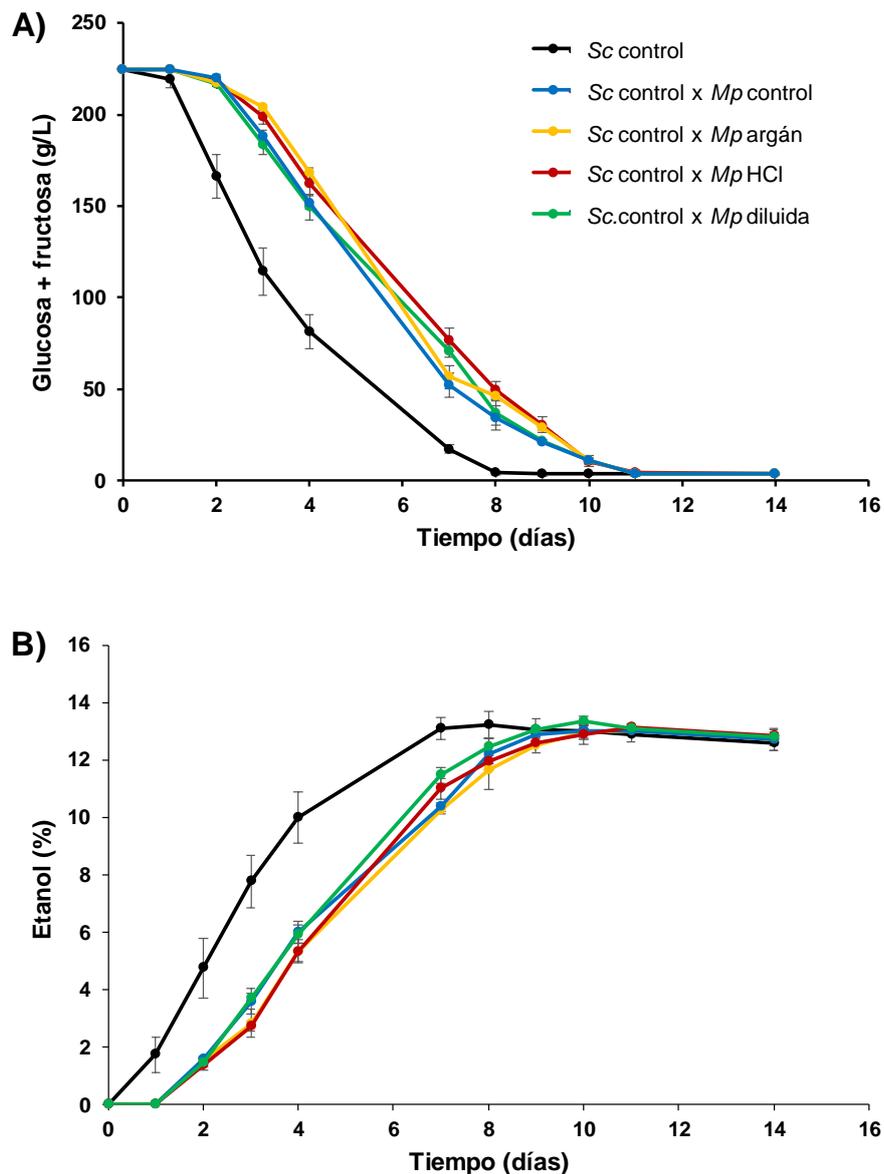
mixtas presentaron una fase de latencia de mayor duración que la vinificación sencilla, en estas no se observó pérdida de peso hasta el segundo día de fermentación, probablemente debido al carácter no fermentador de *M. pulcherrima* (Schnierda et al., 2014). Del mismo modo, el final de la fermentación se produjo ligeramente más tarde (11 días) que en las vinificaciones sencillas (9 días). Como se puede observar, existen ligeras diferencias entre las cinéticas de fermentación de los cuatro tipos de fermentación mixtas. En las vinificaciones en las que se empleó biomasa de *M. pulcherrima* cultivada en presencia de aceite de argán y en melaza hidrolizada la cinética de fermentación fue ligeramente más lenta que cuando se empleó biomasa cultivada en condiciones control o la biomasa cultivada en melaza diluida. En cualquier caso, todas alcanzan la misma pérdida de peso.



**Figura R.6.4:** Pérdida de peso del cultivo de vinificación en fermentaciones sencillas de *S. cerevisiae* (*Sc*) cultivada en condiciones control y fermentaciones mixtas con *M. pulcherrima* (*Mp*) cultivada bajo diferentes condiciones. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

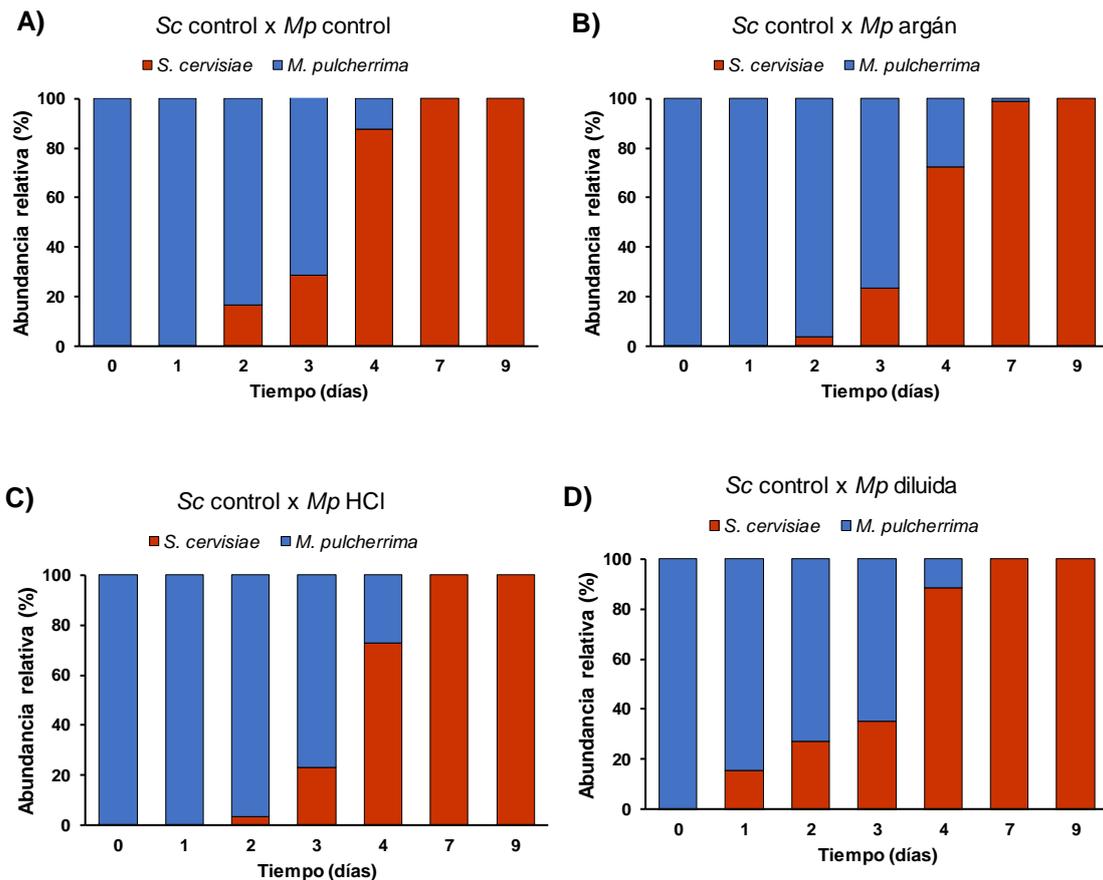
En la Figura R.6.5 se recogen las cinéticas de consumo de azúcares y de producción de etanol en las fermentaciones. Como se puede observar, en las fermentaciones mixtas, en los primeros días de fermentación se produjo un consumo lento de los azúcares del mosto (Figura R.6.5.A), coincidiendo con la fase de latencia inicial en la que no se observó pérdida de peso. Además, no se detectó formación de etanol hasta el segundo día de fermentación (Figura R.6.5.B). Este retraso en la producción de etanol

es atribuible a la menor capacidad fermentativa de *M. pulcherrima*. Como cabría esperar, en base a las diferencias observadas en las cinéticas de fermentación, el consumo de azúcares a tiempos cortos de fermentación (2 – 4 días) en las fermentaciones mixtas con biomasa de *M. pulcherrima* cultivada con aceite de argán y en melaza hidrolizada fueron ligeramente más lento al inicio que en las otras dos condiciones. La producción de etanol inicial es más lenta en condiciones de melaza hidrolizada y tratada con aceite de argán.



**Figura R.6.5:** Determinación del contenido de **A)** glucosa y fructosa y **B)** etanol durante la vinificación de mosto natural en fermentaciones sencillas con *S. cerevisiae* y mixtas de *S. cerevisiae* y *M. pulcherrima* procedente de diferentes condiciones de cultivo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Como se puede observar en la Figura R.6.6, en las fermentaciones mixtas la fase inicial en la que se produjo un consumo lento de los azúcares, que se extendió durante los tres primeros días de la vinificación, coincide con el periodo durante el cual *M. pulcherrima* fue la especie predominante en el mosto en todos los casos. En general, en las vinificaciones mixtas a partir del segundo día de fermentación se empezó a detectar la presencia de *S. cerevisiae* en mayor porcentaje, lo que coincidió con el inicio de la producción de etanol (Figura R.6.5.B), una observación que coincide con la hipótesis de que la producción de etanol en estas fermentaciones está asociada a la fermentación de los azúcares por parte de *S. cerevisiae*, y que durante los primeros días de fermentación, en los que predomina *M. pulcherrima* se produce una respiración lenta de los azúcares del mosto. El aumento de los niveles de etanol debido a la proliferación de *S. cerevisiae* está ligado a la caída de la presencia de *M. pulcherrima*, dada la susceptibilidad de esta a bajos niveles de etanol, como ya se ha descrito (apartado 1.6.4). En todos los casos, a partir del cuarto día de fermentación *S. cerevisiae* pasó a ser la especie predominante en el mosto, y a partir del séptimo día de fermentación se impuso por completo sobre *M. pulcherrima* y fue la única especie presente en el mosto hasta que se completó la fermentación, indicando que la presencia de etanol conlleva la muerte de *M. pulcherrima*. Si se analiza la proliferación de *S. cerevisiae* en cada una de las fermentaciones mixtas, se puede observar como en las vinificaciones en las que se empleó biomasa de *M. pulcherrima* cultivada en presencia de aceite de argán y en melaza hidrolizada la proliferación de *S. cerevisiae* fue ligeramente más lenta que cuando se empleó biomasa de *M. pulcherrima* cultivada en condiciones control. Esta observación correlaciona con la cinética de fermentación más lenta observada en estas vinificaciones mixtas, la proliferación ligeramente más tardía de *S. cerevisiae* tiene como consecuencia un consumo más lento de los azúcares en las etapas iniciales de la fermentación. Además, esto estaría de acuerdo con una mayor vitalidad celular de la LSA de *M. pulcherrima* cultivada bajo estos dos tratamientos y apoyaría la hipótesis de que tanto el tratamiento con aceite de argán como el cultivo en melaza hidrolizada ejercen un efecto beneficioso sobre la biomasa obtenida al final del proceso de propagación industrial. Por otro lado, se puede observar como en las vinificaciones con biomasa de *M. pulcherrima* cultivada en melaza diluida la proliferación de *S. cerevisiae* es más temprana. A pesar de que este tratamiento resultó en una mejora del rendimiento en la producción de biomasa (apartados 4.3 y 5.3), los resultados obtenidos parecen indicar que la biomasa obtenida no se encuentra en las condiciones óptimas para la fermentación del mosto.



**Figura R.6.6:** Evolución de la microbiota en las fermentaciones mixtas de *S. cerevisiae* (rojo) y *M. pulcherrima* (azul) con el tiempo. Se representa la abundancia relativa de cada una de las especies a lo largo de 9 días y en diferentes combinaciones.

Los vinos obtenidos al final de la fermentación (día 14 de fermentación) se analizaron para una serie de parámetros químicos convencionales, que aparecen recogidos en la Tabla R.6.4. En general, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes fermentaciones mixtas en los parámetros analizados. En las fermentaciones mixtas se detectó una reducción en la concentración de ácido málico y en el pH respecto de las fermentaciones sencillas. En el resto de parámetros analizados no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Cabe destacar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de etanol entre las fermentaciones mixtas y sencillas. Como se ha descrito, durante los primeros días de la fermentación, en los que predominó *M. pulcherrima*, se observa un ligero consumo de azúcares sin producción de etanol, lo que indica que el metabolismo de esta especie será seguramente respiratorio o respiro-fermentativo. No obstante, el consumo inicial de azúcares por parte de *M. pulcherrima* no parece ser suficiente para que se produzca

## Resultados y Discusión

una reducción del nivel de etanol total al final de la fermentación, una de las principales características de interés de esta especie, al menos en la proporción de inóculos usada en estos experimentos.

**Tabla R.6.4:** Parámetros químicos convencionales en los vinos finales, analizados mediante espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas.

	<i>S. cerevisiae</i> control	<i>Sc control x</i> <i>Mp control</i>	<i>Sc control x</i> <i>Mp argán</i>	<i>Sc control x</i> <i>Mp Hcl</i>	<i>Sc control x</i> <i>Mp diluida</i>
<b>Etanol (%)</b>	12.60 (± 0.25) <sup>a</sup>	12.73 (± 0.09) <sup>a</sup>	12.70 (± 0.04) <sup>a</sup>	12.73 (± 0.04) <sup>a</sup>	12.80 (± 0.13) <sup>a</sup>
<b>Glucosa (g/L)</b>	1.57 (± 0.06) <sup>b</sup>	1.80 (± 0.01) <sup>a</sup>	1.73 (± 0.06) <sup>ab</sup>	1.73 (± 0.05) <sup>ab</sup>	1.67 (± 0.06) <sup>ab</sup>
<b>Fructosa (g/L)</b>	0.87 (± 0.21) <sup>b</sup>	1.40 (± 0.20) <sup>a</sup>	1.17 (± 0.06) <sup>ab</sup>	1.20 (± 0.17) <sup>ab</sup>	1.07 (± 0.06) <sup>ab</sup>
<b>Acidez total (g/L)</b>	9.63 (± 0.46) <sup>a</sup>	9.51 (± 0.07) <sup>a</sup>	9.39 (± 0.05) <sup>a</sup>	9.36 (± 0.05) <sup>a</sup>	9.44 (± 0.11) <sup>a</sup>
<b>Ácido málico (g/L)</b>	1.87 (± 0.11) <sup>a</sup>	1.63 (± 0.03) <sup>b</sup>	1.58 (± 0.07) <sup>bc</sup>	1.52 (± 0.02) <sup>c</sup>	1.59 (± 0.03) <sup>b</sup>
<b>Ácido láctico (g/L)</b>	0.83 (± 0.15) <sup>a</sup>	0.77 (± 0.06) <sup>a</sup>	0.90 (± 0.10) <sup>a</sup>	0.90 (± 0.17) <sup>a</sup>	0.97 (± 0.06) <sup>a</sup>
<b>pH</b>	3.93 (± 0.03) <sup>a</sup>	3.34 (± 0.01) <sup>b</sup>	3.35 (± 0.01) <sup>b</sup>	3.35 (± 0.01) <sup>b</sup>	3.36 (± 0.01) <sup>b</sup>
<b>Densidad (g/L)</b>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>	1.00 (± 0) <sup>a</sup>

Además del análisis de parámetros químicos convencionales, se realizó un análisis mediante cromatografía de gases para determinar las concentraciones de determinados compuestos volátiles, principalmente alcoholes superiores, en los vinos finales. Los resultados de dicho análisis se recogen en la Tabla R.6.5. Como se puede observar, los vinos obtenidos tras las fermentaciones mixtas presentaron un mayor contenido en compuestos indeseados como acetaldehído, acetato de etilo y acetoína en los cuatro casos. Aunque los niveles detectados se mantienen dentro de los umbrales aceptables en vino, el aumento en la producción de acetato de etilo ya se ha descrito en vinos producidos con *M. pulcherrima*, incluso a concentraciones que ejercen un efecto negativo sobre la calidad del mismo (Varela et al., 2016). En cuanto a los alcoholes

superiores analizados, los niveles de isobutanol fueron superiores en los cuatro tipos de fermentación mixta y el n-propanol aumentó en las vinificaciones mixtas realizadas con biomasa cultivada en condiciones control, con aceite de argán y en melaza hidrolizada, pero no con biomasa cultivada en melaza diluida. Por otro lado, en los cuatro casos la concentración final de compuestos deseables como el isoamil alcohol y pentanoles fue menor que en los vinos control. No se observaron diferencias en los niveles de n-butanol y ácido acético entre las fermentaciones sencillas y mixtas. Los vinos producidos con *M. pulcherrima* se caracterizan por una elevada concentración de esteres y por la presencia de aromas varietales de la uva, gracias a la hidrólisis de monoterpenos unidos (Morata et al., 2019). Con el fin de terminar de determinar el efecto de la co-inoculación con *M. pulcherrima* sobre el perfil organoléptico del vino sería interesante realizar un análisis de la posible liberación de todos estos compuestos.

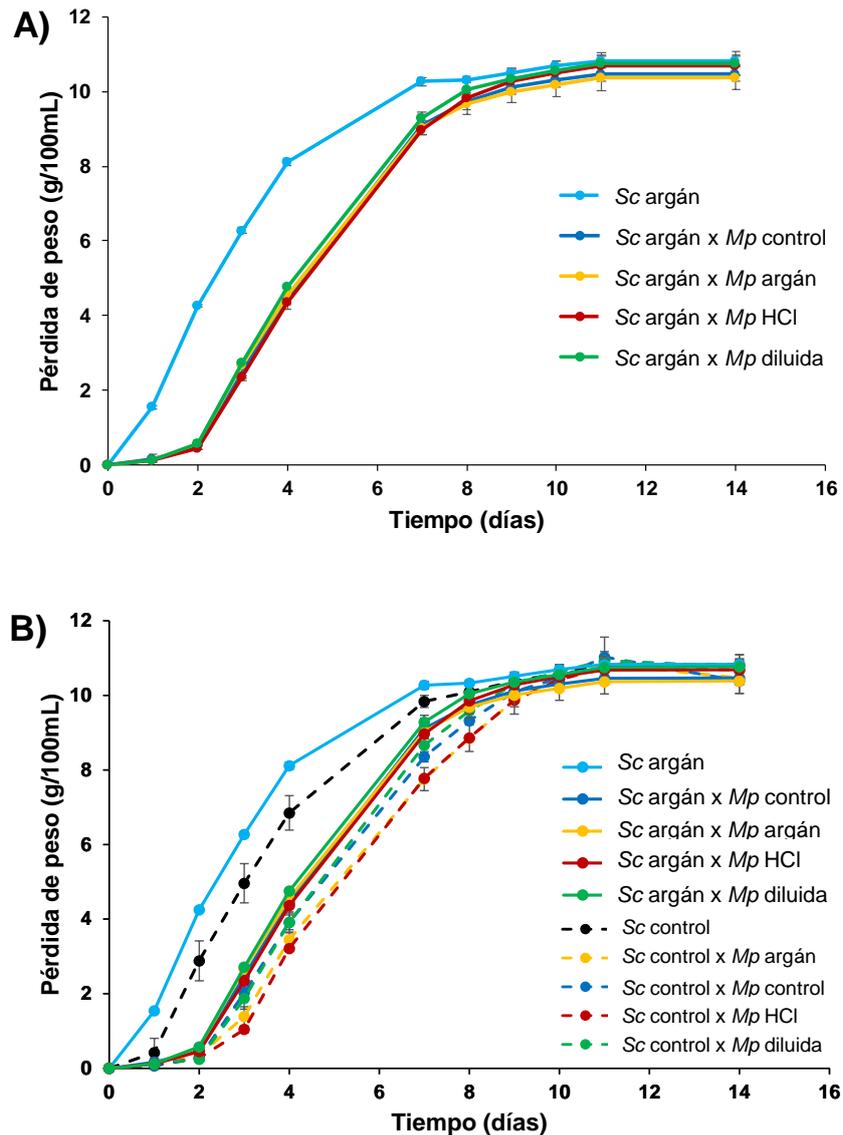
**Tabla R.6.5:** Determinación de compuestos volátiles en los vinos finales, analizados mediante cromatografía de gases. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas.

	<i>S. cerevisiae</i> control	<i>Sc</i> control x <i>Mp</i> control	<i>Sc</i> control x <i>Mp</i> argán	<i>Sc</i> control x <i>Mp</i> Hcl	<i>Sc</i> control x <i>Mp</i> diluida
Acetaldehído (mg/L)	47.95 (± 4.42) <sup>b</sup>	56.98 (± 12.02) <sup>ab</sup>	62.02 (± 5.22) <sup>a</sup>	60.02 (± 8.87) <sup>ab</sup>	61.08 (± 2.21) <sup>a</sup>
Metanol (mg/L)	47.42 (± 0.88) <sup>a</sup>	46.93 (± 0.30) <sup>a</sup>	46.93 (± 0.94) <sup>a</sup>	48.76 (± 4.28) <sup>a</sup>	44.56 (± 0.62) <sup>a</sup>
N-propanol (mg/L)	16.00 (± 0.88) <sup>c</sup>	23.58 (± 1.02) <sup>a</sup>	19.83 (± 1.51) <sup>b</sup>	21.23 (± 1.76) <sup>ab</sup>	17.47 (± 0.66) <sup>c</sup>
Isobutanol (mg/L)	35.66 (± 1.72) <sup>d</sup>	71.60 (± 4.74) <sup>a</sup>	56.07 (± 2.30) <sup>b</sup>	62.74 (± 7.09) <sup>ab</sup>	48.87 (± 2.39) <sup>c</sup>
N-butanol (mg/L)	17.00 (± 2.42) <sup>ab</sup>	20.26 (± 0.60) <sup>a</sup>	15.67 (± 0.93) <sup>b</sup>	16.42 (± 0.98) <sup>b</sup>	17.89 (± 1.69) <sup>ab</sup>
Pentanoles (mg/L)	89.84 (± 6.90) <sup>a</sup>	82.58 (± 1.79) <sup>ab</sup>	64.82 (± 11.52) <sup>bc</sup>	66.41 (± 3.66) <sup>c</sup>	64.21 (± 8.01) <sup>c</sup>
Isoamil alcohol (mg/L)	240.85 (± 14.40) <sup>a</sup>	230.84 (± 4.55) <sup>ab</sup>	201.35 (± 23.75) <sup>abc</sup>	206.05 (± 15.71) <sup>bc</sup>	198.74 (± 9.27) <sup>c</sup>
Acetoína (mg/L)	4.13 (± 0.35) <sup>b</sup>	6.83 (± 1.09) <sup>a</sup>	5.36 (± 1.49) <sup>ab</sup>	5.65 (± 0.54) <sup>a</sup>	6.19 (± 0.02) <sup>a</sup>
Ácido acético (mg/L)	299.84 (± 46.15) <sup>a</sup>	264.81 (± 10.73) <sup>a</sup>	227.04 (± 58.87) <sup>a</sup>	257.31 (± 9.32) <sup>a</sup>	217.93 (± 37.03) <sup>a</sup>
Acetato de etilo (mg/L)	19.70 (± 0.80) <sup>c</sup>	29.24 (± 3.83) <sup>a</sup>	25.24 (± 1.37) <sup>a</sup>	27.08 (± 1.77) <sup>a</sup>	21.67 (± 0.59) <sup>b</sup>

### **6.3 Vinificaciones mixtas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada en presencia de aceite de argán y *Metschnikowia pulcherrima* en diversas condiciones**

Una vez analizadas las vinificaciones empleando biomasa de *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control, se procedió a analizar el efecto del cultivo de *S. cerevisiae* en presencia de aceite de argán tanto en fermentaciones mixtas con *M. pulcherrima* cultivada en las cuatro condiciones de interés.

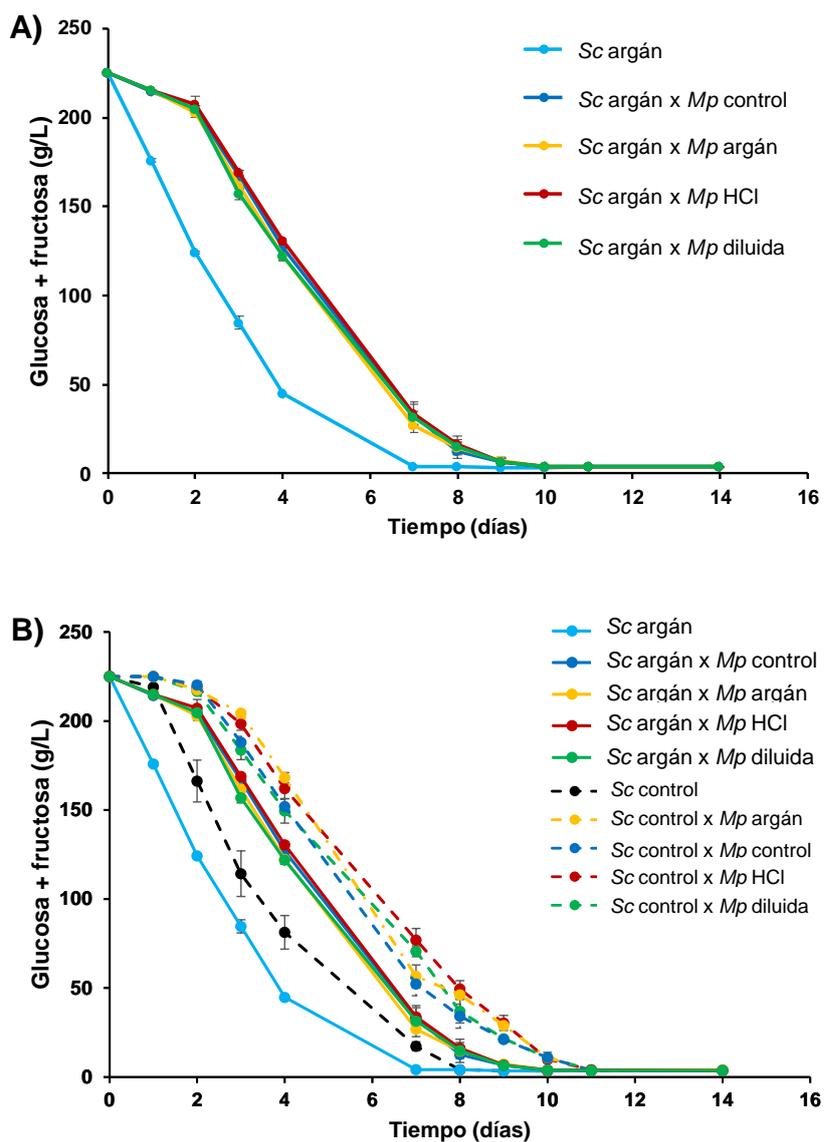
El análisis de la pérdida de peso de los cultivos en vinificación reveló que existen diferencias entre las cinéticas de fermentación de las vinificaciones sencillas y mixtas, como sucedió en el apartado anterior. En la Figura R.6.7.A se puede observar como las vinificaciones mixtas mostraron una fase de latencia inicial más prolongada que las vinificaciones sencillas, lo que repercutió en el tiempo de fermentación. Mientras que las vinificaciones sencillas finalizaron transcurridos aproximadamente 9 días, las mixtas necesitaron 11 días de fermentación. Además, se puede observar que no existen diferencias entre las cinéticas de fermentación de los cuatro tipos de vinificación mixta cuando se empleó *S. cerevisiae* cultivada con aceite de argán, a diferencia de lo que ocurrió en las fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control. Se encontraron diferencias entre las cinéticas de fermentación de las vinificaciones llevadas a cabo con biomasa de *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control y en presencia de aceite de argán. Para facilitar la comparación entre ambas condiciones, en la Figura R.6.7.B se recogen los datos presentados en el apartado anterior para las vinificaciones llevadas a cabo con biomasa de *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control. Como se puede observar, en todos los casos, cuando se empleó biomasa de *S. cerevisiae* cultivada con aceite de argán, la cinética de fermentación fue más rápida que cuando se empleó biomasa procedente de cultivo en condiciones control. Esta observación, estaría de acuerdo con la hipótesis ya planteada de una mejora de la vitalidad celular asociada al tratamiento con aceite de argán.



**Figura R.6.7:** Pérdida de peso del cultivo de vinificación en **A)** fermentaciones sencillas y mixtas con *S. cerevisiae* (Sc) cultivada con aceite de argán y *M. pulcherrima* (Mp) procedente de diferentes condiciones de cultivo. En el panel **B)** aparecen representados los datos presentados de la figura R.6.4 (líneas discontinuas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Como cabría esperar en base a las cinéticas de fermentación, en las vinificaciones mixtas se observó una fase inicial con un consumo de azúcares lento, que se prolongó alrededor de 2 días, y no se observaron diferencias entre los cuatro tipos de fermentación mixta (Figura R.6.8.A). Por otro lado, en las fermentaciones sencillas se produjo un rápido consumo de azúcares desde el primer día de fermentación. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las cinéticas de

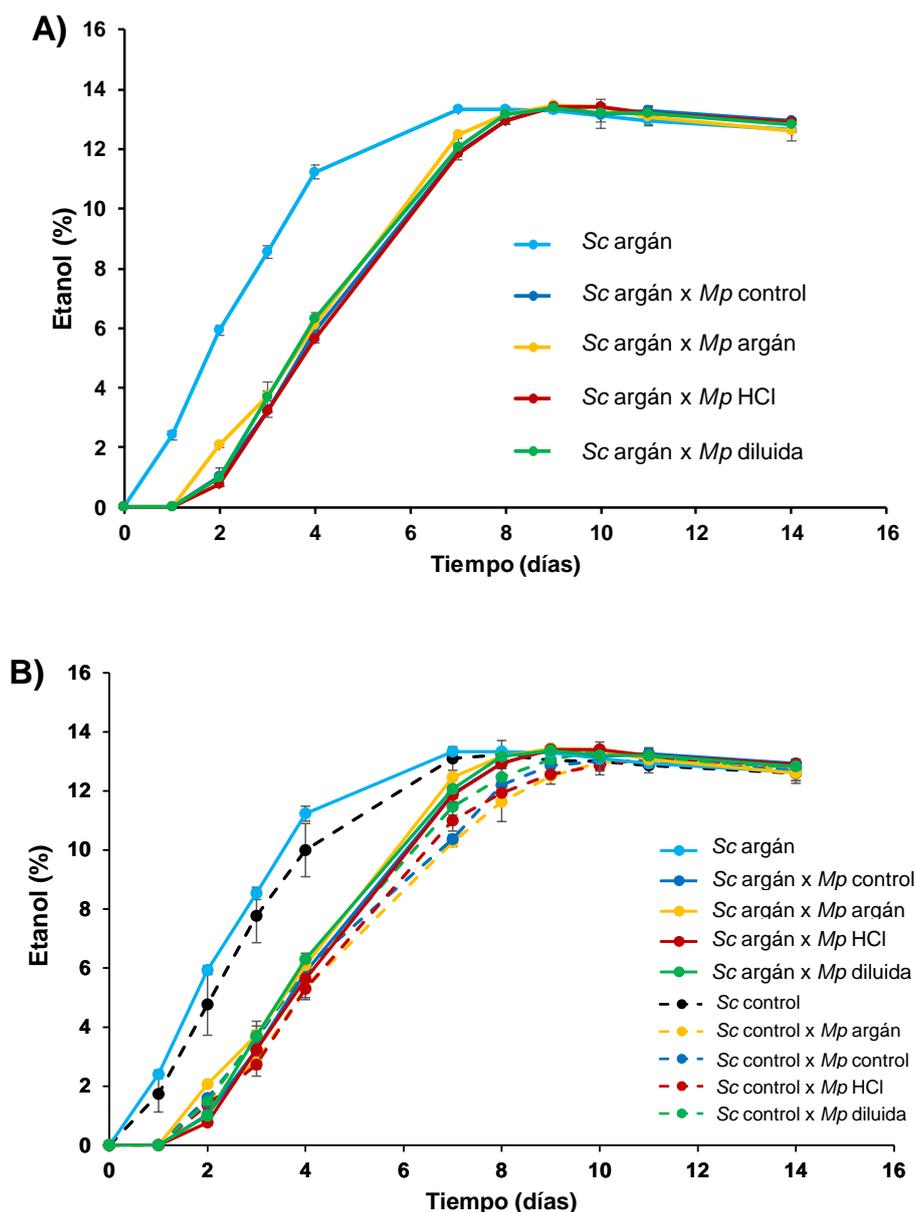
consumo de azúcares entre las diferentes vinificaciones mixtas realizadas, sí que existen diferencias con los experimentos realizados con biomasa de *S. cerevisiae* procedente de cultivo en condiciones control presentados en el apartado anterior (Figura R.6.8.B). Como se puede observar, igual que se ha descrito para las cinéticas de fermentación, en aquellos casos en los que se empleó biomasa de *S. cerevisiae* cultivada con aceite de argán el consumo de azúcares fue más rápido que cuando se empleó biomasa cultivada en condiciones control.



**Figura R.6.8:** Determinación del contenido de glucosa y fructosa durante la fermentación de mosto natural en **A)** fermentaciones sencillas y mixtas con *S. cerevisiae* (Sc) cultivada con aceite de argán y *M. pulcherrima* (Mp) procedente de diferentes condiciones de cultivo. En el panel **B)**

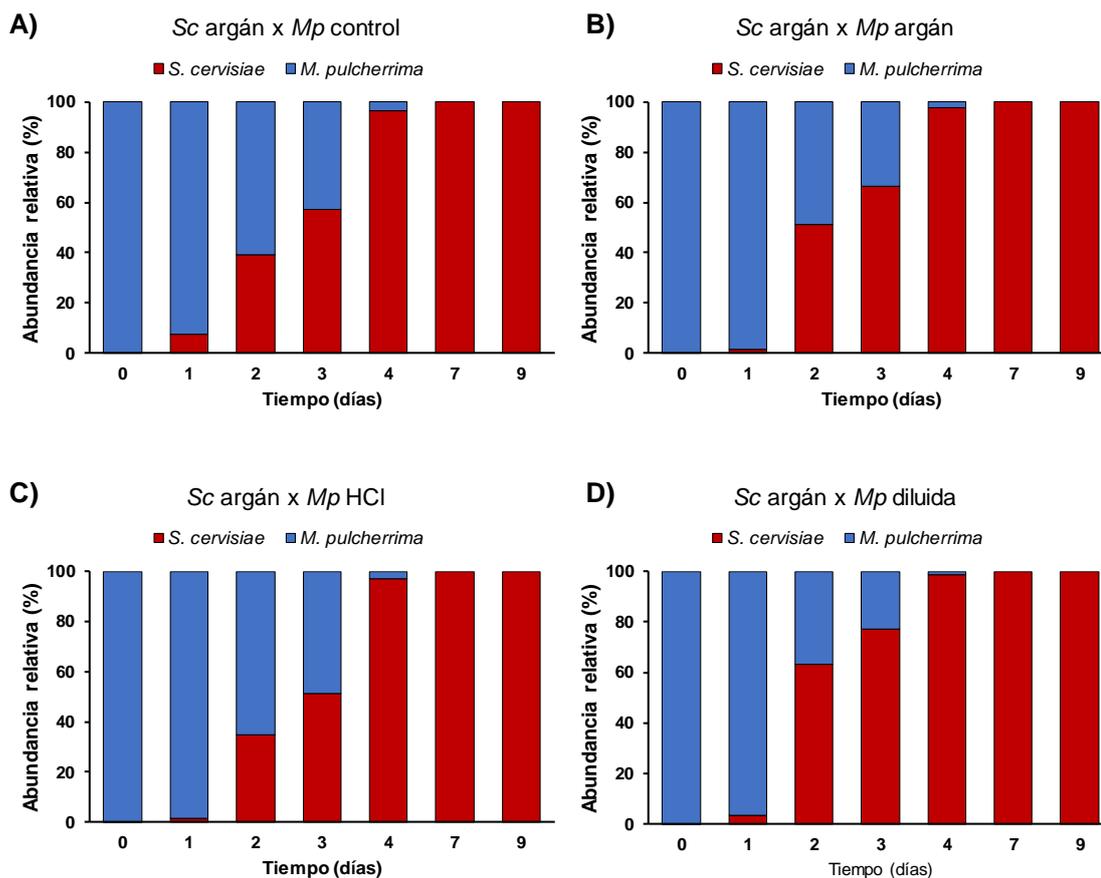
aparecen representados los datos presentados de la figura R.6.5.A (líneas discontinuas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Del mismo modo que sucedió con el consumo de azúcares, la producción de etanol en las fermentaciones sencillas fue más rápida que en las fermentaciones mixtas, entre las que no se observaron diferencias estadísticamente significativas y en las que se observó una fase de latencia inicial que coincidió con el periodo de consumo lento de azúcares descrito en estos casos (Figura R.6.9.A). Como cabría esperar en base a los resultados presentados hasta el momento, las cinéticas de producción de etanol de las vinificaciones llevadas a cabo en presencia de biomasa de *S. cerevisiae* cultivada con aceite de argán difieren ligeramente de aquellas en las que se empleó *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control (Figura R.6.9.B), siendo la producción de etanol ligeramente más rápida cuando se empleó *S. cerevisiae* cultivada con aceite de argán, aunque los valores finales son siempre similares.



**Figura R.6.9:** Determinación del contenido de etanol durante la fermentación de mosto natural en **A)** fermentaciones sencillas y mixtas con *S. cerevisiae* cultivada con aceite de argán y *M. pulcherrima* procedente de diferentes condiciones de cultivo. En el panel **B)** aparecen representados los datos presentados de la figura R.6.5.B (líneas discontinuas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El estudio de la microbiota en las fermentaciones mixtas reveló que, como cabría esperar en base a lo descrito hasta el momento, la producción de etanol estuvo asociada a la proliferación de *S. cerevisiae*. En las vinificaciones mixtas el uso de biomasa de *S. cerevisiae* cultivada en presencia de aceite de argán resulta en una imposición más temprana de esta especie (Figura R.6.10) respecto a lo descrito en el apartado anterior (Figura R.6.6). En este caso, *S. cerevisiae* empezó a detectarse a partir del primer día de fermentación y en todos los casos analizados, alrededor del cuarto día de fermentación, *S. cerevisiae* era prácticamente la única especie presente en el mosto en vinificación. La proliferación más temprana de *S. cerevisiae* resulta en que esta acaba imponiéndose antes sobre *M. pulcherrima* que en las fermentaciones con *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control. Un hecho que seguramente esté ligado al efecto beneficioso del aceite de argán durante la propagación de la biomasa. Si bien no se encontraron diferencias en los parámetros tecnológicos analizados en la producción de biomasa de *S. cerevisiae* con aceite de argán (apartado 5.1), los resultados obtenidos en las vinificaciones parecen indicar que el cultivo en presencia de este compuesto tiene un efecto beneficioso sobre la vitalidad celular, que favorece una fermentación más rápida de los azúcares del mosto. Como se puede observar, en la fermentación mixta con *M. pulcherrima* cultivada en melaza diluida se produjo una mayor proliferación de *S. cerevisiae*, respecto de lo observado en las otras fermentaciones, aunque esto no supuso cambios en la cinética de fermentación. De cualquier modo, los resultados obtenidos parecen indicar que, como se describió en las vinificaciones mixtas con *H. vineae*, el efecto beneficioso del aceite de argán sobre la vitalidad celular de *S. cerevisiae* es mayor que el efecto de los distintos tratamientos sobre *M. pulcherrima*, lo que enmascara el efecto de estos y permite que *S. cerevisiae* se imponga antes.



**Figura R.6.10:** Evolución de la microbiota en las fermentaciones mixtas de *S. cerevisiae* (rojo) y *M. pulcherrima* (azul) con el tiempo. Se representa la abundancia relativa de cada una de las especies.

De nuevo, como se recoge en la Tabla R.6.6, el estudio de los parámetros químicos convencionales reveló que existen ligeras diferencias entre las fermentaciones mixtas y la sencilla. Igual que en el caso anterior, la presencia de *M. pulcherrima* resultó en una disminución ligera, pero estadísticamente significativa, de la concentración de ácido málico, una característica que podría ser interesante de cara a la reducción de la concentración de este ácido en el vino. En este caso no hay un impacto en el pH final. Tampoco se observó en estas fermentaciones una disminución de los niveles de etanol por la presencia de *M. pulcherrima*. Ya se ha descrito en el apartado anterior, que el metabolismo de *M. pulcherrima* durante las primeras etapas de la fermentación seguramente sea respiratorio, dado que no se observa producción de etanol. En este caso, además, la proliferación más temprana de *S. cerevisiae* dificultaría todavía más que se produjera una reducción de los niveles de etanol por la respiración de azúcares por parte de *M. pulcherrima*.

**Tabla R.6.6:** Parámetros químicos convencionales en los vinos finales, analizados mediante espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas.

	<i>S. cerevisiae</i> argán	<i>Sc</i> argán x <i>Mp</i> control	<i>Sc</i> argán x <i>Mp</i> argán	<i>Sc</i> argán x <i>Mp</i> HCl	<i>Sc</i> argán x <i>Mp</i> diluida
<b>Etanol (%)</b>	12.63 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>	12.91 ( $\pm$ 0.60) <sup>a</sup>	12.60 ( $\pm$ 0.35) <sup>a</sup>	12.90 ( $\pm$ 0.11) <sup>a</sup>	12.83 ( $\pm$ 0.21) <sup>a</sup>
<b>Glucosa (g/L)</b>	1.73 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>	1.80 ( $\pm$ 0.01) <sup>a</sup>	1.80 ( $\pm$ 0.01) <sup>a</sup>	1.77 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>	1.83 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>
<b>Fructosa (g/L)</b>	0.87 ( $\pm$ 0.11) <sup>a</sup>	1.00 ( $\pm$ 0.10) <sup>a</sup>	1.13 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>	1.07 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>	1.07 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>
<b>Acidez total (g/L)</b>	9.54 ( $\pm$ 0.03) <sup>a</sup>	9.43 ( $\pm$ 0.05) <sup>b</sup>	9.48 ( $\pm$ 0.14) <sup>ab</sup>	9.34 ( $\pm$ 0.04) <sup>b</sup>	9.50 ( $\pm$ 0.08) <sup>a</sup>
<b>Ácido málico (g/L)</b>	1.79 ( $\pm$ 0.02) <sup>a</sup>	1.67 ( $\pm$ 0.04) <sup>b</sup>	1.66 ( $\pm$ 0.05) <sup>b</sup>	1.63 ( $\pm$ 0.02) <sup>b</sup>	1.68 ( $\pm$ 0.02) <sup>b</sup>
<b>Ácido láctico (g/L)</b>	1.03 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>	1.03 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>	1.07 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>	1.00 ( $\pm$ 0.01) <sup>a</sup>	1.03 ( $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>
<b>pH</b>	3.34 ( $\pm$ 0.01) <sup>a</sup>	3.32 ( $\pm$ 0.01) <sup>a</sup>	3.32 ( $\pm$ 0.01) <sup>a</sup>	3.31 ( $\pm$ 0.01) <sup>a</sup>	3.31 ( $\pm$ 0.01) <sup>a</sup>
<b>Densidad (g/L)</b>	1.00 ( $\pm$ 0) <sup>a</sup>	1.00 ( $\pm$ 0) <sup>a</sup>	1.00 ( $\pm$ 0) <sup>a</sup>	1.00 ( $\pm$ 0) <sup>a</sup>	1.00 ( $\pm$ 0) <sup>a</sup>

En la Tabla R.6.7 se recogen los valores obtenidos del análisis de compuestos volátiles. En comparación con las fermentaciones sencillas, en las fermentaciones mixtas se detectaron niveles significativamente mayores de los alcoholes superiores n-propanol e isobutanol. También se detectaron niveles superiores de compuestos indeseados como el acetaldehído en las fermentaciones mixtas con *M. pulcherrima* control, cultivada con aceite de argán y en melaza hidrolizada, pero no en aquellas realizadas con LSA proveniente de cultivo en melaza diluida, que podría ser explicado por la más rápida proliferación de *S. cerevisiae* en este caso. Del mismo modo, los niveles de acetato de etilo aumentaron en fermentaciones con *M. pulcherrima* control y cultivada con aceite de argán, mientras que disminuyeron en las fermentaciones con LSA proveniente de melaza diluida y no se observaron diferencias cuando la biomasa procedió del cultivo en melaza hidrolizada. Por otro lado, también se observó un descenso de compuestos deseables en el vino, como el isoamil alcohol y pentanoles en las fermentaciones mixtas con los cuatro tipos de biomasa. Aunque en todos los casos

la concentración de los diferentes compuestos se mantuvo dentro de los valores normales en vino (Swiegers et al., 2005), en base a las variaciones de los compuestos volátiles estudiados, y a falta de realizar un análisis más completo de todos los compuestos volátiles producidos con un efecto sobre el perfil aromático del vino, seguramente se produzca un empeoramiento de la calidad organoléptica en los vinos producidos mediante fermentaciones mixtas.

**Tabla R.6.7:** Determinación de compuestos volátiles en los vinos finales, analizados mediante cromatografía de gases. Entre paréntesis se indica la desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas.

	<i>S. cerevisiae</i> argán	<i>Sc</i> argán x <i>Mp</i> control	<i>Sc</i> argán x <i>Mp</i> argán	<i>Sc</i> argán x <i>Mp</i> HCl	<i>Sc</i> argán x <i>Mp</i> diluida
Acetaldehído (mg/L)	49.92 (± 3.06) <sup>b</sup>	79.11 (± 9.80) <sup>a</sup>	65.51 (± 3.56) <sup>a</sup>	75.67 (± 8.28) <sup>a</sup>	43.02 (± 3.45) <sup>b</sup>
Metanol (mg/L)	47.84 (± 10.05) <sup>a</sup>	46.48 (± 8.05) <sup>a</sup>	45.33 (± 6.42) <sup>a</sup>	48.92 (± 3.25) <sup>a</sup>	46.51 (± 3.23) <sup>a</sup>
N-propanol (mg/L)	14.88 (± 0.35) <sup>b</sup>	16.84 (± 0.54) <sup>a</sup>	16.90 (± 0.31) <sup>a</sup>	16.35 (± 0.34) <sup>a</sup>	16.03 (± 0.58) <sup>a</sup>
Isobutanol (mg/L)	34.68 (± 1.48) <sup>b</sup>	51.91 (± 2.49) <sup>a</sup>	52.35 (± 1.15) <sup>a</sup>	52.59 (± 0.45) <sup>a</sup>	50.95 (± 5.86) <sup>a</sup>
N-butanol (mg/L)	14.18 (± 4.26) <sup>a</sup>	13.56 (± 5.46) <sup>a</sup>	13.58 (± 4.78) <sup>a</sup>	17.52 (± 0.79) <sup>a</sup>	18.44 (± 1.34) <sup>a</sup>
Pentanoles (mg/L)	72.81 (± 1.85) <sup>a</sup>	65.88 (± 1.96) <sup>b</sup>	60.12 (± 8.87) <sup>ab</sup>	66.19 (± 1.09) <sup>b</sup>	64.66 (± 5.34) <sup>ab</sup>
Isoamil alcohol (mg/L)	225.53 (± 1.63) <sup>a</sup>	214.06 (± 6.71) <sup>ab</sup>	203.43 (± 18.11) <sup>ab</sup>	205.72 (± 3.07) <sup>b</sup>	204.02 (± 16.61) <sup>ab</sup>
Acetoína (mg/L)	8.41 (± 2.27) <sup>a</sup>	12.29 (± 2.91) <sup>a</sup>	7.80 (± 2.55) <sup>a</sup>	11.47 (± 3.72) <sup>a</sup>	9.31 (± 2.25) <sup>a</sup>
Ácido acético (mg/L)	294.88 (± 48.71) <sup>a</sup>	347.40 (± 10.76) <sup>a</sup>	243.15 (± 0.78) <sup>b</sup>	340.44 (± 6.11) <sup>a</sup>	327.72 (± 23.37) <sup>a</sup>
Acetato de etilo (mg/L)	18.54 (± 0.22) <sup>b</sup>	20.94 (± 0.15) <sup>a</sup>	21.14 (± 1.28) <sup>ab</sup>	19.50 (± 0.73) <sup>b</sup>	10.07 (± 0.24) <sup>c</sup>

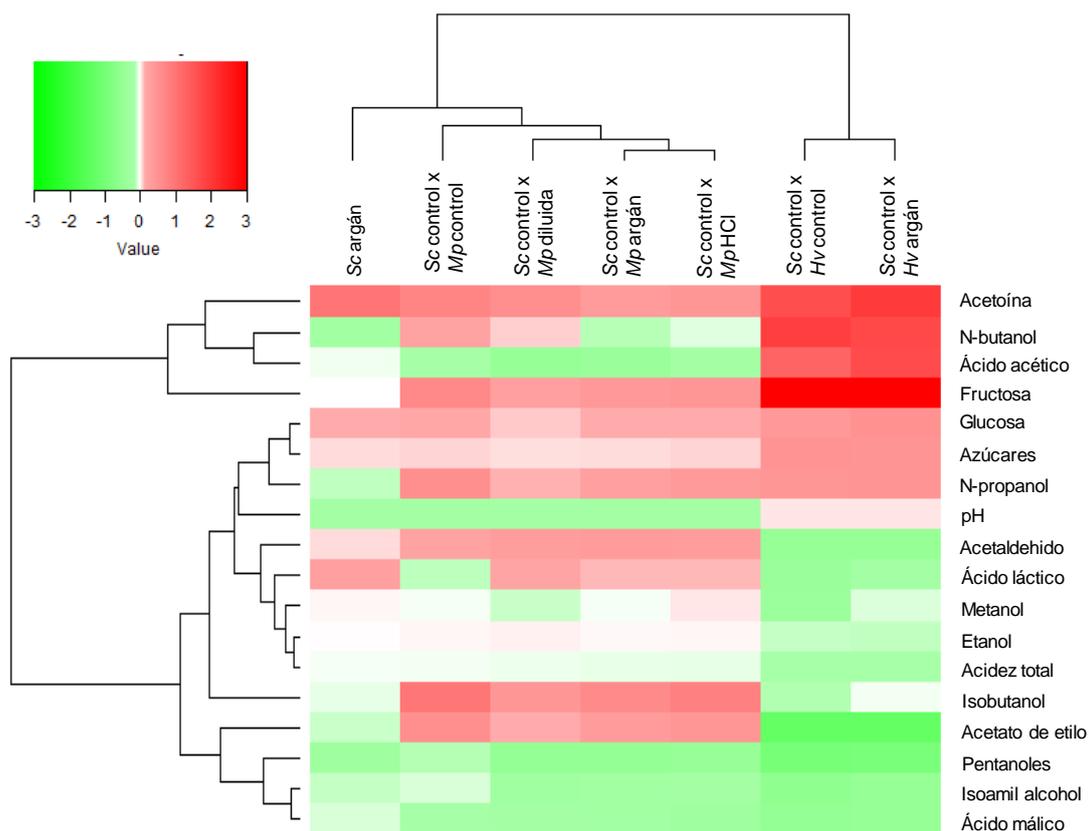
#### 6.4 Análisis comparativo de los vinos producidos en fermentaciones mixtas

Con el fin de obtener una visión global del efecto de los diferentes tipos de fermentación realizados sobre los parámetros analizados en el vino final y facilitar la comparación entre los vinos obtenidos con todas las fermentaciones ensayadas se trazaron mapas de calor, uno para las fermentaciones en las que se empleó *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control (Figura R.6.11) y otro para las fermentaciones en las que se empleó *S. cerevisiae* cultivada en presencia de aceite de argán (Figura R.6.12). En cada caso, los valores representados para cada uno de los parámetros analizados (filas) en los diferentes tipos de fermentación (columnas) son los

valores normalizados frente a los obtenidos en la fermentación sencilla con *S. cerevisiae* correspondiente, en escala logarítmica en base 2. Los parámetros cuyo valor es mayor que en el control aparecen representados en rojo, mientras que presentan un valor menor que en el control aparecen representados en verde. El agrupamiento tanto de los parámetros como del tipo de fermentación se obtuvo en base a su distancia euclídea.

En la Figura R.6.11 se muestra el mapa de calor con los valores obtenidos en las vinificaciones mixtas en las que se empleó *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control como referencia, comparándose con las fermentaciones mixtas y la vinificación sencilla de *S. cerevisiae* cultivada con aceite de argán. Como se puede observar, y de acuerdo con lo ya mencionado, el dendograma realizado muestra la similitud existente entre los vinos obtenidos en fermentaciones mixtas con *M. pulcherrima* y por otro lado la similitud entre los vinos producidos con *H. vineae*. Respecto a los parámetros, estos se agrupan de forma compleja, ya que, por ejemplo, los alcoholes superiores isoamil alcohol, propanol e isobutanol se agrupan, pero el n-butanol resulta más alejado, cuando todos proceden del metabolismo de los aminoácidos. El ácido láctico presenta un perfil próximo al acetaldehído, mientras que el ácido acético se agrupa con la acetoína. Las fermentaciones mixtas realizadas con ambas especies comparten una serie de características, como son un aumento de los niveles de acetoína, de los azúcares residuales y del propanol, así como una menor concentración de isoamil alcohol, pentanoles, metanol y de ácido málico. La principal diferencia entre los vinos producidos con las dos especies no-*Saccharomyces* radica en el aumento de la acidez volátil, consecuencia de la mayor acumulación de ácido acético en las fermentaciones mixtas con *H. vineae*. También se encuentran diferencias en la producción relativa de acetaldehído y acetato de etilo, mientras que en las fermentaciones mixtas con *M. pulcherrima* la concentración de estos dos compuestos es mayor que en las fermentaciones sencillas, en las fermentaciones mixtas con *H. vineae* se observa lo contrario. La presencia de aceite de argán en la fermentación sencilla supone un aumento de acetoína y ácido láctico y una reducción de n-butanol y pentanoles, lo que indica que la presencia de aceite durante la producción de biomasa puede tener leves efectos en el perfil organoléptico del producto final.

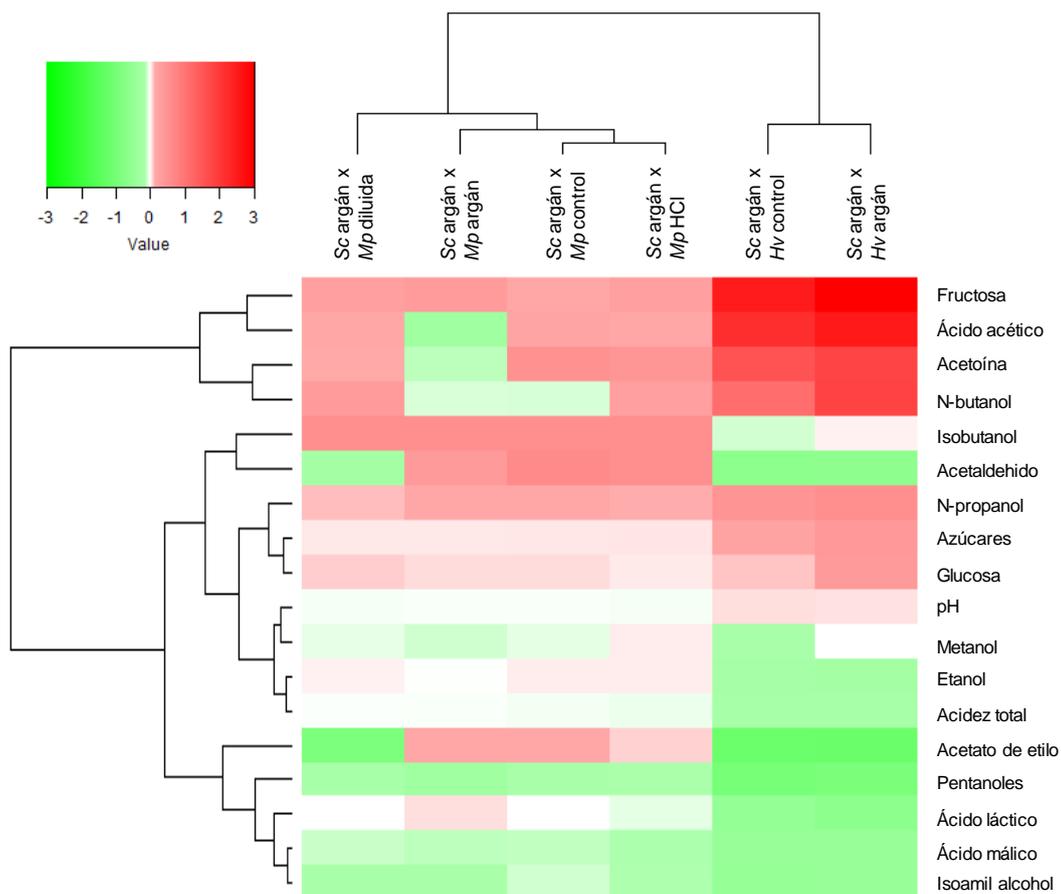
## Resultados y Discusión



**Figura R.6.11:** Análisis comparativo de parámetros enológicos en fermentaciones de mosto natural. Se representa el  $\text{Log}_2$  de cada parámetro (fila) en las diferentes fermentaciones (columnas) con *H. vineae* (*Hv*) y *M. pulcherrima* (*Mp*) normalizado frente al valor obtenido en fermentaciones sencillas con *S. cerevisiae* (*Sc*) cultivada en condiciones control. La leyenda de colores indica la variación de valores desde el más bajo (verde) al más alto (rojo). El agrupamiento de las diferentes condiciones y de los parámetros se obtuvo mediante distancia euclídea.

En la Figura R.6.12 se muestra el mapa de calor con los valores obtenidos en las vinificaciones mixtas en las que se empleó *S. cerevisiae* cultivada en presencia de aceite de argán, normalizados frente a los valores obtenidos en la vinificación sencilla con *S. cerevisiae* cultivada en presencia de aceite de argán. De nuevo, las fermentaciones mixtas realizadas con *M. pulcherrima* cultivada bajo diferentes condiciones agruparon juntas, ya que compartieron una serie de características comunes, igual que sucedió con las dos fermentaciones distintas con *H. vineae*. Del mismo modo que cuando se empleó *S. cerevisiae* cultivada en condiciones control, en este caso los vinos procedentes de fermentaciones mixtas con ambas especies compartieron una serie de parámetros en comparación con los vinos obtenidos tras fermentación sencilla con *S. cerevisiae* cultivada con aceite de argán, como fueron una mayor concentración de

azúcares residuales, de acetoína y de n-propanol. Además, aunque existen diferencias evidentes entre especies, los vinos producidos con *M. pulcherrima* y *H. vineae* también mostraron mayor acumulación de ácido acético. Del mismo modo, igual que se ha descrito en fermentaciones con *S. cerevisiae* control, los vinos procedentes de fermentaciones mixtas presentaron una menor concentración de ácido málico, isoamil alcohol y pentanoles. Cuando *S. cerevisiae* y *M. pulcherrima* han sido tratadas con aceite de argán se produce una bajada del ácido acético y un aumento del ácido láctico que no se da en otras combinaciones, y que podría ser interesante estudiar en detalle.



**Figura R.6.12:** Análisis comparativo de parámetros enológicos en fermentaciones de mosto natural. Se representa el  $\text{Log}_2$  de cada parámetro (fila) en las diferentes fermentaciones (columnas) con *H. vineae* (*Hv*) y *M. pulcherrima* (*Mp*) normalizado frente al valor obtenido en fermentaciones sencillas con *S. cerevisiae* (*Sc*) cultivada en presencia de aceite de argán. La leyenda de colores indica la variación de valores desde el más bajo (verde) al más alto (rojo). El agrupamiento de las diferentes condiciones y de los parámetros se obtuvo mediante distancia euclídea.

## 6.5 Discusión general

En esta sección se ha analizado la producción de vinos mediante fermentaciones mixtas de un mosto natural, empleando LSA de *S. cerevisiae*, *H. vineae* y *M. pulcherrima* cultivada bajo diferentes condiciones. En los últimos años, el efecto de la presencia durante las primeras etapas de la fermentación de especies no-*Saccharomyces* sobre los parámetros organolépticos del vino ha sido objeto de numerosos estudios que han dejado patente el potencial efecto beneficioso de estas especies (revisado en Morata et al., 2020 y en Varela, 2016). En el caso de *H. vineae*, su interés reside en su buena capacidad fermentativa, la actividad  $\beta$ -glucosidasa y la elevada producción de ésteres como el acetato de etilo y el acetato de 2-feniletilo (Lleixà et al., 2016; López et al., 2015; Martín et al., 2018; Viana et al., 2011). En el caso de *M. pulcherrima* gran parte del trabajo se ha centrado en su uso como iniciador para la reducción del contenido en etanol en el vino (Contreras et al., 2014; Puškaš et al., 2020; Quirós et al., 2014; Ruiz et al., 2018), sin dejar de lado el análisis de su efecto sobre la producción de compuestos secundarios aromáticos o como agente de biocontrol en vino (Morata et al., 2019; Oro et al., 2014).

En primer lugar, se observó que el cultivo con aceite de argán ejerce un efecto beneficioso sobre la vitalidad celular. Este efecto queda especialmente patente al analizar las cinéticas de fermentación y la proliferación de *S. cerevisiae* en las fermentaciones mixtas. En aquellas en las que la biomasa de *S. cerevisiae* procedió del cultivo con aceite de argán la velocidad de fermentación fue ligeramente más rápida, debido a una proliferación más temprana de esta especie, que en los casos en los que se empleó biomasa cultivada en condiciones control. Estas observaciones, sumadas al efecto beneficioso del aceite de argán sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en condiciones de propagación de la biomasa, lo convierten en un compuesto muy interesante para la mejora de la producción industrial de *S. cerevisiae*.

En las vinificaciones mixtas con *H. vineae* se observó como el tiempo de fermentación fue mucho más prolongado respecto de las fermentaciones sencillas, debido probablemente a su elevada producción de ácido acético, que causa una proliferación lenta de *S. cerevisiae*. No obstante, la cinética de fermentación reveló la buena capacidad fermentativa de *H. vineae* en las primeras etapas de fermentación, aunque fue incapaz de finalizarla debido a la acumulación de etanol. La buena capacidad de crecimiento de *H. vineae* en el mosto (rico en glucosa y fructosa) no hace más que evidenciar que los problemas de crecimiento observados en melaza se deben a su incapacidad de metabolizar la sacarosa.

La composición del vino final obtenido en fermentaciones mixtas con *H. vineae* varió respecto las fermentaciones sencillas, siendo una de las diferencias más destacables la sobreacumulación de ácido acético por encima de los niveles considerados óptimos en vino, una característica asociada a levaduras apiculadas (Ciani y Picciotti, 1995), y que tendría un efecto muy negativo sobre el perfil organoléptico del vino. También se detectaron variaciones en otros compuestos, que, en algunos casos, no coincidieron con lo observado por otros autores, como la disminución del acetato de etilo. A pesar de esto, sería interesante realizar un análisis completo de los compuestos volátiles característicos del vino, para acabar de determinar el efecto de *H. vineae*, ya que la mayor proporción de compuestos como propanol y butanol puede darle unas características distintivas al producto.

En el caso de las vinificaciones de *M. pulcherrima* con *S. cerevisiae*, los tiempos de fermentación fueron notablemente más cortos que en el caso anterior, debido a la rápida proliferación de *S. cerevisiae*. A pesar de que en las etapas iniciales de la fermentación se produjo un consumo lento de los azúcares del mosto por parte de *M. pulcherrima*, posiblemente por vía respiratoria, no se observó una reducción del grado alcohólico en los vinos finales. En la Introducción se ha mencionado el potencial uso de *M. pulcherrima* para la reducción del contenido en etanol de los vinos una cualidad muy buscada en la industria enológica, que se explica por el metabolismo respiratorio de *M. pulcherrima* en las fases iniciales de la vinificación, y que ha sido descrita por numerosos autores (Contreras et al., 2014; Puškaš et al., 2020; Quirós et al., 2014; Ruiz et al., 2018). En general, en los trabajos citados se recurrió a la aireación controlada de los mostos para favorecer la respiración de los azúcares por parte de *M. pulcherrima*, además, la inoculación secuencial empleada en dichos trabajos facilita la proliferación de *M. pulcherrima* en las etapas iniciales de la fermentación. Estas diferencias en las condiciones de cultivo podrían explicar que no se haya detectado una reducción del contenido de etanol en las fermentaciones mixtas. Además, ya se ha descrito en la sección anterior que en cultivos en melaza es necesaria la aireación del medio para que *M. pulcherrima* metabolice los azúcares por vía respiratoria, por lo que cabría esperar que sucediera lo mismo en condiciones de vinificación. La rápida producción de etanol por parte de *S. cerevisiae* parece ser determinante en que esta se acabe imponiendo sobre *M. pulcherrima* y sea la encargada de finalizar la fermentación. No obstante, la influencia de *M. pulcherrima* en las características del vino final queda patente si se analizan las diferencias en la composición de los vinos obtenidos en fermentaciones mixtas respecto de las fermentaciones sencillas. En los vinos obtenidos a partir de fermentaciones mixtas con *M. pulcherrima*, independientemente del tipo de biomasa de

*S. cerevisiae* empleada, se detectó una mayor concentración de acetato de etilo, lo que estaría de acuerdo con lo descrito por Varela et al., (2016), sin embargo, al contrario que en el citado trabajo, en el que la acumulación de dicho éster superó el umbral a partir del cual se considera negativo, los valores de acetato de etilo en detectados en este trabajo se encuentran dentro de los valores aceptables en vino (22.5 – 63.5 mg/L). y su contribución podría ser positiva. La concentración de acetaldehído también fue superior que en fermentaciones sencillas, tal y como describen en su trabajo Puškaš et al., (2020), pero lejos de niveles preocupantes. Se observó además un aumento de la concentración de ciertos alcoholes superiores, como el propanol y el isobutanol, de acuerdo con la elevada capacidad de producción de este alcohol descrita por otros autores (Comitini et al., 2011; Seguinot et al., 2020). Por otro lado, la concentración de otros alcoholes superiores, como el isoamil alcohol y el propanol, fue menor que en fermentaciones sencillas, de manera que el perfil aromático es definitivamente alterado por la fermentación mixta, en una dirección que debería ser evaluada por un panel de cata.

Los resultados obtenidos no hacen más que evidenciar la influencia de la presencia de especies no-*Saccharomyces* durante la fermentación sobre la composición de los vinos obtenidos. En ambos casos sería necesaria una caracterización más profunda de los niveles de compuestos volátiles para determinar por completo el efecto de la fermentación mixta. Por ejemplo, sería interesante hacer un análisis completo de los ésteres presentes en el vino, para determinar si la menor concentración de ciertos alcoholes superiores detectada en algunos casos implica que se están sintetizando en mayor medida sus respectivos ésteres, cuya presencia es deseable para mejorar el perfil aromático del vino. De igual modo, sería interesante analizar los niveles de terpenos volátiles liberados de los constituyentes de la uva por enzimas en las que son ricas las levaduras no convencionales, para acabar de determinar el efecto de la presencia de estas levaduras en la composición del vino. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que la composición del vino dependerá no solo de las levaduras empleadas en la fermentación, sino también del tipo de mosto empleado, de las condiciones de inoculación (co-inoculación o inoculación secuencial) y de las condiciones de fermentación. Por tanto, sería necesario determinar las condiciones óptimas de fermentación para potenciar el papel de las especies no-*Saccharomyces* y así poder asegurar que el vino obtenido posee las características buscadas en cada caso.

Más allá del efecto sobre la composición de los compuestos volátiles de cada una de las especies, los resultados presentados en esta sección revelan que en ningún caso los diferentes tratamientos aplicados durante la propagación de la biomasa empleada

para las vinificaciones tuvieron un efecto negativo sobre los parámetros de fermentación analizados, lo cual facilitaría la implementación de aquellos tratamientos que resultaran beneficiosos para la propagación industrial de levaduras no-*Saccharomyces*.



## **Conclusiones**

---

## Conclusiones

1. Todas las especies de levaduras no-*Saccharomyces* analizadas fueron capaces de crecer en simulaciones del proceso industrial de propagación de biomasa en melaza, aunque, en general, su crecimiento fue menor al del control comercial de *S. cerevisiae* empleado. *Z. bailii* y *S. bacillaris* crecieron a niveles comparables a los *S. cerevisiae*. Aunque ninguna de las especies analizadas fue tan buena fermentadora como *S. cerevisiae*, sí que se observó una mejor capacidad de supervivencia a la deshidratación en *M. pulcherrima*, *M. fructicola* y *S. bacillaris*. *H. vineae* fue especialmente sensible a la deshidratación.
2. La baja actividad invertasa mostrada por la mayoría de especies no-*Saccharomyces* explica parcialmente el menor crecimiento de estas en melaza. *T. delbrueckii* y *S. bacillaris* presentaron una actividad invertasa y una tasa de consumo de sacarosa similares a las de *S. cerevisiae*.
3. El estudio de biomarcadores de respuesta a estrés oxidativo reveló una elevada heterogeneidad en la respuesta de las diferentes especies. A diferencia de *S. cerevisiae*, la mayoría de especies no acumulan trehalosa. Las especies con una mayor viabilidad tras la deshidratación comparten una actividad catalasa anormalmente elevada, una alta acumulación de glutatión y una actividad glutatión reductasa mayor que *S. cerevisiae*.
4. Las diferencias en la composición lipídica de las especies *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* y *H. vineae* ayudan a explicar las diferencias de comportamiento en condiciones de deshidratación. La composición lipídica de *M. pulcherrima*, rica en ácidos grasos mono y poliinsaturados y ergosterol, es consistente con una mayor fluidez de membrana, mientras que los bajos niveles de ácido oleico y el alto porcentaje de ácido linoleico detectados en *H. vineae* son característicos de una mayor rigidez de membrana, que ayudan a explicar su pobre comportamiento durante el secado. La deshidratación no causó cambios en la composición lipídica, indicando que la remodelación de lípidos no es un mecanismo adaptativo en estas circunstancias.
5. El tratamiento con aceite de argán durante el cultivo en melaza supuso una mejora del crecimiento celular en prácticamente todas las especies y una clara mejora de la viabilidad de la LSA de *W. anomalus* y *H. vineae*. Este efecto está asociado, en general, a una menor peroxidación lipídica, una mayor acumulación de trehalosa, un aumento de la relación GSH/GSSG y una disminución de la actividad catalasa.

## Conclusiones

6. El tratamiento de diferentes cepas de *S. cerevisiae* con aceites de grado alimentario alternativos al aceite de argán durante la propagación de la biomasa resultó en mejoras tecnológicas dependientes del aceite y la cepa analizados. En general, los aceites empleados promovieron una reducción de la peroxidación lipídica y una mejora de los biomarcadores de respuesta a estrés oxidativo empleados. En base a los resultados obtenidos y su reducido coste, el aceite de girasol parece ser una buena alternativa para su uso como agente antioxidante en el proceso de propagación de biomasa.
7. La adaptación de las condiciones de cultivo a los requerimientos de cada especie es la vía principal para la mejora de la eficiencia tecnológica de las levaduras no-*Saccharomyces*. El cultivo en medios con monosacáridos como fuente de carbono principal, como la melaza hidrolizada con HCl, supuso una mejora del crecimiento celular de las especies con una pobre capacidad de metabolizar la sacarosa, *H. vineae*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*, sin que el rendimiento o la viabilidad de la LSA se vieran afectados negativamente.
8. Simulaciones a escala de biorreactor han revelado que las condiciones de cultivo óptimas para la producción de *S. cerevisiae*, con fases *batch* y *fed-batch* acopladas, no son adecuadas para la producción de las levaduras no-*Saccharomyces* analizadas, debido a sus diferencias metabólicas con *S. cerevisiae*. El mayor control sobre las condiciones de cultivo a escala de biorreactor permite la obtención de LSA con una mayor viabilidad que en simulaciones a escala de laboratorio. El proceso de producción de biomasa ha de ser adaptado y optimizado en función de los requerimientos de cada especie. En el caso de *H. vineae* se debe utilizar un medio de cultivo con monosacáridos y en el caso de *M. pulcherrima* un crecimiento *batch* con aireación extendido en el tiempo.
9. Los vinos producidos mediante fermentaciones mixtas con LSA de *H. vineae* y *M. pulcherrima* difieren en su composición de los vinos producidos únicamente con LSA de *S. cerevisiae*. El uso de biomasa procedente de diferentes condiciones de cultivo reveló que el aceite de argán tiene un efecto beneficioso sobre la vitalidad celular de *S. cerevisiae*, pero no en las levaduras no-*Saccharomyces*, y que las adaptaciones del proceso de propagación de la biomasa que se han diseñado en ningún caso tuvieron un efecto perjudicial sobre la capacidad de fermentar los azúcares del mosto ni sobre la producción de los compuestos volátiles de interés enológico analizados.

## **Bibliografía**

---



- Abeln, F., Chuck, C.J., 2019. Achieving a high-density oleaginous yeast culture: Comparison of four processing strategies using *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol. Bioeng.* 116, 3200–3214. <https://doi.org/10.1002/bit.27141>
- Abenavoli, L., Milanović, M., Milić, N., Lizza, F., Giuffrè, A.M., 2019. Olive oil antioxidants and non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 739–749. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1634544>
- Aiba, S., Nagai, S., Nishi, Y., 1976. Fed Batch Culture of *Saccharomyces cerevisiae*: A Perspective of Computer Control to Enhance the Productivity in Baker's Yeast Cultivation. *Biotechnol. Bioeng.* XVIII, 1001–1016.
- Akbari, H., Karimi, K., Lundin, M., Taherzadeh, M.J., 2012. Optimization of baker's yeast drying in industrial continuous fluidized bed dryer. *Food Bioprod. Process.* 90, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.12.005>
- Akbas, M.Y., Stark, B.C., 2016. Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1593–1609. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1821-z>
- Ale, C., Otero, M., Pasteris, S., 2015. Freeze-Drying of Wine Yeasts and *Oenococcus oeni* and Selection of the Inoculation Conditions after Storage. *J. Bioprocess. Biotech.* 05. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000248>
- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B., 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 498, 98–103. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02503-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02503-0)
- Amari, F., Fettouche, A., Abou Samra, M., Kefalas, P., Kampranis, S.C., Makris, A.M., 2008. Antioxidant Small Molecules Confer Variable Protection against Oxidative Damage in Yeast Mutants. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11740–11751.
- Amari, Foued, Fettouche, A., Abou Samra, M., Kefalas, P., Kampranis, S.C., Makris, A.M., 2008. Antioxidant small molecules confer variable protection against oxidative damage in yeast mutants. *J. Agric. Food Chem.* 11740–11751. <https://doi.org/10.1021/jf802829r>
- Amerine, M.A., 1980. *The Technology of Wine making*, 4th ed. The AVI Publishing Company, Connecticut.
- Andrisic, L., Collinson, E.J., Tehlivets, O., 2014. Transcriptional and antioxidative responses to endogenous polyunsaturated fatty acid accumulation in yeast. *Mol. Cell Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2229-6>
- Aranda, A., 2019. Enological repercussions of non-*Saccharomyces* species. *Fermentation* 5, 12–15. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030068>
- Aranda, A., Orozco, H., Picazo, C., Matallana, E., 2019. Yeast Life Span and its Impact on Food

## Bibliografia

- Fermentations. *Fermentation* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3390/fermentation5020037>
- Arez, B.F., Alves, L., Paixão, S.M., 2014. Production and Characterization of a Novel Yeast Extracellular Invertase Activity Towards Improved Dibenzothiophene Biodesulfurization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 2048–2057. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1182-x>
- Argüelles, J.C., 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 174, 217–224.
- Armstrong, G.A., Hearst, J.E., 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10, 228–237. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.2.8641556>
- Auesukaree, C., 2017. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 124, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.009>
- Avery, S. V., 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* 434, 201–210. <https://doi.org/10.1042/BJ20101695>
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bagheri, B., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2015. The diversity and dynamics of indigenous yeast communities in grape must from vineyards employing different agronomic practices and their influence on wine fermentation. *South African J. Enol. Vitic.* 36, 243–251. <https://doi.org/10.21548/36-2-957>
- Bakour, M., Soulo, N., Hammas, N., El Fatemi, H., Aboulghazi, A., Taroq, A., Abdellaoui, A., Al-Waili, N., Lyoussi, B., 2018. The antioxidant content and protective effect of argan oil and *syzygium aromaticum* essential oil in hydrogen peroxide-induced biochemical and histological changes. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19020610>
- Ballweg, S., Ernst, R., 2017. Control of membrane fluidity: The *OLE* pathway in focus. *Biol. Chem.* 398, 215–228. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0277>
- Barbosa, C., Lage, P., Esteves, M., Chambel, L., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2018. Molecular and phenotypic characterization of *Metschnikowia pulcherrima* strains from Douro Wine Region. *Fermentation* 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010008>
- Barnett, J.A., 2000. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* 16, 755–771. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<755::AID-YEA587>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<755::AID-YEA587>3.0.CO;2-4)
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review. *South African J. Enol. Vitic.* 21, 27–51.

- Bavaresco, L., Lucini, L., Busconi, M., Flamini, R., de Rosso, M., 2016. Wine resveratrol: From the ground up. *Nutrients* 8. <https://doi.org/10.3390/nu8040222>
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., Benito, S., 2015. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1911–1922. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6197-2>
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., Santos, A., 2017. Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>
- Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., De Schutter, D.P., Daenen, L., Lynch, K.M., Zannini, E., Arendt, E.K., 2018. Application of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. *Fermentation.* 4, 66. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030066>
- Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2008. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.030>
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Beney, L., Gervais, P., 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57, 34–42. <https://doi.org/10.1007/s002530100754>
- Benito, S., 2018. The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3081–3094. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J., Rauhut, D., 2015. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Palmero, D., Suárez-Lepe, J.A., 2013. Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* 236, 29–36. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1836-2>
- Bentinger, M., Brismar, K., Dallner, G., 2007. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 7. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.006>
- Beudeker, R.F., van Dam, H.W., van der Plaat, J.B., Vellenga, K., 1990. Developments in bakers'

## Bibliografia

- yeast production, in: Verachtert, H., De Mot, R. (Eds.), *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 103–146.
- Beyer, R.E., 1992. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem. Cell Biol.* 70.
- Binati, R.L., Lemos Junior, W.J.F., Luzzini, G., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., Torriani, S., 2020. Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 318, 108470. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108470>
- Bisquert, R., Muñoz-Calvo, S., Guillamón, J.M., 2018. Protective role of intracellular Melatonin against oxidative stress and UV radiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00318>
- Blanco, C.A., Rayo, J., Giralda, J.M., 2008. Improving industrial full-scale production of baker's yeast by optimizing aeration control. *J. AOAC Int.* 91, 607–613. <https://doi.org/10.1093/jaoac/91.3.607>
- Blázquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C., Gancedo, J.M., 1993. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.* 329, 51–54. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80191-V](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80191-V)
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., Mills, D.A., 2012. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035507>
- Borneman, A.R., Pretorius, I.S., 2015. Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics* 199, 281–291. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173633>
- Borovikova, D., Rozenfelde, L., Pavlovska, I., Rapoport, A., 2014. Immobilisation increases yeast cells' resistance to dehydration-rehydration treatment. *J. Biotechnol.* 184, 169–171. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.017>
- Boscaino, F., Ionata, E., La Cara, F., Guerriero, S., Marcolongo, L., Sorrentino, A., 2019. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia fructicola* autochthonous mixed starter on Aglianico wine volatile compounds. *J. Food Sci. Technol.* 56, 4982–4991. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03970-9>
- Bossie, M.A., Martin, C.E., 1989. Nutritional Regulation of Yeast  $\Delta$ -9 Fatty Acid Desaturase Activity. *J. Bacteriol.* 171, 6409–6413.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E., 1996. Principles and practices of winemaking. Chapman, New York, NY.
- Bower, S., Wickramasinghe, R., Nagle, N.J., Schell, D.J., 2008. Modeling sucrose hydrolysis in

- dilute sulfuric acid solutions at pretreatment conditions for lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 99, 7354–7362. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.045>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bravo, S.M.E., Morales, M., del Mónaco, S.M., Caballero, A.C., 2019. Apple bagasse as a substrate for the propagation of Patagonian wine yeast biomass. *J. Appl. Microbiol.* 126, 1414–1425. <https://doi.org/10.1111/jam.14216>
- Broach, J.R., 2012. Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* 192, 73–105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Cabrera-Vique, C., Marfil, R., Giménez, R., Martínez-Augustin, O., 2012. Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil - an edible oil with potential as a functional food. *Nutr. Rev.* 70, 266–279. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00478.x>
- Calahan, D., Dunham, M., Desevo, C., Koshland, D.E., 2011. Genetic analysis of desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 189, 507–519. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130369>
- Câmara, A. de A., Maréchal, P.A., Tourdot-Maréchal, R., Husson, F., 2019a. Oxidative stress resistance during dehydration of three non-*Saccharomyces* wine yeast strains. *Food Res. Int.* 123, 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.059>
- Câmara, A. de A., Maréchal, P.A., Tourdot-Maréchal, R., Husson, F., 2019b. Dehydration stress responses of yeasts *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*: Effects of glutathione and trehalose biosynthesis. *Food Microbiol.* 79, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.008>
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., Ciani, M., 2016. *Torulaspota delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiol.* 56, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>
- Canonico, L., Solomon, M., Comitini, F., Ciani, M., Varela, C., 2019. Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-*Saccharomyces* yeasts under different aeration conditions. *J. Food Microbiol.* 84, 103247. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103247>
- Carlson, M., Botstein, D., 1983. Organization of the *SUC* gene family in *Saccharomyces*. *Mol. Cell. Biol.* 3, 351–359. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.3.351>
- Casey, G.P., Ingledew, W.M.M., 1986. Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13, 219–280. <https://doi.org/10.3109/10408418609108739>

## Bibliografia

- Castrillo, D., Rabuñal, E., Neira, N., Blanco, P., 2019. Oenological potential of non-*Saccharomyces* yeasts to mitigate effects of climate change in winemaking: impact on aroma and sensory profiles of Treixadura wines. *FEMS Yeast Res.* 19. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz065>.
- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A.M., Keller, J.N., 2007. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1773, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.039>
- Charrouf, Z., Guillaume, D., 2010. Should the amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 473–477. <https://doi.org/10.1080/10408390802544520>
- Chua, J.Y., Lu, Y., Liu, S.Q., 2018. Evaluation of five commercial non-*Saccharomyces* yeasts in fermentation of soy (tofu) whey into an alcoholic beverage. *Food Microbiol.* 76, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.016>
- Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J., Eitenmiller, R.R., 2006. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *J. Food Compos. Anal.* 19, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.08.001>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P., 2010. Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10, 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J.A., Oro, L., Rodrigues, A.J., Gonzalez, R., 2016. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Front. Microbiol.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00642>
- Ciani, M., Picciotti, G., 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol. Lett.* 17, 1247–1250. <https://doi.org/10.1007/BF00128395>
- Cipak, A., Jaganjac, M., Tehlivets, O., Kohlwein, S.D., Zarkovic, N., 2008. Adaptation to oxidative stress induced by polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1781, 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.03.010>
- Comitini, F., Ciani, M., 2011. *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: Purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol. Lett.* 316, 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02194.x>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>

- Conant, G.C., Wolfe, K.H., 2007. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 3. <https://doi.org/10.1038/msb4100170>
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Zeebroeck, G. Van, Rubio-texeira, M., Thevelein, J.M., 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microb. Rev.* 38, 254–299. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P.A., Curtin, C., Varela, C., 2015. The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027>
- Cooney, C.L., Wang, H.Y., Wang, D.I.C., 1977. Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 55–67. <https://doi.org/10.1002/bit.260190106>
- Cotelle, N., 2001. Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 569–590. <https://doi.org/10.2174/1568026013394750>
- Couto, N., Wood, J., Barber, J., 2016. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.* 95, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M., 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599.
- Dani, C., Bonatto, D., Salvador, M., Pereira, M.D., Henriques, J.A.P., Eleutherio, E., 2008. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4268–4272. <https://doi.org/10.1021/jf800752s>
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., Dickson, R., 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1471–1510. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199812\)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y)
- De Dekken, R.H., 1966. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast 149–156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>
- Degre, R., 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria, in: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland, pp. 421–448.
- Díaz-Hellín, P., Gómez-Alonso, S., Borrull, A., Rozès, N., Cordero-Otero, R., Úbeda, J., 2014. Membrane lipid variability in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains rehydrated in the presence of metabolic activators. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8679–8685.

## Bibliografia

<https://doi.org/10.1021/jf500895y>

- Dimster-Denk, D., Rine, J., 1996. Transcriptional regulation of a sterol-biosynthetic enzyme by sterol levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3981–3989. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.8.3981>
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>
- Drissi, A., Girona, J., Cherki, M., God, G., Derouiche, A., El, M., Saile, R., Masana, L., Adlouni, A., Kettani, A., Sol, R., 2004. Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*) 1159–1166. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.03.003>
- Du, J., Cullen, J.J., Buettner, G.R., 2012. Biochimica et Biophysica Acta Ascorbic acid: Chemistry , biology and the treatment of cancer. *BBA - Rev. Cancer* 1826, 443–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003>
- Duarte, F.L., Pimentel, N.H., Teixeira, A., Fonseca, A., 2012. *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: Reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 102, 653–658. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9762-7>
- Dupont, S., Beney, L., Ritt, J.F., Lherminier, J., Gervais, P., 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1798, 975–985. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.01.015>
- Dupont, S., Rapoport, A., Gervais, P., Beney, L., 2014. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8821–8834. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6028-5>
- Duval, C., Augé, N., Frisach, M.F., Casteilla, L., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A., 2002. Mitochondrial oxidative stress is modulated by oleic acid via an epidermal growth factor receptor-dependent activation of glutathione peroxidase. *Biochem. J.* 367, 889–894. <https://doi.org/10.1042/BJ20020625>
- El Abbassi, A., Khalid, N., Zbakh, H., Ahmad, A., 2014. Physicochemical Characteristics, Nutritional Properties, and Health Benefits of Argan Oil: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 1401–1414. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.638424>
- El Midaoui, A., Haddad, Y., Couture, R., 2016. Beneficial effects of argan oil on blood pressure, insulin resistance, and oxidative stress in rat. *Nutrition* 32, 1132–1137. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.02.021>

- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D., 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Cryobiology* 13, 17–27. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J.F., Trevisol, E., Magalhães, R., 2015. Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr. Genet.* 61, 263–274. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0450-1>
- Eleutherio, E.C.A., de Araujo, P.S., Panek, A.D., 1993. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1156, 263–266. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(93\)90040-F](https://doi.org/10.1016/0304-4165(93)90040-F)
- Englezos, V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L., Cocolin, L., 2017. *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.08.007>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L., 2016. *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5515–5526. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7413-z>
- Ernst, R., Ejsing, C.S., Antony, B., 2016. Homeoviscous Adaptation and the Regulation of Membrane Lipids. *J. Mol. Biol.* 428, 4776–4791. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.013>
- Escalante, W.E., Rychtera, M., Melzoch, K., Sakoda, B.H., Polo, E.Q., Cervantes, Z.L., Casavilca, V.S., Quilca, G.C., 2011. Actividad fermentativa de *Hanseniaspora uvarum* y su importancia en la producción de bebidas fermentadas. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.* 31, 57–63.
- Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., Gutiérrez, A.R., González-Arenzana, L., 2019. Effect of the sequential inoculation of *non-Saccharomyces/Saccharomyces* on the anthocyanins and stilbenes composition of tempranillo wines. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00773>
- Espindola, A.D.S., Gomes, D.S., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2003. The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiology* 47, 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.003>
- Esterbauer, H., Eckl, P., Ortner, A., 1990. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat. Res.* 238, 223–233. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(90\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90014-3)
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329–337. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., Quero, A., 1998. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int. Microbiol.* 1, 143–148. <https://doi.org/10.2436/im.v1i2.59>

## Bibliografia

- Farkas, I., Hardy, T.A., Goebbt, M.G., Roach, P.J., 1991. Two Glycogen Synthase Isoforms in. *J. Biol. Chem.* 15602–15607.
- Filip, S., Hribar, J., Vidrih, R., 2011. Influence of natural antioxidants on the formation of trans-fatty-acid isomers during heat treatment of sunflower oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 224–230. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900231>
- Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- Fleet, G.H., 2007. Wine, in: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, DC, pp. 863–890.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034–1038.
- França, M.B., Panek, A.D., Araujo Eleutherio, E.C., 2005. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones* 10, 167–170. <https://doi.org/10.1379/CSC-103R.1>
- França, M.B., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146, 621–631. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.030>
- François, J., Parrou, J.L., 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 125–145. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00059-0)
- Fredlund, E., Blank, L.M., Schnürer, J., Sauer, U., Passoth, V., 2004. Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5905–5911. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5905-5911.2004>
- Fredlund, E., Druvefors, U., Boysen, M.E., Lingsten, K.J., Schnürer, J., 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Res.* 2, 395–402. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00098-3)
- Gamero-Sandemetrio, E., Gómez-Pastor, R., Aranda, A., Matallana, E., 2019. Validation and biochemical characterisation of beneficial argan oil treatment in biomass propagation for industrial active dry yeast production. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 51, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.024>
- Gamero-Sandemetrio, E., Gómez-Pastor, R., Matallana, E., 2014. Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. *Biotechnol. J.* 9, 1055–1064. <https://doi.org/10.1002/biot.201300448>
- Gamero-Sandemetrio, E., Payá-Tormo, L., Gómez-Pastor, R., Aranda, A., Matallana, E., 2018.

- Non-canonical regulation of glutathione and trehalose biosynthesis characterizes non-*Saccharomyces* wine yeasts with poor performance in active dry yeast production. *Microb. Cell* 5, 184–197. <https://doi.org/10.15698/mic2018.04.624>
- Gamero-Sandemetrio, E., Torrellas, M., Rábena, M.T., Gómez-Pastor, R., Aranda, A., Matallana, E., 2015. Food-grade argan oil supplementation in molasses enhances fermentative performance and antioxidant defenses of active dry wine yeast. *AMB Express* 5, 75. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0159-7>
- Gan, Z.R., 1991. Yeast thioredoxin genes. *J. Biol. Chem.* 266, 1692–1696.
- Garre, E., Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcañiz, J. V., Matallana, E., 2009. Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 9, 52–62. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00453.x>
- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A., Matallana, E., 2010. Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.018>
- Golumbic, C., Mattill, H.A., 1941. Antioxidants and the autoxidation of fats. XIII. The antioxygenic action of ascorbic acid in association with tocopherols, hydroquinones and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 63.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Cabisco, E., Matallana, E., 2010a. Transcriptomic and proteomic insights of the wine yeast biomass propagation process. *FEMS Yeast Res.* 10, 870–884. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00667.x>
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Cabisco, E., Ros, J., Matallana, E., 2012. Engineered Trx2p industrial yeast strain protects glycolysis and fermentation proteins from oxidative carbonylation during biomass propagation. *Microb. Cell Fact.* 11, 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-4>
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Cabisco, E., Ros, J., Matallana, E., 2010b. Reduction of oxidative cellular damage by overexpression of the thioredoxin *TRX2* gene improves yield and quality of wine yeast dry active biomass. *Microb. Cell Fact.* 9, 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-9>
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Garre, E., Matallana, E., 2011. Recent Advances in Yeast Biomass Production. *Biomass Detect. production usage* 201–222. <https://doi.org/10.5772/973>
- González, R., Muñoz, R., Carrascosa, A. V., 2011. Production of Wine Starter Cultures, in: Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, pp. 279–298. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

## Bibliografía

- González, 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. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.015>
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Gammazza, A.M., Knap, N., Wozniak, M., Gorska-Ponikowska, M., 2018. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>
- Grant, C.M., Maclver, F.H., Dawes, I.W., 1997. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide  $\gamma$ -glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell* 8, 1699–1707. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.9.1699>
- Griffith, O.W., 1980. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207–212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)
- Grijalva-Vallejos, N., Aranda, A., Matallana, E., 2020. Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. *Int. J. Food Microbiol.* 317, 108462. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108462>
- Guillaume, D., Charrouf, Z., 2011. Argan Oil. *Altern. Med. Rev.* 16, 275–279.
- Gurvitz, A., Rottensteiner, H., 2006. The biochemistry of oleate induction: Transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763, 1392–1402. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.011>
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Harkness, T.A., Arnason, T.G., 2014. A Simplified Method for Measuring Secreted Invertase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Pharmacol. Open Access* 03. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000151>
- Herman, P.K., 2002. Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 602–607. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00377-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00377-6)
- Herrero, E., Belli, G., Casas, C., 2010. Structural and Functional Diversity of Glutaredoxins in Yeast. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 659–668. <https://doi.org/10.2174/138920310794557637>
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., Cabisco, E., 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1780, 1217–1235. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>
- Higgins, V.J., Beckhouse, A.G., Oliver, A.D., Rogers, P.J., Dawes, I.W., 2003. Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4777–4787.

- <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4777-4787.2003>
- Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., Gurvitz, A., 2003. The biochemistry of peroxisomal  $\beta$ -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 35–64. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00017-2)
- Hohmann, S., 2015. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.* 61, 373–382. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-0>
- Hohmann, S., Mager, W.H., 2003. *Yeast Stress Responses*, 1st ed, *Yeast Stress Responses*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2>
- Hongisto, H.J., Laakso, P., 1978. 20th General Meeting, American Society of Sugar Beet Technologists, San Diego, 26 February – 2 March.
- Howlett, N.G., Avery, S. V., 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2971–2976.
- Hu, K., Qin, Y., Tao, Y.S., Zhu, X.L., Peng, C.T., Ullah, N., 2016. Potential of Glycosidase from Non-*Saccharomyces* Isolates for Enhancement of Wine Aroma. *J. Food Sci.* 81, M935–M943. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13253>
- Huang, J., Reggiori, F., Klionsky, D.J., 2007. The Transmembrane Domain of Acid Trehalase Mediates Ubiquitin-independent Multivesicular Body Pathway Sorting. *Mol. Biol. Cell* 18, 2511–2524. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- Ihmels, J., Bergmann, S., Gerami-Nejad, M., Yanai, I., McClellan, M., Berman, J., Barkai, N., 2005. Rewiring of the Yeast Transcriptional Network Through the Evolution of Motif Usage. *Science* (80- ). 309, 938–940. <https://doi.org/10.1126/science.1113833>
- Jakubowski, W., Bilinski, T., Grzegorz, B., 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 659–664.
- Jiang, Q., 2014. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 72, 76–90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035>
- Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2014. Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Jomova, K., Valko, M., 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur. J. Med. Chem.* 70, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.054>
- Kainou, K., Kamisaka, Y., Kimura, K., Uemura, H., 2006. Isolation of delta-12 and omega3-fatty

## Bibliografia

- acid desaturase genes from the yeast *Kluyveromyces lactis* and their heterologous expression to produce linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids in *Saccharomyces cerevisiae* Kumiko. *Yeast* 23, 605–612. <https://doi.org/10.1002/yea.1378>
- Karoui, I.J., Wannes, W.A., Marzouk, B., 2010. Refined corn oil aromatization by *Citrus aurantium* peel essential oil. *Ind. Crops Prod.* 32, 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.020>
- Kebede, M., Admassu, S., 2019. Application of Antioxidants in Food Processing Industry: Options to Improve the Extraction Yields and Market Value of Natural Products. *Adv. Food Technol. Nutr. Sci.* 5, 38–49. <https://doi.org/10.17140/aftnsoj-5-155>
- Kim, D.H., Lee, S.B., Jeon, J.Y., Park, H.D., 2019. Development of air-blast dried non-*Saccharomyces* yeast starter for improving quality of Korean persimmon wine and apple cider. *Int. J. Food Microbiol.* 290, 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.002>
- Kimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Hatano, T., Agata, I., Arichi, S., 1985. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VII. Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species, and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chem. Pharm. Bull.* 33.
- Klug, L., Daum, G., 2014. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res.* 14, 369–388. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12141>
- Koshland, D., Tapia, H., 2019. Desiccation tolerance: an unusual window into stress biology. *Mol. Biol. Cell* 30, 737–741. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-04-0257>
- Kuanyshev, N., Adamo, G.M., Porro, D., Branduardi, P., 2017. The spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*: Foe or friend? *Yeast* 34, 359–370. <https://doi.org/10.1002/yea.3238>
- Kurtzman, C.P., Droby, S., 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 395–399. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00045>
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. Part I: Classification of Yeasts, in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Kurtzman, C.P., James, S.A., 2006. *Zygosaccharomyces* and related genera, in: Blackburn, C. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73, 331–371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>

- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1994. Orders and families of ascosporogenous yeasts and yeast-like taxa compared from ribosomal RNA sequence similarities, in: Hawksworth, D.L. (Ed.), *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*. Plenum Press, New York, NY, p. 1994.
- Lachance, M.-A., 2011a. *Kluyveromyces* van der Walt (1971), in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier B.V., pp. 471–482.
- Lachance, M.-A., 2011b. *Metschnikowia* Kamienski (1899), in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier B.V., pp. 575–620.
- Lam, Y.T., Stocker, R., Dawes, I.W., 2010. The lipophilic antioxidants  $\alpha$ -tocopherol and coenzyme Q10 reduce the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.008>
- Lambrechts, M., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma. *South African J. Enol. Vitic.* 91–129.
- Landolfo, S., Zara, G., Zara, S., Budroni, M., Ciani, M., Mannazzu, I., 2010. Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.020>
- Lane, M.M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K.H., O'Byrne, C.P., Morrissey, J.P., 2011. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 100, 507–519. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9606-x>
- Laroche, C., Beney, L., Marechal, P.A., Gervais, P., 2001. The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 249–254. <https://doi.org/10.1007/s002530000583>
- Law, C.L., Mujumdar, A.S., 2006. Fluidized Bed Dryers, in: Mujumdar, A.S. (Ed.), *Handbook of Industrial Drying*. Taylor & Francis Group, pp. 173–202.
- Lee, P., Sup, M., Paik, S., Choi, S., Cho, B., Hahn, J., 2013. Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 587, 3648–3655. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.004>
- Lee, S.B., Choi, W.S., Jo, H.J., Yeo, S.H., Park, H.D., 2016. Optimization of air-blast drying process for manufacturing *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast as industrial wine starters. *AMB Express* 6, 0–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0278-9>
- Lemetals, G., Dupont, S., Beney, L., Gervais, P., 2012. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 471–480. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4014-3>

## Bibliografía

- Lemos Junior, W.J.F., Binati, R.L., Felis, G.E., Slaghenaufer, D., Ugliano, M., Torriani, S., 2020. Volatile organic compounds from *Starmarella bacillaris* to control gray mold on apples and modulate cider aroma profile. *Food Microbiol.* 89. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103446>
- Lemos Junior, W.J.F., Bovo, B., Nadai, C., Crosato, G., Carlot, M., Favaron, F., Giacomini, A., Corich, V., 2016. Biocontrol ability and action mechanism of *Starmarella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) isolated from wine musts against gray mold disease agent *Botrytis cinerea* on grape and their effects on alcoholic fermentation. *Front. Microbiol.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01249>
- Lin, T.K., Zhong, L., Santiago, J.L., 2018. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19010070>
- Lino, F.S.D.O., Basso, T.O., Sommer, M.O.A., 2018. A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. *Biotechnol. Biofuels* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1221-x>
- Lleixà, J., Martín, V., Portillo, M. del C., Carrau, F., Beltran, G., Mas, A., 2016. Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00338>
- Longo, V.D., Gralla, E.B., Valentine, J.S., 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*: Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 12275–12280. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12275>
- López, H., Ruiz-López, M., Cabrera-Vique, C., 2010. Grasas y aceites, in: Ruiz-López, M., Gil, A. (Eds.), *Tratado de Nutrición*, Vol. 2. Médica Panamericana, Madrid, pp. 248–279.
- López, L.C., Cabrera-Vique, C., Venegas, C., García-Corzo, L., Luna-Sánchez, M., Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., 2013. Argan oil-contained antioxidants for human mitochondria. *Nat. Prod. Commun.* 8, 47–50. <https://doi.org/10.1177/1934578x1300800111>
- López, M.C., Mateo, J.J., Maicas, S., 2015. Screening of  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -Xylosidase Activities in Four Non-*Saccharomyces* Yeast Isolates. *J. Food Sci.* 80, C1696–C1704. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12954>
- Los, D.A., Murata, N., 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals 1666, 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.002>
- Lu, Y., Huang, D., Lee, P.R., Liu, S.Q., 2016. Assessment of volatile and non-volatile compounds in durian wines fermented with four commercial non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Sci. Food Agric.* 96, 1511–1521. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7253>
- Luna-Solano, G., Salgado-Cervantes, M.A., Rodríguez-Jimenes, G.C., García-Alvarado, M.A.,

2005. Optimization of brewer's yeast spray drying process. *J. Food Eng.* 68, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.019>
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M., Ciani, M., 2019. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39, 603–617. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1601679>
- Manzanares, P., Vallés, S., Viana, F., 2011. Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Winemaking Process, in: Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, pp. 85–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10004-9>
- Marc, J., Feria-Gervasio, D., Mouret, J.R., Guillouet, S.E., 2013. Impact of oleic acid as co-substrate of glucose on “short” and “long-term” Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-83>
- Marfil, R., Giménez, R., Martínez, O., Bouzas, P.R., Rufián-Henares, J.A., Mesías, M., Cabrera-Vique, C., 2011. Determination of polyphenols, tocopherols, and antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, Skeels). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 886–893. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000503>
- Martin, V., Jose Valera, M., Medina, K., Boido, E., Carrau, F., 2018. Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines — A review. *Fermentation* 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030076>
- Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F., 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* 15, 2227–2235. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00576.x>
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M.T., Querol, A., 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.014>
- Matallana, E., Aranda, A., 2016. Biotechnological impact of stress response on wine yeast. *Lett. Appl. Microbiol.* 64, 103–110. <https://doi.org/10.1111/lam.12677>
- McGovern, P.E., Hartung, U., Badler, V.R., Glusker, D.L., Exner, L.J., 1997. The beginnings of winemaking and viticulture in the ancient near east and Egypt. *Expedition*.
- Meinhardt, F., Klassen, R., 2009. Yeast killer toxins: fundamentals and applications., in: Anke, T., Weber, D. (Eds.), *Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 107–130.
- Menni, H. Ben, Belarbi, M., Menni, D. Ben, Bendiab, H., Kherraf, Y., Ksouri, R., Djebli, N., Visioli,

## Bibliografía

- F., 2019. Anti-inflammatory activity of argan oil and its minor components. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 71. <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1650005>
- Mestre Furlani, M.V., Maturano, Y.P., Combina, M., Mercado, L.A., Toro, M.E., Vazquez, F., 2017. Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: A strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Res.* 17, 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox010>
- Michel, M., Kopecka, J., Meier-Dörnberg, T., Zamkow, M., Jacob, F., Hutzler, M., 2016. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. *Yeast* 33, 129–144. <https://doi.org/10.1002/yea.3146>
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J., 1994. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 235–248. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90079-5)
- Monfalouti, H. El, Guillaume, D., Denhez, C., Charrouf, Z., 2010. Therapeutic potential of argan oil: A review. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1669–1675. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01190.x>
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., Gonzalez, R., 2015. The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3993–4003. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6321-3>
- Morano, K.A., Grant, C.M., Moyer-rowley, W.S., 2012. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Morata, A., 2019. Enological repercussions of non-*Saccharomyces* species in wine biotechnology. *Fermentation* 5. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030072>
- Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M.A., Loira, I., Del Fresno, J.M., González, C., Suárez-lepe, J.A., 2020. Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine freshness. A review. *Biomolecules* 10. <https://doi.org/10.3390/biom10010034>
- Morata, A., Loira, I., Escott, C., del Fresno, J.M., Bañuelos, M.A., Suárez-Lepe, J.A., 2019. Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology. *Fermentation* 5. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030063>
- Murakami, Y., Yokoigawa, K., Kawai, H., 1995. Lipid composition of a freeze-tolerant yeast, *Torulaspora delbureckii*, and its freeze-sensitive mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 167–171. <https://doi.org/10.1007/BF00164497>
- Murshed, R., Lopez-Lauri, F., Sallanon, H., 2008. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Anal. Biochem.* 383, 320–322. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.07.020>

- Nakata, R., Takahashi, S., Inoue, H., 2012. Recent advances in the study on resveratrol. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 273–279. <https://doi.org/10.1248/bpb.35.273>
- Narendranath, N. V., Thomas, K.C., Ingledew, W.M., 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 171–177. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000090>
- 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. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002013>
- Nishikimisi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K., 1994. Cloning and Chromosomal Mapping of the Human Nonfunctional Gene for L-Gulonolactone Oxidase, the Enzyme for L-Ascorbic Acid Biosynthesis Missing in Man \*. *J. Biol. Chem.* 269, 13685–13688.
- Nocella, C., Cammisotto, V., Fianchini, L., D'Amico, A., Novo, M., Castellani, V., Stefanini, L., Violi, F., Carnevale, R., 2017. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Diseases: Benefits for Human Health. *Endocrine, Metab. Immune Disord. - Drug Targets* 18, 4–13. <https://doi.org/10.2174/1871530317666171114121533>
- Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M., Holzer, H., 1995. Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 360, 286–290. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00105-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00105-I)
- Nwaka, S., Mechler, B., Holzer, H., 1996. Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett.* 386, 235–238. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00450-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00450-4)
- Orlandi, I., Stamerra, G., Strippoli, M., Vai, M., 2017. During yeast chronological aging resveratrol supplementation results in a short-lived phenotype Sir2-dependent. *Redox Biol.* 12, 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.015>
- Oro, L., Ciani, M., Comitini, F., 2014. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1209–1217. <https://doi.org/10.1111/jam.12446>
- Orozco, H., Matallana, E., Aranda, A., 2019. Stress response in yeasts used in food production, in: Paramithiotis, S., Patra, J. (Eds.), *Food Molecular Microbiology*. CRC Press, pp. 183–206.
- Oura, E., 1974. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I. Factors Affecting the Type of Metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 16, 1197–1212. <https://doi.org/10.1002/bit.260160906>
- Özcan, S., Vallier, L.G., Flick, J.S., Carlson, M., Johnston, M., 1997. Expression of the *SUC2*

## Bibliografía

- gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast* 13, 127–137. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(199702\)13:2<127::aid-yea68>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199702)13:2<127::aid-yea68>3.0.co;2-%23)
- Padilla, B., Gil, J. V., Manzanares, P., 2018. Challenges of the non-conventional yeast *Wickerhamomyces anomalus* in winemaking. *Fermentation* 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030068>
- Parrou, J.L., François, J., 1997. A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal. Biochem.* 248, 186–188. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2138>
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F., 2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J. Nutr.* 133, 2812–2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- Peña, R., Chávez, R., Rodríguez, A., Ganga, M.A., 2019. A control alternative for the hidden enemy in the wine cellar. *Fermentation* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010025>
- Pérez-Torrado, R., Bruno-Bárcena, J.M., Matallana, E., 2005. Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6831–6837. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6831-6837.2005>
- Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., Matallana, E., 2015. Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 46, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.008>
- Pérez-Torrado, R., Gómez-Pastor, R., Larsson, C., Matallana, E., 2009. Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 951–960. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1722-9>
- Pérez-Torrado, R., Matallana, E., 2015. Enhanced fermentative capacity of yeasts engineered in storage carbohydrate metabolism. *Biotechnol. Prog.* 31, 20–24. <https://doi.org/10.1002/btpr.1993>
- Peris, D., Pérez-Torrado, R., Hittinger, C.T., Barrio, E., Querol, A., 2018. On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *Yeast* 35, 51–69. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Picazo, C., McDonagh, B., Peinado, J., Bárcena, J.A., Matallana, E., Aranda, A., 2019. *Saccharomyces cerevisiae* cytosolic thioredoxins control glycolysis, lipid metabolism, and protein biosynthesis under wine-making conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 85. <https://doi.org/10.1128/AEM.02953-18>

- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pizarro, F., Vargas, F.A., Agosin, E., 2007. A systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast* 24, 977–991. <https://doi.org/10.1002/yea.1545>
- Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R.J., Tan, D., Chen, L., Manchester, L.C., Barlow-Walden, L.R., 1994. Melatonin — A Highly Potent Endogenous Radical Scavenger and Electron Donor: New Aspects of the Oxidation Chemistry of this Indole Accessed in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 738, 419–420. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21831.x>
- Porter, T.J., Divol, B., Setati, M.E., 2019a. *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Res. Int.* 119, 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.003>
- Porter, T.J., Divol, B., Setati, M.E., 2019b. Investigating the biochemical and fermentation attributes of *Lachancea* species and strains: Deciphering the potential contribution to wine chemical composition. *Int. J. Food Microbiol.* 290, 273–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.025>
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P., 1989. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 468–477. <https://doi.org/10.1128/aem.55.2.468-477.1989>
- Praphailong, W., Fleet, G.H., 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.* 14, 459–468. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0106>
- Pretorius, I.S., 2016. Conducting Wine Symphonics with the Aid of Yeast Genomics. *Beverages* 2. <https://doi.org/10.3390/beverages2040036>
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B)
- Puškaš, V.S., Miljić, U.D., Djuran, J.J., Vučurović, V.M., 2020. The aptitude of commercial yeast strains for lowering the ethanol content of wine. *Food Sci. Nutr.* 8, 1489–1498. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1433>
- Quail, M.A., Kelly, S.L., 1996. The Extraction and Analysis of Sterols from Yeast, in: *Yeast Protocols. Methods in Molecular Biology.* pp. 123–131. <https://doi.org/10.1385/0-89603-319-8:123>
- Quan, Z.X., Jin, Y.S., Yin, C.R., Lee, J.J., Lee, S.T., 2005. Hydrolyzed molasses as an external carbon source in biological nitrogen removal. *Bioresour. Technol.* 96, 1690–1695. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.033>

## Bibliografía

- Querol, A., Pérez-Torrado, R., Alonso-del-Real, J., Minebois, R., Stribny, J., Oliveira, B.M., Barrio, E., 2018. New Trends in the Uses of Yeasts in Oenology, 1st ed, Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.03.002>
- Quirós, M., Rojas, V., González, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E.N., Lakshminarasiah, U., Gopas, J., Nishigaki, I., 2014. Antioxidants and human diseases. *Clin. Chim. Acta* 436, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., Cocolin, L., 2012. *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1987–1994. <https://doi.org/10.1128/AEM.06768-11>
- Rapoport, A., Golovina, E.A., Gervais, P., Dupont, S., Beney, L., 2019. Anhydrobiosis: Inside yeast cells. *Biotechnol. Adv.* 37, 51–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.003>
- Redón, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2009. Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 833–840. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0996-6>
- Redón, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2008. Effect of active dry wine yeast storage upon viability and lipid composition. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2555–2563. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9779-2>
- Reed, G., Nagodawithana, T.W., 1991. Yeast technology. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Reed, G., Nagodawithana, T.W., 1988. Technology of Yeast Usage in Winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 83 LP – 90.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Rosales-Corral, S., Galano, A., Zhou, X.J., Xu, B., 2018. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23020509>
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.C., Bely, M., 2015. Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int. J. Food Microbiol.* 207, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>
- Renault, P., Coulon, J., Moine, V., Thibon, C., Bely, M., 2016. Enhanced 3-sulfanylhexas-1-ol production in sequential mixed fermentation with *Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* reveals a situation of synergistic interaction between two industrial strains. *Front.*

- Microbiol. 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00293>
- Resende, L.V., Pinheiro, L.K., Miguel, M.G.C.P., Ramos, C.L., Vilela, D.M., Schwan, R.F., 2018. Microbial community and physicochemical dynamics during the production of 'Chicha', a traditional beverage of Indigenous people of Brazil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2429-4>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology: Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*, Handbook of Enology. <https://doi.org/10.1002/0470010398>
- Riou, C., Nicaud, J.M., Barre, P., Gaillardin, C., 1997. Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast* 13, 903–915. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199708\)13:10<903::AID-YEA145>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199708)13:10<903::AID-YEA145>3.0.CO;2-1)
- Robinson, J., Harding, J., 2015. *The Oxford Companion to Wine*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford.
- Roby, J.F., Whelan, W.J., 1972. Reducing value methods for maltodextrins: chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. *Anal. Biochem.* 45, 510–516. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90213-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90213-8)
- Roca-Domènech, G., López Martínez, G., Barrera, E., Poblet, M., Rozès, N., Cordero-Otero, R., 2018. Enhancing the tolerance of the *Starmerella bacillaris* wine strain to dehydration stress. *Ann. Microbiol.* 68, 667–676. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1373-8>
- Roca-Domènech, G., Martínez, G.L., Tirado, V., Borrull, A., Candelas, Ó., Rozès, N., Cordero-Otero, R., 2016. Viability Enhancement of *Schizosaccharomyces pombe* Cells During Desiccation Stress. *J. Microbiol. Res.* 6, 82–91. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20160604.03>
- Rodrigues, A.J., Raimbourg, T., Gonzalez, R., Morales, P., 2016. Environmental factors influencing the efficacy of different yeast strains for alcohol level reduction in wine by respiration. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 1038–1043. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.046>
- Rodríguez-Porrata, B., Lopez-Martinez, G., Redón, M., Sancho, M., Mas, A., Rozès, N., Cordero-Otero, R., 2011. Enhancing yeast cell viability after dehydration by modification of the lipid profile. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 75–83. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0428-1>
- Rodríguez-Porrata, B., Novo, M., Guillamón, J., Rozès, N., Mas, A., Otero, R.C., 2008. Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.016>
- Rolle, L., Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Río Segade, S., Rantsiou, K., Giacosa, S.,

## Bibliografía

- Gambutì, A., Gerbi, V., Cocolin, L., 2018. Alcohol reduction in red wines by technological and microbiological approaches: a comparative study. *Aust. J. Grape Wine Res.* 24, 62–74. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12301>
- Rollero, S., Zietsman, A.J.J., Buffetto, F., Schüchel, J., Ortiz-Julien, A., Divol, B., 2018. *Kluyveromyces marxianus* Secretes a Pectinase in Shiraz Grape Must That Impacts Technological Properties and Aroma Profile of Wine. *J. Agric. Food Chem.* 66, 11739–11747. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03977>
- Romano, P., Pietrafesa, R., Romaniello, R., Zambuto, M., Calabretti, A., Capece, A., 2015. Impact of yeast starter formulations on the production of volatile compounds during wine fermentation. *Yeast* 32, 245–256. <https://doi.org/10.1002/yea.3034>
- Romero, A.M., Jordá, T., Rozès, N., Martínez-Pastor, M.T., Puig, S., 2018. Regulation of yeast fatty acid desaturase in response to iron deficiency. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1863, 657–668. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.03.008>
- Rose, A.H., Harrison, J.S., 1991. *The yeasts*, 2nd ed. Academic Press, London, UK.
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., Capozzi, V., 2020. Non-*Saccharomyces* Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector. *Recent Pat. Food. Nutr. Agric.* 27–39. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>
- Rozès, N., Garcia-Jares, C., Larue, F., Lonvaud-Funel, A., 1992. Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J. Sci. Food Agric.* 59, 351–357. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740590312>
- Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Santos, A., Benito, S., 2018. Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 8501–8509. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>
- Sabel, A., Martens, S., Petri, A., König, H., Claus, H., 2014. *Wickerhamomyces anomalus* AS1: a new strain with potential to improve wine aroma. *Ann. Microbiol.* 64, 483–491. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0678-x>
- Sakamoto, T., Murata, N., 2002. Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 206–210. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00306-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00306-5)
- Sales, R.C., Medeiros, P.C., Spreafico, F., de Velasco, P.C., Gonçalves, F.K.A., Martín-Hernández, R., Mantilla-Escalante, D.C., Gil-Zamorano, J., Peres, W.A.F., de Souza, S.A.L., Dávalos, A., Do Carmo, M.G.T., 2019. Olive oil, palm oil, and hybrid palm oil distinctly modulate liver transcriptome and induce NAFLD in mice fed a high-fat diet. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20010008>

- Sánchez, C., Troncoso González, A.M., García-Parrilla, M.C., Quesada Granados, J.J., López García de la Serrana, H., López Martínez, M.C., 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal. Chim. Acta* 593, 103–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.037>
- Santamauro, F., Whiffin, F.M., Scott, R.J., Chuck, C.J., 2014. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnol. Biofuels* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-34>
- Santomartino, R., Riego-Ruiz, L., Bianchi, M.M., 2017. Three, two, one yeast fatty acid desaturases: regulation and function. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2257-y>
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191–1212.
- Schnierda, T., Bauer, F.F., Divol, B., van Rensburg, E., Görgens, J.F., 2014. Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 58, 478–485. <https://doi.org/10.1111/lam.12217>
- Schüller, H.J., 2003. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 43, 139–160. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0381-8>
- Scientific Comitee for Food, 1996. Opinion on sulphur dioxide and other suplhiting agents used as food preservatives, Reports of the Scientific Comitee for Food. Brussels, Belgium. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199546282.013.0024>
- Scoma, A., Coma, M., Kerckhof, F.M., Boon, N., Rabaey, K., 2017. Efficient molasses fermentation under high salinity by inocula of marine and terrestrial origin. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0701-8>
- Seguinot, P., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., 2020. Impact of Nutrient Availability on the Fermentation and Production of Aroma Compounds Under Sequential Inoculation With *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 11, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00305>
- Senthilkumar, S., Suganya, T., Deepa, K., Muralidharan, J., Sasikala, K., 2016. Supplementation of Molasses in Livestock Feed. *Int. J. Sci. Environ. Technol.* 5, 1243–1250.
- Shen, X.X., Zhou, X., Kominek, J., Kurtzman, C.P., Hittinger, C.T., Rokas, A., 2016. Reconstructing the backbone of the *Saccharomycotina* yeast phylogeny using genome-scale data. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 6, 3927–3939. <https://doi.org/10.1534/g3.116.034744>

## Bibliografia

- Si, H., Zhang, L., Liu, S., LeRoith, T., Virgous, C., 2014. High corn oil dietary intake improves health and longevity of aging mice. *Exp. Gerontol.* 58, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.09.001>
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* (80- ). 175, 720 LP – 731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Siso, M.I.G., Ramil, E., Cerdán, M.E., Freire-Picos, M.A., 1996. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme Microb. Technol.* 18, 585–591. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00151-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00151-4)
- Spagnol, C.M., Assis, R.P., Brunetti, I.L., Isaac, V.L.B., Salgado, H.R.N., Corrêa, M.A., 2019. In vitro methods to determine the antioxidant activity of caffeic acid. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 219, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.04.025>
- Spickett, C.M., Smirnov, N., Pitt, A.R., 2000. The Biosynthesis of Erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an Antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 183–192.
- Spitaels, F., Wieme, A.D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H.M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L., Vandamme, P., 2014. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384>
- Stratford, M., 2006. Food and Beverage Spoilage Yeast, in: Querol, A., Fleet, G.H. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 335–380.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M., Martin, C.E., 1990. The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the  $\Delta 9$  fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.* 265, 20144–20149.
- Swiegers, J., Bartowsky, P., Henschke, P., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173.
- Szydłowska-Czerniak, A., Karlovits, G., Dianoczki, C., Recseg, K., Szlyk, E., 2008. Comparison of Two Analytical Methods for Assessing Antioxidant Capacity of Rapeseed and Olive Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85, 141–149. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1178-6>
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Fuentes-Broto, L., Reiter, R.J., 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol. Rev.* 85, 607–623. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x>
- Teclu, D., Tivchev, G., Laing, M., Wallis, M., 2009. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. *J. Hazard. Mater.* 161, 1157–1165. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.120>
- Temple, M.D., Perrone, G.G., Dawes, I.W., 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen

- species. *Trends Cell Biol.* 15, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.04.003>
- Tronchoni, J., Curiel, J.A., Sáenz-Navajas, M.P., Morales, P., de-la-Fuente-Blanco, A., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Gonzalez, R., 2018. Aroma profiling of an aerated fermentation of natural grape must with selected yeast strains at pilot scale. *Food Microbiol.* 70, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.10.008>
- Tuberoso, C.I.G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., Cabras, P., 2007. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chem.* 103, 1494–1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.014>
- Varela, C., 2016. The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9861–9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>
- Varela, C., Borneman, A.R., 2017. Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast* 34, 111–128. <https://doi.org/10.1002/yea.3219>
- Varela, C., Dry, P.R., Kutyna, D.R., Francis, I.L., Henschke, P.A., Curtin, C.D., Chambers, P.J., 2015. Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21, 670–679. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12187>
- Varela, C., Sengler, F., Solomon, M., Curtin, C., 2016. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* 209, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.024>
- Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., McLean, H., Henschke, P.A., 2009. Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with “wild” indigenous and inoculated yeasts: Role of yeast volatile compounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 238–248. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00054.x>
- Vázquez, J., González, B., Sempere, V., Mas, A., Torija, M.J., Beltran, G., 2017. Melatonin reduces oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01066>
- Vázquez, J., Grillitsch, K., Daum, G., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.J., 2019. The role of the membrane lipid composition in the oxidative stress tolerance of different wine yeasts. *Food Microbiol.* 78, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.001>
- Vázquez, J., Grillitsch, K., Daum, G., Mas, A., Torija, M.J., Beltran, G., 2018. Melatonin minimizes the impact of oxidative stress induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces* and Non-conventional yeast. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01933>
- Venturini, C.D., Merlo, S., Souto, A.A., Fernandes, M.D.C., Gomez, R., Rhoden, C.R., 2010. Resveratrol and red wine function as antioxidants in the central nervous system without

## Bibliografia

- cellular proliferative effects during experimental diabetes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3, 434–441. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.6.14741>
- Verduyn, C., 1991. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie Van Leeuwenhoek* 60, 325–353. <https://doi.org/10.1007/BF00430373>
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., Morano, K.A., 2012. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 115–158. <https://doi.org/10.1128/membr.05018-11>
- Viana, F., Belloch, C., Vallés, S., Manzanares, P., 2011. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.005>
- Viana, F., Gil, J. V., Vallés, S., Manzanares, P., 2009. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.025>
- Viana, T., Loureiro-Dias, M.C., Prista, C., 2014. Efficient fermentation of an improved synthetic grape must by enological and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express* 4, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0016-0>
- Vicente, R.L., Spina, L., Gómez, J.P.L., Dejean, S., Parrou, J.L., François, J.M., 2018. Trehalose-6-phosphate promotes fermentation and glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell* 5, 444–459. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.651>
- Viljoen, B.C., Kock, J.L.F., Lategan, P.M., 1986. Fatty acid composition as a guide to the classification of selected genera of yeasts belonging to the endomycetales. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2397–2400. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-8-2397>
- Vine, I.O. of V. and, 2019. International oenological codex.
- Virgilio, C. De, 2011. The essence of yeast quiescence. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00287.x>
- Vu, V.H., Kim, K., 2009. High-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* KV-25 using molasses and corn steep liquor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1603–1611. <https://doi.org/10.4014/jmb.0907.07027>
- Walker, G.M., 2011. *Pichia anomala*: Cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 99, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9491-8>
- Wang, M., Meng, D., Zhang, P., Wang, X., Du, G., Brennan, C., Li, S., Ho, C.T., Zhao, H., 2018. Antioxidant Protection of Nobiletin, 5-Demethylnobiletin, Tangeretin, and 5-

- Demethyltangeretin from Citrus Peel in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 66, 3155–3160. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00509>
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Winderickx, J., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Giots, F., Thevelein, J., de Winde, H., 2003. From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast 1, 305–386. [https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2\\_7](https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2_7)
- Woehrer, W., Roehr, M., 1981. Regulatory aspects of bakers' yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 567–581. <https://doi.org/10.1002/bit.260230308>
- Wolfe, K.H., Shields, D.C., 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708–713.
- Yan, D., Lu, Y., Chen, Y.F., Wu, Q., 2011. Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 6487–6493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.036>
- Zavrel, M., Hoot, S.J., White, T.C., 2013. Comparison of sterol import under aerobic and anaerobic conditions in three fungal species, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 12, 725–738. <https://doi.org/10.1128/EC.00345-12>

La presencia de levaduras no-*Saccharomyces* en las primeras etapas de la fermentación del mosto de uva permite obtener vinos con perfiles aromáticos complejos y un menor grado alcohólico. Su uso a nivel industrial requiere su producción como inóculos en forma de levadura seca activa (LSA). La producción industrial de LSA es un proceso optimizado para la producción de *S. cerevisiae* y en el que las levaduras se ven sometidas a múltiples condiciones de estrés, que afectan a su eficiencia tecnológica.

Este trabajo se centra en la caracterización del comportamiento de levaduras vínicas no-*Saccharomyces* en condiciones de producción de LSA. Los resultados obtenidos han permitido determinar que las diferencias de comportamiento en condiciones de propagación de biomasa y deshidratación entre *S. cerevisiae* y las levaduras vínicas no-*Saccharomyces* analizadas se deben a diferencias bioquímicas y metabólicas. Además, la adaptación tecnológica del proceso a los requerimientos de cada especie, así como el tratamiento con compuestos antioxidantes naturales, han permitido la mejora de la producción de LSA para ser usada en ensayos de vinificación.



UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

---

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LEVADURAS VÍNICAS  
NO-*SACCHAROMYCES* Y ADAPTACIÓN TECNOLÓGICA DE SU  
PRODUCCIÓN INDUSTRIAL COMO LEVADURA SECA ACTIVA

---

Dirección de tesis: Dra. Emilia Matallana y Dr. Agustín Aranda

---

Valencia, Julio de 2020