

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Estudios de genómica y transcriptómica comparadas en levaduras para la revelación aromática en la producción de vinos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Javier Ruiz Ruiz

DIRECTORES

Antonio Santos de la Sen
Ignacio Belda Aguilar

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudios de genómica y transcriptómica comparadas
en levaduras para la revelación aromática en la
producción de vinos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Javier Ruiz Ruiz

DIRECTORES

Antonio Santos de la Sen

Ignacio Belda Aguilar

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, FISIOLOGÍA Y
MICROBIOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

TESIS DOCTORAL

**Estudios de genómica y transcriptómica comparadas
en levaduras para la revelación aromática en la
producción de vinos**

JAVIER RUIZ RUIZ

Madrid, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, FISIOLOGÍA Y
MICROBIOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE**
MADRID

**Estudios de genómica y transcriptómica comparadas
en levaduras para la revelación aromática en la
producción de vinos**

Tesis Doctoral presentada por D. Javier Ruiz Ruiz para optar al grado de
Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2021

Directores:

Dr. Antonio Santos de la Sen

Dr. Ignacio Belda Aguilar

Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología
(Unidad de Microbiología)
Universidad Complutense de Madrid

“Sciences provide an understanding of universal experience, Arts are a universal understanding of a personal experience... they are both avatars of human creativity”

Mae Jemison

Agradecimientos:

He de confesar que los agradecimientos me parecían una de las partes más complicadas de escribir en esta Tesis. Sin embargo, me han bastado unos minutos para echar la vista atrás y darme cuenta de cuanta gente me ha apoyado durante mi doctorado, y lo fácil que me iba a resultar darle las gracias a todos ellos. Esta Tesis es también suya.

En primer lugar, obviamente, están mis directores de Tesis, Antonio y Nacho. Ni que decir tiene que no hubiese sido posible hacer esta Tesis sin su continuo apoyo. Pero más importante aún, sin ellos no hubiese podido disfrutar trabajando en mi doctorado como lo he hecho. Desde mis primeras semanas en el laboratorio me dieron la confianza para formar parte del equipo y poder trabajar mano a mano con ellos en la investigación del grupo. Gracias a ellos, me he podido formar como investigador y por ello les estaré siempre agradecido. Antonio, te agradezco enormemente tu gran dedicación durante todos los años que llevo en el laboratorio. Gracias por haberme guiado estos años, sacando tiempo de donde sea para comentar cualquier experimento o resultado. Para Nacho me faltan palabras de agradecimiento. No sabéis la suerte que es que tu director de Tesis sea también un gran amigo. Cuando entré en el laboratorio aún no habías terminado tu doctorado, y ya eras todo un referente científico en donde fijarse. Durante estos años no he dejado de aprender de ti y ha sido todo un lujo poder trabajar contigo. Espero que podamos seguir haciendo ciencia con vosotros dos muchos años más. Aunque oficialmente no son directores de esta Tesis, les agradezco también a Domingo y Eva todo su apoyo durante estos años. Gracias Domingo por compartir todo tu conocimiento día a día, por los consejos y las anécdotas. Y gracias, Eva, por ayudarnos a ver lo interesante que es la enología más allá de la poyata del laboratorio. Siempre guardo con cariño la experiencia de aquella vendimia en la que pude trabajar contigo.

Durante estos años también he tenido la suerte de trabajar con muchos científicos fuera de mi laboratorio, lo cual ha sido todo un placer. Por un lado, quiero agradecer a José Paulo Sampaio y Doris Rauhut, sin olvidarme de toda la gente que forman sus grupos, por haberme acogido en sus laboratorios durante mis estancias del doctorado. Gracias a ellos, además de poder realizar una buena parte del trabajo de esta Tesis, pude disfrutar de una gran experiencia que no olvidaré. También quiero agradecerle a Santiago Benito toda su ayuda durante estos años. Sin duda, esta Tesis no podría haberse hecho sin tu apoyo. También dar las gracias a María de Toro por su gran ayuda. Todo un gusto haber trabajado contigo, y espero que tengamos la oportunidad de seguir haciéndolo.

También he tenido el placer de poder compartir los años de mi doctorado con muchos compañeros, que han acabado convirtiéndose en buenos amigos. Ellos han tenido gran parte de la culpa de lo mucho que he disfrutado del día a día de la tesis. Alex, desde el primer día que llegue al laboratorio me has echado una mano cuando lo he necesitado, gracias por las risas y los cafés juntos. A Miguel y Javi, por el gran equipo que formamos en el laboratorio. Miguel, mi compañero de Tesis, mil gracias por todo tu apoyo, desde mis peleas con *R* hasta los *beer meetings* de los congresos. Javi, aunque entraste un poco más tarde, desde el primer momento me has ayudado, no solo en la parte científica, también en la parte personal. Gracias a los dos por hacerme más fáciles todos los días en el laboratorio. Ójala pueda devolveros en vuestras Tesis el gran apoyo que me habéis dado. Por muchos años más juntos. También a Pedro e Iván, aunque ya no estéis en el laboratorio, seguís demostrándome vuestro apoyo. Espero haberos ayudado como vosotros me habéis ayudado a mí. Y gracias Sandra por tu gran trabajo estos últimos meses en el laboratorio, sin ti seguro que hubiese sido mucho más difícil escribir esta Tesis. Gracias también a Albert, María, Pablo, Patri, Álvaro y el resto de los compañeros del departamento de Micro, un gusto compartir la planta 11 con vosotros.

Es el turno de mis otros *compañeros de Tesis*. Gracias por vuestro enorme apoyo, aunque haya sido desde unas cuantas plantas más abajo, desde el edificio de en frente, o a cientos de kilómetros de distancia. Habéis sido mi vía de escape siempre que lo he necesitado. Mil gracias, Iris, Héctor, Ana, Adri y Cicu. No me olvido tampoco del resto de mis biólogos. Que orgulloso estoy de poder decir que somos amigos desde primero de carrera, y de lo que habéis conseguido todos 10 años después. También gracias a Chema, Elena, Félix, Marina, David y Álvaro, por ayudarme a disfrutar estos años de doctorado.

Y, por último, dar las gracias a las personas más importantes de mi vida, Papa, Mama, Sara, Andrea, mi familia. Ya os podéis leer bien esta Tesis, porque es sobre todo vuestra. Desde que decidí que quería hacer de la ciencia mi profesión, habéis estado apoyándome durante todos mis pasos y mucho más en estos últimos años. Gracias, además, porque no me habéis dejado nunca que me rinda. Gracias en especial a ti, Mamá, por haberme escuchado cada batalla con, y a veces contra, mis levaduras. Y también a Andrea, que a pesar de vivir tan lejos, siempre has estado muy cerca. Espero que estéis al menos una parte de todo lo orgullosos que estoy yo de vosotros cuatro.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	11
SUMMARY	15
1 INTRODUCCIÓN.....	21
1.1 Microbiología del Vino.....	21
1.1.1 Enología - La ciencia del vino.....	21
1.1.2 El vino como modelo de estudio en ecología.....	22
1.1.2.1 Microbiología en el viñedo	23
1.1.2.2 Microbiología en la bodega	25
1.1.3 Factores abióticos y bióticos y la diversidad de levaduras en el vino.....	28
1.1.3.1 Factores abióticos.....	29
1.1.3.2 Factores bióticos	31
1.2 Contribución de las levaduras a las propiedades sensoriales del vino.....	34
1.2.1 Impacto de las levaduras en el perfil aromático del vino	36
1.2.1.1 Contribución de las levaduras al perfil varietal del vino.	36
1.2.1.2 Contribución de las levaduras al perfil de aromas fermentativos en el vino.	41
1.2.2 Búsqueda de diversidad de levaduras para mejorar las propiedades del vino.....	45
1.2.2.1 Búsqueda de levaduras no-convencionales.....	46
1.2.2.2 Estrategias basadas en ingeniería genética	48
1.3 Adaptación evolutiva de las levaduras vínicas.....	49
1.3.1 Origen de la capacidad fermentativa en las levaduras	49
1.3.2 Proceso de domesticación en <i>S. cerevisiae</i>	51
1.3.3 Origen evolutivo de las cepas vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	51
1.3.4 Adaptación de las levaduras al ambiente vínico	53
1.4 Contribución de la Tesis Doctoral.....	57
2 OBJETIVOS	61
3 CAPÍTULO 1: Estudio de la distribución de alelos de <i>IRC7</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
3.1 Planteamiento.....	65
3.2 Material y métodos	66
3.2.1 Cepas de y genomas de levaduras	66
3.2.2 Genotipado del gen <i>IRC7</i>	66
3.2.3 Estudio fenotípico de cepas de <i>S. cerevisiae</i> con diferente genotipo <i>IRC7</i>	66
3.2.3.1 Fenotipado de alto rendimiento de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	66
3.2.3.2 Ensayos de micro-vinificaciones	68
3.2.3.3 Ensayos de competición entre cepas.....	68

ÍNDICE

3.2.3.4	Ensayos de actividad <i>killer</i>	69
3.2.3.5	Ensayo de determinación del estrés oxidativo	69
3.2.3.6	Test de pseudofilamentación.....	70
3.2.4	Secuenciación del genoma completo de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	70
3.2.5	Construcción del árbol filogenético de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	71
3.2.6	Identificación de variantes de secuencia asociadas al alelo <i>IRC7^S</i>	71
3.2.7	Identificación de variantes alélicas asociadas a <i>IRC7^S</i> en distintos linajes de <i>S. cerevisiae</i>	72
3.2.8	Análisis estadísticos	72
3.3	Resultados.....	73
3.3.1	Distribución de alelos de <i>IRC7</i> en las poblaciones de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	73
3.3.2	Caracterización fenotípica de cepas de <i>S. cerevisiae</i> representativas de los distintos genotipos <i>IRC7</i>	74
3.3.3	Capacidad competitiva de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> según sus genotipos <i>IRC7</i>	78
3.3.4	Variantes genómicas asociadas a los genotipos <i>IRC7</i> de las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	81
3.3.4.1	Variantes de secuencia asociadas al alelo <i>IRC7^S</i> en <i>S. cerevisiae</i>	82
3.4	ANEXO CAPÍTULO 1.....	88
4	CAPÍTULO 2: Influencia de <i>Torulaspora delbrueckii</i> y <i>Metschnikowia pulcherrima</i> en el perfil sensorial del vino a través de la liberación de tioles (3SH, 3SHA y 4MSP) en fermentaciones secuenciales con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	99
4.1	Planteamiento.....	101
4.2	Material y métodos	102
4.2.1	Cepas de levaduras, medios de cultivo e identificación molecular.....	102
4.2.2	Genotipado del gen <i>IRC7</i>	102
4.2.3	Búsqueda y caracterización del gen <i>IRC7</i> ortólogo de <i>S. cerevisiae</i> en las levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	103
4.2.4	Vinificaciones y cinéticas de crecimiento.....	104
4.2.5	Determinación analítica de compuestos no volátiles	105
4.2.6	Determinación analítica de compuestos volátiles	105
4.2.7	Análisis sensoriales	106
4.2.8	Análisis estadísticos	107
4.3	Resultados.....	108
4.3.1	Cinéticas poblacionales y consumo de azúcares	108
4.3.2	Análisis de metabolitos de interés enológico en el vino	109
4.3.3	Producción de tioles varietales volátiles	111
4.3.4	Compuestos volátiles mayoritarios producidos durante la fermentación.....	112
4.3.5	Análisis sensorial.....	115
4.3.6	Genotipo <i>IRC7</i> en las cepas no- <i>Saccharomyces</i>	115
5	CAPÍTULO 3: Efecto de la interacción interespecífica entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Torulaspora delbrueckii</i> bajo dos condiciones de nutrición nitrogenada en fermentación vínica	119
5.1	Planteamiento.....	121

5.2	Materiales y métodos.....	122
5.2.1	Cepas de levadura y medios de cultivo	122
5.2.2	Fermentaciones a escala de laboratorio.....	122
5.2.3	Determinación analítica de compuestos no volátiles	123
5.2.4	Determinación analítica de compuestos volátiles	124
5.2.5	Extracción y secuenciación de ARN.....	124
5.2.6	Análisis estadísticos	126
5.3	Resultados.....	127
5.3.1	Dinámicas poblacionales y cinéticas de fermentación.....	127
5.3.2	Cuantificación de metabolitos (no volátiles y volátiles) de interés enológico en los vinos	129
5.3.3	Respuesta transcripcional global de <i>S. cerevisiae</i> al amonio y a la co-inoculación con <i>T. delbrueckii</i>	133
5.3.4	Genes diferencialmente expresados en <i>S. cerevisiae</i>	136
5.3.5	Respuesta transcripcional a la nutrición nitrogenada en <i>S. cerevisiae</i> y <i>T. delbrueckii</i> bajo condiciones de co-inoculación	139
6	DISCUSIÓN GENERAL.....	143
6.1	Papel de <i>S. cerevisiae</i> en la producción de tioles: el paradójico caso del gen <i>IRC7</i>	144
6.2	Distribución de alelos <i>IRC7</i> en las poblaciones de cepas de <i>S. cerevisiae</i>...	145
6.2.1	Implicaciones fenotípicas del genotipo <i>IRC7</i> en las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	147
6.2.2	Variantes de secuencia de otros genes asociadas al alelo <i>IRC7^S</i> y sus potenciales implicaciones fenotípicas	149
6.3	Levaduras no-<i>Saccharomyces</i> como herramienta en la mejora del perfil sensorial de los vinos.....	153
6.3.1	Impacto de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en los parámetros enológicos básicos	153
6.3.2	Contribución de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en la producción de tioles aromáticos	156
6.3.3	Impacto de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> en el perfil sensorial de los vinos ..	160
6.4	Estudio del efecto de <i>T. delbrueckii</i> en co-inoculación con <i>S. cerevisiae</i> bajo distintas condiciones de nutrición nitrogenada.....	163
6.4.1	Impacto fenotípico de la co-inoculación de levaduras y la nutrición nitrogenada	164
6.4.2	Impacto transcripcional de la co-inoculación de levaduras y la nutrición nitrogenada	166
6.5	Perspectivas futuras	171
7	CONCLUSIONES.....	175
8	CONCLUSIONS.....	179
9	BIBLIOGRAFÍA.....	185

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

pb: par de bases

CCR: Represión Catabólica por Carbono

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CFU: Unidades Formadoras de Colonias

CO₂: Dióxido de Carbono

C-S: Carbono-Azufre

CYC: Colección Complutense de Levaduras

Cys: Cisteína

Cys-Gly: Cisteína-Glicina

DMDS: Dimetil disulfuro

DTT: Ditioneitol

GDEs: Genes diferencialmente expresados

GC-MS: Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

GO: Ontología génica

GSH: Glutación

h: horas

H₂S: Ácido sulfhídrico

HF: Homocigoto para el alelo completo de *IRC7*

HN: Alto Nitrógeno

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HS: Homocigoto para el alelo deleciónado de *IRC7*

HT: Heterocigoto para los alelos *IRC7*

HTS: Cribado de alto rendimiento

INDEL: Inserciones - deleciones

KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto

LN: Bajo Nitrógeno

Lt: *Lachancea thermotolerans*

M: Millones

MA: Millones de años

ABREVIATURAS

min: minutos

Mp: *Metschnikowia pulcherrima*

NaCl: Cloruro Sódico

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NCR: Represión Catabólica por Nitrógeno

NFA: Nitrógeno fácilmente asimilable

NH₄: Amonio

OD: Densidad Óptica

OIV: Organización Internacional para la Viña y el Vino

PCs: Componentes principales

PCA: Análisis de Componentes principales

PCR: Reacción en cadena polimerasa

PDM: *Prise de Mousse*

RIN: Número de Integridad de ARN

RNA-seq: Análisis de secuenciación de ARN

rpm: Revoluciones por minuto

s: segundos

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

ScTd: Fermentaciones mixtas de Sc y Td

SNPs: Polimorfismos de nucleótido único

SO₂: Dióxido de azufre

sp.: Especie

spp.: Especies

SPME: Microextracción en Fase Sólida

Td: *Torulaspora delbrueckii*

THG: Transferencia Horizontal de Genes

YNB: Base de Nitrógeno para Levaduras

YMA: Agar extracto de malta-extracto de levadura

YMA-MB: Agar extracto de malta-azul de metileno

Vs.: Versus

v/v: Volumen/Volumen

WGD: Duplicación del Genoma Completo

3SH: 3-sulfanilhexan-1-ol

3SHA: 3-sulfanilhexil acetato

4MSP: 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

RESUMEN

El proceso de elaboración del vino está asociado a una gran diversidad de microorganismos, desde aquellos que habitan el suelo del viñedo -determinando la salud y productividad de las vides- hasta aquellos que, como parte de la microbiota del mosto de uva, llegan a la bodega y participan en los procesos fermentativos. Entre esta diversidad, las levaduras destacan por llevar a cabo la fermentación alcohólica, así como, a través de diversas rutas metabólicas y actividades enzimáticas, ser responsables de la liberación de una gran variedad de metabolitos que determinan la composición química, por tanto, las propiedades sensoriales del vino. Desde las primeras prácticas de vinificación (datadas hace unos 7.500 años), las levaduras han estado sometidas a las severas condiciones del mosto y durante la fermentación del vino, debidas a factores abióticos (alta presión osmótica, creciente concentración de etanol, bajo pH, agotamiento de nutrientes) y bióticos (interacciones intra- e interespecíficas). Todo ello ha forzado un rápido proceso adaptativo, conducido por las fuerzas de selección natural y artificial, dando origen a cepas de levaduras altamente adaptadas al ambiente del vino y capaces de contribuir positivamente a sus propiedades.

Entre los mecanismos metabólicos de interés por su contribución sensorial en el vino, destaca el papel de las levaduras en la liberación enzimática de aromas varietales, a partir de precursores aromáticos del mosto. Entre estos aromas se encuentran los tioles volátiles (4MSP, 3SH y 3SHA), de gran importancia en la tipicidad aromática del vino. Debido a su bajo umbral de percepción, éstos tienen un gran impacto sensorial, aportando aromas tropicales y frutales al vino. Las levaduras son capaces de internalizar los precursores tiólicos (conjugados con cisteína o glutatión, principalmente) a través de permeasas de aminoácidos y después escindir su enlace C-S con enzimas β -liasas, liberando los correspondientes tioles volátiles. A pesar de que varios factores (variedad de uva, nutrición en el viñedo o las condiciones de fermentación) pueden contribuir al contenido tiólico en los vinos, el papel directo de las levaduras en su producción hace que la búsqueda y selección de cepas con gran potencial de liberación de estos compuestos sea una estrategia interesante para la potenciación aromática del vino.

Pese a dominar la fermentación alcohólica y ser determinante de la composición química del vino resultante, *Saccharomyces cerevisiae* tienen una capacidad limitada de liberación enzimática de tioles. Este hecho, además del efecto regulador de la represión

RESUMEN

catabólica por nitrógeno (NCR), parece deberse a que la mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son portadoras de una variante alélica del gen *IRC7* -codificante para una enzima cistationina- β -liasa, responsable directa de la producción de 4MSP- con una delección de 38bp (*IRC7^S*) y que da lugar a una enzima menos funcional. En este contexto, la primera parte de la investigación realizada en esta Tesis Doctoral incluye el estudio de la prevalencia de alelos *IRC7* en distintos linajes, domesticados y salvajes, de *S. cerevisiae*. Así, se confirmó que la prevalencia mayoritaria del alelo *IRC7^S* en el vino es un hecho exclusivo de este linaje, ya que éste presenta una prevalencia minoritaria en otros linajes domesticados y está completamente ausente en linajes salvajes. Se observó, además, que las cepas vínicas homocigotas para *IRC7^S* (HS) muestran una ventaja proliferativa y competitiva frente a las cepas homocigotas para el alelo *wild-type* de *IRC7*, *IRC7^F* (HF). Aunque se observó que ciertas actividades relacionadas directamente con la actividad enzimática de Irc7p pueden contribuir al fenotipo ventajoso de las cepas HS (i.e. mejor respuesta al estrés oxidativo o mayor tolerancia al cobre), en este estudio se identificaron, a nivel genómico, una serie de variantes de secuencia con patrones de co-ocurrencia significativos con el alelo *IRC7^S*, que pueden contribuir al patrón fenotípico de las cepas HS, y por tanto, a su alta prevalencia entre las cepas vínicas.

Confirmada la menor capacidad de la mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* para producir tioles varietales, se exploró el uso de levaduras no-*Saccharomyces* como estrategia para la mejora del perfil tiólico de los vinos. Se estudió la contribución que tienen dos levaduras no-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima*) a las propiedades del vino en fermentaciones secuenciales de mosto Verdejo, junto con dos cepas de *S. cerevisiae* (con distinto genotipo para el gen *IRC7*, HS y HF). El uso de ambas levaduras incrementó la concentración de tioles en el vino, destacando la producción de 4MSP por la cepa de *T. delbrueckii* estudiada. Este incremento en la concentración de tioles, junto con la reducción del contenido en aromas fermentativos mayoritarios que, superado un umbral pueden tener un efecto enmascarador de aromas minoritarios, supuso una mejora en calidad sensorial de los vinos, incrementando la percepción tropical y la tipicidad varietal de los vinos. Además, las fermentaciones secuenciales con las levaduras no-*Saccharomyces* modificaron otros parámetros enológicos que contribuyen a la calidad sensorial de los vinos, como la disminución del contenido en ácido acético y etanol, o el aumento del contenido en glicerol.

A pesar del impacto positivo de las levaduras no-*Saccharomyces* en el perfil sensorial del vino, su menor capacidad fermentativa hace que su uso en vinificación se restrinja a condiciones de co-inoculación con *S. cerevisiae*, asegurando la correcta finalización de la fermentación alcohólica. En este contexto, se decidió explorar el efecto fenotípico y transcripcional de la interacción de *S. cerevisiae* con *T. delbrueckii*, en condiciones de fermentación bajo dos concentraciones extremas de amonio. El amonio, aunque se emplea comúnmente como fuente de nitrógeno para asegurar una correcta fermentación, tiene un impacto negativo (principalmente a través de la NCR) en la liberación de ciertos compuestos aromáticos, entre ellos los tioles. Así, en esta parte de la Tesis se analizó cómo la co-inoculación de levaduras, no solo contribuye directamente al perfil químico de los vinos, sino también cómo esta afecta a la respuesta de las levaduras a la alta concentración de amonio. Se observó que el efecto de la interacción con *T. delbrueckii* parece reducir el impacto de la alta dosis de amonio en *S. cerevisiae*, tanto a nivel fenotípico como a nivel de la respuesta transcripcional en *S. cerevisiae*.

SUMMARY

Winemaking is related with a great diversity of microorganisms, from those that inhabit the vineyards soil –determining health and productivity of vines- to those that, establishing grape must microbiota, participate in the fermentative processes in the winery. Among this diversity, yeasts stand out because they perform the alcoholic fermentation and, thanks to their diverse metabolism and enzymatic pathways, release a great variety of metabolites, determining the chemical composition of wine, and therefore, its sensory properties. Since the first winemaking practices (dated about 7,500 years ago), yeasts have been exposed to the harsh conditions of must and wine fermentation, due to both abiotic (high osmotic pressure, increasing ethanol concentration, low pH, essential nutrients depletion) and biotic factors (inter- and intraspecific microbial interactions). These conditions have forced a quick adaptive process that, driven by natural and anthropic selection forces, has originated strains that are highly adapted to wine environment and are able to positively contribute to wine properties.

The enzymatic releasing of varietal aromas –from its conjugated precursors found in grape must- is one of the yeast metabolic mechanisms that can contribute to the sensory profile of wines. Volatiles thiols (4MPS, 3SH and 3SHA) stand out among these aroma compounds, because of their great impact on aroma typicality of wines –explained by the extremely low perception threshold-, imparting tropical and fruity aromas. Yeasts are able to consume the thiolic precursors found in grape must (mostly conjugated with cysteine or glutathione) through amino acids permeases and then cleave their C-S bound through β -lyase enzymes, releasing the corresponding free volatile thiol. Although factors like grape variety, vineyard nutrition or fermentation nutrition can contribute to the thiolic content of wines, the direct role of yeast metabolism on thiols production makes the search and selection of strains with a great enzymatic potential on the releasing of these compounds a very interesting strategy for the aromatic enhance of wines.

Saccharomyces cerevisiae strains, despite dominating alcoholic fermentation of wine and being determinant on its chemical composition, have a limited enzymatic ability to release thiols. This can be explained by the strong Nitrogen Catabolism Repression (NCR) on *S. cerevisiae* strains, but mainly by the fact that most of the *S. cerevisiae* wine strains harbour an allelic variant of *IRC7* gen -encoding a cystathionine-S- β -lyase

SUMMARY

enzyme, directly related to 4MSP thiol production- with a 38pb deletion (*IRC7^S*), that expresses a less functional enzyme. In this context, the first study presented in this Doctoral Thesis includes the investigation of the distribution of *IRC7* alleles in different phylogenetic lineages of *S. cerevisiae*. Thus, we confirmed that the high prevalence of the *IRC7^S* allele was exclusive of the Wine lineage. Although this allele was found, in a minority way, in other domesticated lineages, it was completely absent in the wild lineages of *S. cerevisiae*. Also, we demonstrated that the strains homozygous for the *IRC7^S* allele (HS) show a proliferative and competitive advantage against strains homozygous for the *IRC7* wild-type allele, *IRC7^F* (HF). Although we observed that certain activities directly related to the enzymatic activity of Irc7p can contribute to the advantageous phenotype of HS strains (i.e. better response to oxidative stress and higher tolerance to high concentration of copper), in this study we also identified a set of sequence variants with significant co-occurrence patterns with the *IRC7^S* allele, which may contribute to the phenotypic pattern observed in the HS strains, and therefore, to its high prevalence in wine strain populations.

Since the lower ability for thiol production of most of *S. cerevisiae* wine strains was confirmed, we decided to explore the use of non-*Saccharomyces* as a strategy to increase the thiolic content in wine. We studied the contribution of two non-*Saccharomyces* species (*Torulaspora delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima*) to the wine properties in sequential fermentations of *Verdejo* grape must, with two *S. cerevisiae* strains (with different *IRC7* genotype, HS and HF). Both non-*Saccharomyces* yeasts contributed to the increase in thiol concentration in wines, highlighting the production of 4MSP by *T. delbrueckii* strain. The high thiol production, along with a decrease in the fermentative aroma content -which can have a masking effect over the minority aromas- resulted in the improvement of wine sensory quality, enhancing the tropical character and *Verdejo* typicality of wines. In addition, sequential fermentations with both non-*Saccharomyces* yeasts modified other oenological parameters of interest, as the decrease in acetic acid and ethanol concentration, or the increase in glycerol content in wine.

Even though the positive effect of non-*Saccharomyces* species was demonstrated in wine sensory profile, they generally show a poor fermentative performance and low ethanol tolerance. Hence, the use of the non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking is restricted to a co-inoculation with *S. cerevisiae*. In this context, we decided to explore the phenotypic and transcriptional effect of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* in fermentations

under two extreme nitrogen conditions. Ammonia is commonly added as a nitrogen source to ensure a correct fermentation. However, it has a negative impact (mainly through NCR mechanisms) on the production of certain aromatic compounds, such as varietal thiols. Thus, in the last study included in this Doctoral Thesis we analysed how yeasts co-inoculation affects, not only the chemical profile of wines, but also the response of yeasts to high ammonia concentration. We observed that co-inoculation with *T. delbrueckii* seems to reduce the impact of high ammonium doses in *S. cerevisiae* during wine fermentation, both at phenotypic and transcriptional levels.

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Microbiología del Vino

1.1.1 Enología - La ciencia del vino

A lo largo de la historia y alrededor de todo el mundo, distintas culturas descubrieron cómo la fermentación de productos ricos en azúcares -a través de la producción de etanol- permitía preservar los alimentos, y además disfrutar de los efectos analgésicos y euforizantes de los mismos. El vino, fruto de la fermentación alcohólica del zumo de uva, destaca entre estos productos fermentados por ser una bebida alcohólica en la que tanto los factores físicos, químicos y biológicos, como los factores culturales, convergen creando una compleja matriz que hace de él un alimento único. Análisis sobre las jarras de cerámica encontradas en un emplazamiento del neolítico temprano en China han permitido estimar que ya se producía una bebida fermentada a base de arroz, miel y frutas hace alrededor de 9.000 años (McGovern *et al.*, 2004). Un estudio más reciente encontró las primeras pruebas de elaboración de vino en restos de cerámica en Georgia hace entre 7.000 y 8.000 años (McGovern *et al.*, 2017). Así, durante varios milenios de historia, y gracias al desarrollo y expansión de la viticultura, el vino se ha convertido en uno de los alimentos más importantes en todo el mundo, tanto por su complejidad sensorial como por su valor socioeconómico y cultural. La Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV) estimó que en 2019 más de 7.400.000 hectáreas están dedicadas a la producción de vino en todo el mundo, con una producción global de más de 260 millones de hectolitros de vino, siendo Italia (18,3% del total), Francia (16,2%) y España (12,9%) los mayores productores (OIV, 2019). En 2019, el mercado de exportación mundial de vino se estimó en un valor de más de 31 mil millones de euros (OIV, 2019). Este impacto económico tiene reflejo en el gran interés que suscita el vino como objeto de estudio científico, con más de 80.000 publicaciones científicas al año durante la última década (Tempère *et al.*, 2018), abarcando toda una disciplina científica, la enología. Esta ciencia multidisciplinar estudia la influencia de factores fisicoquímicos (clima, topografía, composición del suelo), tecnológicos (prácticas en viñedo y en bodega), biológicos (variedades de la uva, microbiota asociada), y la interacción entre todos ellos, en las propiedades del vino y su calidad final. El extenso conocimiento que aporta la enología permite optimizar el proceso de elaboración del vino, haciéndolo más seguro y predecible, y adaptándolo a las nuevas demandas del consumidor y exigencias del mercado.

INTRODUCCIÓN

Dentro de todos los factores que afectan a la producción y propiedades del vino, los microorganismos constituyen uno de los más determinantes. Las comunidades microbianas del suelo de los viñedos que determinan su fertilidad, los hongos fitopatógenos que afectan a las vides, las levaduras y bacterias que llevan a cabo la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica, o las levaduras alterantes del vino, son ejemplos del papel fundamental que juegan los microorganismos en cada una de las etapas de la elaboración de elaboración del vino. Dentro de este proceso, la fermentación alcohólica es la etapa fundamental que determina la elaboración de un vino, pues en ella se produce la conversión del mosto de uva en vino. Las primeras civilizaciones que desarrollaron la técnica de vinificación ya eran conocedoras de que bastaba con prensar las uvas y dejar reposar el mosto para obtener el vino. En ese proceso se llevan a cabo fermentaciones espontáneas en las que las propias levaduras presentes en el hollejo de las uvas realizan la fermentación alcohólica, transformando los azúcares del mosto en etanol y dióxido de carbono (Mortimer y Polsinelli, 1999). A pesar de que durante milenios las técnicas de elaboración del vino fueron perfeccionándose, no fue hasta 1857 cuando los trabajos de Louis Pasteur en las fermentaciones vínicas demostraron que la transformación de mosto en vino no era un proceso meramente químico, sino predominantemente microbiológico (Pasteur, 1860). Años más tardes, en la década de 1880, se desarrolló el primer cultivo puro de levadura para su inoculación en mostos, de la mano de Emil Christian Hansen, en los laboratorios Carlsberg en Dinamarca (Hansen, 1896). Desde comienzos del siglo XXI, la investigación sobre los microorganismos y su aplicación en la industria enológica han crecido de forma exponencial, convirtiéndose en uno de los pilares más importantes de la investigación enológica. Este conocimiento ha permitido que, cada vez más, la vinificación sea un proceso microbiológico controlado, desde el viñedo hasta el embotellado.

1.1.2 El vino como modelo de estudio en ecología

El vino, al igual que otros productos fermentados como el queso o el pan, es producido por la acción de una mezcla, más o menos compleja, de microorganismos sobre una materia prima, en este caso la uva. Tanto en el suelo del viñedo como en la superficie de las uvas, el mosto y el vino (durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica), se puede encontrar una elevada diversidad de microorganismos que se han adaptado eficientemente a vivir en estos ambientes, y cuyas interacciones son un interesante ecosistema microbiano para su estudio (Liu *et al.*, 2018) (Figura 1). A pesar de lo efímero

de este ecosistema (los procesos fermentativos se desarrollan durante unos pocos meses al año), en el viñedo y la bodega se establece un reservorio de microorganismos que permite, vendimia tras vendimia, estabilizar una determinada microbiota residente que contribuirá, en mayor o menor medida, a los procesos fermentativos desarrollados en la bodega (Morrison-Whittle y Goddard, 2018; de Celis y Ruiz *et al.*, 2019).

1.1.2.1 Microbiología en el viñedo

A pesar de que durante las primeras décadas de investigación en microbiología enológica han pasado inadvertidos o subestimados, los microorganismos asociados al viñedo representan un interesante objeto de estudio por su gran impacto, directo o indirecto, en la industria del vino.

1.1.2.1.1 Microorganismos fitopatógenos en el viñedo

Ciertas especies de hongos filamentosos tienen una influencia negativa como agentes causantes de algunas de las principales enfermedades de la madera de la vid, y de distintos tipos de podredumbre sobre la uva. Entre las principales enfermedades de origen fúngico en la vid, destacan la yesca (causada por especies de los géneros *Phaeoacremonium* y *Cadophora*) y el pie negro (*Campylocarpon*) (Gramaje *et al.*, 2018). Además, ciertos hongos ascomicetes de la vid pueden colonizar las uvas cuando su piel está dañada, no solo deteriorándolas o impidiendo su maduración, sino también produciendo micotoxinas o compuestos aromáticos que pueden influir negativamente en la calidad sensorial del vino (Kassemeyer, 2017). A modo de ejemplo cabe mencionar la infección por *Botrytis cinerea*, causante de la botritis y productor de ácido glucónico, que proporciona un característico y pronunciado sabor en el vino (Steel *et al.*, 2013), y puede tener un efecto directo sobre la composición de las poblaciones microbianas (Mills *et al.*, 2002). Bacterias como *Agrobacterium vitis* o *Xylella fastidiosa* también se han descrito como fitopatógenos causantes de enfermedades en las vides.

1.1.2.1.2 Microbiota en el suelo del viñedo

La microbiota asociada al suelo del viñedo resulta determinante, no solo para las propiedades químicas y nutricionales del suelo, sino también para la salud, el rendimiento y la calidad de las vides y las uvas. Además, la microbiota del suelo puede servir como reservorio de la microbiota de las uvas, principalmente bacterias (Zarraonaindia *et al.*, 2015), pero también hongos o ciertas levaduras fermentativas (Morrison-Whittle y Goddard, 2018), que pueden participar en la fermentación del vino (Mandl *et al.*, 2015).

INTRODUCCIÓN

De esta manera, los microorganismos asociados al suelo del viñedo, cuyas comunidades son específicas de los distintos tipos de suelo, pueden contribuir, junto con otros factores, a la expresión de las variaciones regionales en los rasgos de calidad del vino, contribuyendo así al *Terroir* en el vino (Knight *et al.*, 2015; Bokulich *et al.*, 2016; Belda *et al.*, 2017a; Liu *et al.*, 2019). Este concepto se define como la expresión de los factores físicos (clima, propiedades del suelo, orientación, etc.) y biológicos (variedad de uva, biodiversidad asociada, microbiota de las uvas y vides) del viñedo -que son representativos de las distintas regiones vitivinícolas- en la composición química del vino, y, por tanto, en sus propiedades sensoriales del vino.

1.1.2.1.3 Microbiota en las uvas

Las uvas constituyen el reservorio natural de multitud de microorganismos, muchos de los cuales tienen un gran interés en el posterior proceso de elaboración del vino. En las uvas se han identificado más de 50 especies diferentes de bacterias, que van desde especies ubicuas (*Enterobacter*, *Enterococcus*, *Bacillus* o *Staphylococcus*) sin capacidad de desarrollarse apreciablemente en el mosto de uva, hasta bacterias con una implicación importante en las etapas finales del proceso de vinificación (bacterias acéticas y lácticas) (Barata *et al.*, 2012). Por otro lado, una gran diversidad de levaduras (aproximadamente 47 especies, pertenecientes a 22 géneros) también se encuentra en la superficie de las uvas (Renouf *et al.* 2007), La microbiota de las uvas intactas es muy parecida a la encontrada en las superficies de las hojas de la vid, dominada por levaduras basidiomicetes (*Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. y *Sporobolomyces* spp.) y el hongo levaduriforme *Aureobasidium pullulans*. La aparición de microfisuras en la superficie de la uva, junto con su maduración, aumentan la disponibilidad de nutrientes y permiten la presencia de especies ascomicetes oxidativas (o poco fermentativas) como las pertenecientes a los géneros *Candida*, *Hanseniaspora* o *Pichia* (Bisson y Joshep, 2009). Cuando la uva está dañada, la alta concentración de azúcares en la superficie permite el crecimiento de ascomicetes con mayor actividad fermentativa como *Zygosaccharomyces* spp., *Debaryomyces* spp., *Torulaspota* spp. y *Saccharomyces* spp. La especie *Saccharomyces cerevisiae* (la principal levadura responsable de llevar a cabo la fermentación vínica), aunque presente en la uva, se encuentra en baja proporción (Beltran *et al.*, 2002). Además de la integridad de la uva, otros factores como las condiciones climáticas, el manejo del viñedo (su nutrición o tratamientos con herbicidas y fungicidas) o la variedad de la uva pueden afectar a la diversidad de levaduras. También se han

descrito que insectos como avispas o moscas *Drosophila*, e incluso aves, pueden servir de vectores para las levaduras, contribuyendo a la dispersión y diversidad de las poblaciones en las uvas (Stefani *et al.*, 2012).

1.1.2.2 Microbiología en la bodega

Dentro de las comunidades microbianas de las uvas, junto con la microbiota residente en las bodegas, encontramos especies de bacterias y levaduras que han desarrollado mecanismos adaptativos para sobrevivir y crecer en el mosto de uva y durante la fermentación, por lo que constituyen realmente el consorcio microbiano del vino, con influencia directa en las propiedades finales del mismo (Barata *et al.*, 2012).

1.1.2.2.1 Fermentación alcohólica

Las levaduras responsables de la fermentación alcohólica son los principales microorganismos fermentativos en la producción del vino. Además de su alta especialización para llevar a cabo esta fermentación, las levaduras producen una gran cantidad de metabolitos que determinan en gran medida la matriz química del vino y, por tanto, sus características sensoriales (Pretorius, 2000). Cuando la uva llega a la bodega, su microbiota entra en contacto con la microbiota residente de las instalaciones y los equipos de la bodega, principalmente representada por *S. cerevisiae* (Beltran *et al.*, 2002). En el momento que se produce el prensado de las uvas para obtener el mosto, los azúcares del mismo son accesibles para estas levaduras, y comienza la fermentación. A medida que avanza este proceso se produce una sucesión ecológica de especies de levaduras, donde ocurren distintos tipos de interacciones fisiológicas y metabólicas entre ellas (Liu *et al.*, 2018). Inicialmente, se puede encontrar levaduras apiculadas osmófilas de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Rhodotorula* o *Cryptococcus*, que rápidamente son reemplazadas por levaduras con mayor capacidad fermentativa (*Schizosaccharomyces* spp., *Metschnikowia* spp., *Starmerella* spp., entre otros). A partir de un 4% de etanol (3-4 días desde el inicio de la fermentación) *S. cerevisiae* comienza a dominar el proceso, aunque aún es posible encontrar algunas especies de levaduras con cierta tolerancia a etanol como las pertenecientes a los géneros *Torulaspora*, *Lachancea*, *Zygosaccharomyces* y *Metschnikowia* (Ciani y Comitini, 2019). Estas levaduras (conocidas como levaduras no-*Saccharomyces*) presentes de forma natural en el mosto de uva pueden coexistir con las cepas *S. cerevisiae* durante las primeras etapas de la fermentación y tener también un papel importante en el proceso de vinificación hasta la implantación final de *S. cerevisiae* (Jolly *et al.*, 2014). En el pasado, las levaduras no-

INTRODUCCIÓN

Saccharomyces eran consideradas fundamentalmente como levaduras alterantes del vino, contribuyendo negativamente a sus cualidades organolépticas y principalmente asociadas a un exceso en la producción de ácido acético. Sin embargo, en las últimas décadas, los estudios sobre las levaduras no-*Saccharomyces* han demostrado su gran potencial en la mejora de la calidad de los vinos, tanto desde un punto de vista tecnológico como sensorial (Fleet, 2008; Jolly *et al.*, 2014, Padilla *et al.*, 2016; Belda *et al.*, 2017b). De hecho, en los últimos años se han desarrollado estrategias de co-inoculación (simultánea o secuencial) con *S. cerevisiae*, favoreciendo su aportación al vino y ejerciendo una influencia más evidente, tanto a nivel ecológico (afectando a la dominancia de *S. cerevisiae*) como a nivel organoléptico (a través de la producción de metabolitos específicos) (Benito *et al.*, 2019a).

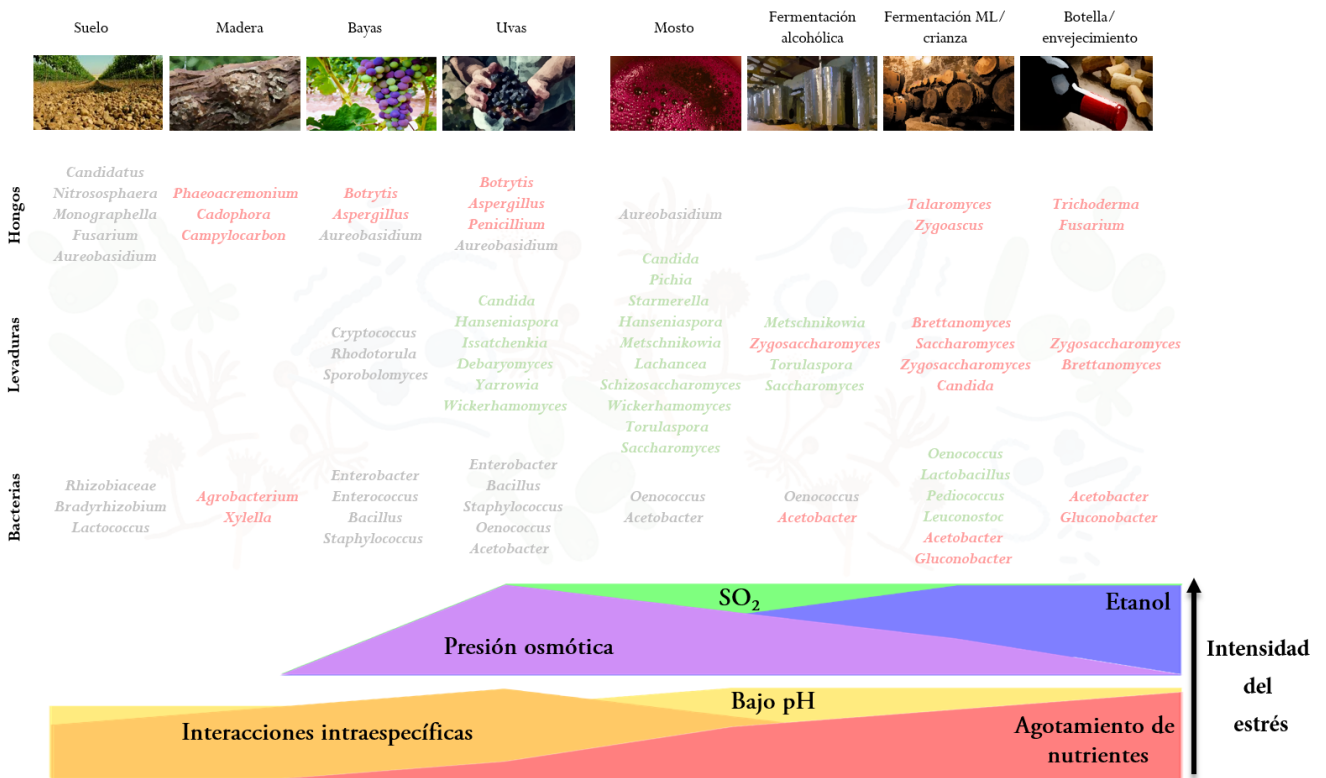


Figura 1: Diversidad de géneros de microorganismos (hongos, levaduras y bacterias) encontrada en cada una de las etapas de la elaboración del vino en la bodega. Su potencial contribución a las propiedades al proceso de vinificación (a nivel tecnológico o sensorial) está representada por los colores verde, rojo y gris, ya sea una contribución positiva, negativa o neutra, respectivamente. Se representan también los distintos estreses abióticos o bióticos que afectan a la diversidad de microorganismos.

1.1.2.2.2 Fermentación maloláctica

Una vez finalizada la fermentación alcohólica se produce el proceso de fermentación maloláctica, llevado a cabo por las bacterias lácticas del vino. Estas bacterias se encuentran de forma limitada en la uva y durante la fermentación alcohólica, pero al final de la misma comienzan su crecimiento y llevan a cabo la fermentación maloláctica. En este proceso se produce la descarboxilación del ácido málico, presente de forma natural en el mosto de uvas, en ácido láctico y CO₂, lo que produce una desacidificación, reduciéndose el carácter áspero y astringente del vino. Durante este proceso metabólico, las bacterias lácticas son capaces de producir, además, ciertos metabolitos con una influencia organoléptica positiva en el vino, como el diacetilo que aporta aromas lácteos o ciertos exopolisacáridos (Liu *et al.*, 2002). En contraposición, el metabolismo de ciertas especies lácticas puede también producir compuestos tóxicos como aminas biógenas (Coton *et al.*, 2010) o carbamato de etilo en el vino (Araque *et al.*, 2009, Pérez-Magariño *et al.*, 2021). *Oenococcus oeni* es la principal bacteria láctica que lleva a cabo esta fermentación -empleada incluso como inóculo artificial en algunas fermentaciones industriales- aunque también destacan los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Lerm *et al.*, 2010).

1.1.2.2.3 Etapas post-fermentativas

Tras la finalización de las etapas fermentativas del vino, comienza el proceso de almacenamiento o, en algunos casos, de envejecimiento del vino. A pesar de las condiciones fisicoquímicas de esta etapa del proceso de vinificación, donde se ha producido el agotamiento de la mayoría de los nutrientes y existe una elevada concentración de compuestos tóxicos como el etanol o el acetaldehído, ciertas especies de microorganismos (ej. *Brettanomyces* spp.) son capaces de sobrevivir en este ambiente, pudiendo tener un efecto negativo como contaminantes y deteriorantes del vino (Cosme *et al.*, 2018). Por un lado, las bacterias acéticas, entre las que destacan las especies de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, constituyen una de las primeras fuentes de alteración de los vinos. Estas bacterias son aerobias y, aunque las condiciones de la fermentación reducen su población notablemente, pueden también sobrevivir en ausencia de oxígeno. Bajo condiciones aerobias son responsables de la oxidación del etanol producido en la fermentación a ácido acético. Por ello, si las condiciones de almacenamiento no mantienen una baja disponibilidad de oxígeno, estas bacterias pueden

INTRODUCCIÓN

proliferar, dando lugar al picado acético que aporta a los vinos un característico sabor avinagrado (Barata *et al.*, 2012).

También se pueden encontrar determinadas especies de levaduras como contaminantes. Por un lado, levaduras con metabolismo oxidativo, como *Kloeckera* spp. o *Candida* spp., pueden sobrevivir a la fermentación alcohólica formando biopelículas sobre la superficie de los vinos durante su envejecimiento en barrica (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). También, levaduras fermentativas como *Zygosaccharomyces bailii* o especies del género *Saccharomyces*, pueden producir la re-fermentación de vinos dulces o de vinos que no han finalizado correctamente la fermentación alcohólica y aún presentan azúcares residuales. *Brettanomyces/Dekkera* spp. se encuentra también entre las levaduras contaminantes más frecuentes en el vino, siendo responsables de la producción de una gran variedad de compuestos aromáticos negativos, entre los que destaca el 4-etilfenol (asociado a aromas negativos descritos como “olor animal”, “sudor de caballo”, etc.) (Malfeito-Ferreira y Silva, 2019). Por último, cabe mencionar que ciertos hongos filamentosos aislados del corcho de las botellas de vino (como *Trichoderma* spp., o *Fusarium* spp.) pueden producir tricloroanisoles y triclorofenoles, que aportan un aroma mohoso o rancio en los vinos (Tarasov *et al.*, 2017).

1.1.3 Factores abióticos y bióticos y la diversidad de levaduras en el vino

El mosto obtenido de las uvas, por su bajo pH, alta concentración de azúcares, baja proporción de nitrógeno y concentraciones limitantes de fuentes de nutrientes esenciales, entre otros factores, supone un ambiente severo para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (García-Ríos y Guillamón, 2019). A este hecho se suma que la fermentación alcohólica -principalmente durante las primeras etapas- no se desarrolla en un contexto monoxénico, sino que múltiples especies (y cepas de la misma especie) compiten por los recursos, por dominar este nicho y acabar imponiéndose al final de la fermentación (Ciani *et al.*, 2016a; Conacher *et al.*, 2019). En el momento de la inoculación -ya sea intencionada o de forma natural en fermentaciones espontáneas- las levaduras tienen que cambiar adaptarse rápidamente para hacer frente al conjunto de factores abióticos y bióticos del mosto de uva y del vino en fermentación. Estas condiciones llevan a las levaduras a presentar una fase de latencia, cuya duración está principalmente determinada por el cambio entre el metabolismo respiratorio y el metabolismo fermentativo (Vermeesch *et al.*, 2019). Si las levaduras no pueden hacer frente a estas condiciones, no llegarán a desarrollarse y se pueden producir

fermentaciones lentas o incluso paradas en la fermentación - antes del consumo total de azúcares del mosto- (Bisson, 1999), con las consecuencias económicas que implica en la producción de vino. Así, el estudio sobre cómo estos factores afectan a las levaduras y su diversidad durante la fermentación supone un gran interés en la industria enológica.

1.1.3.1 Factores abióticos

El bajo pH del mosto es uno de los principales factores que acotan la diversidad microbiana capaz de desarrollarse en él. Este pH –entre 3 y 4 (Heard y Fleet, 1988)- está determinado principalmente por la concentración de ácidos orgánicos de la uva (ácido tartárico, málico, cítrico, ascórbico y tánico, entre otros) (Vilela, 2019). Estos ácidos inorgánicos, al entrar en la célula, liberan iones que pueden alterar la homeostasis del pH intracelular. El bajo pH afecta a la integridad y función de proteínas, y a la organización lipídica de las membranas, aumentando la sensibilidad al etanol y a los sulfitos, permitiendo únicamente el desarrollo de especies de levaduras y bacterias acidófilas, (Hernández *et al.*, 2007). Por otro lado, los mostos con pH más altos, comunes en zonas cálidas (donde la rápida acumulación de azúcares adelanta la vendimia de las uvas e impide alcanzar altas concentraciones de ácidos en las mismas) pueden favorecer el riesgo de contaminación microbiológica por levaduras menos acidófilas, como *Brettanomyces* spp. (Petrie y Sadras, 2008). La actividad de las levaduras durante la fermentación también puede modificar los parámetros fisicoquímicos del mosto. A modo de ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe* es capaz de metabolizar el ácido málico a ácido pirúvico gracias a su enzima ácido málico descarboxilasa, reduciendo así la acidez total del vino (Benito, 2019).

La diversidad microbiana también está determinada por la temperatura durante la fermentación del vino. Las fermentaciones a baja temperatura (o la maceración prefermentativa de los hollejos de las uvas en frío) delimita especialmente la diversidad de levaduras, permitiendo solo el desarrollo de especies de levaduras con cierta tolerancia al frío en este tipo de fermentaciones. Esto es debido a que las bajas temperaturas provocan un descenso de la fluidez de membrana, la estabilización de estructuras secundarias de los ácidos nucleicos, la reducción del plegamiento de proteínas, y el descenso general de la actividad enzimática (Sahara *et al.*, 2002). Las cepas de *S. cerevisiae* presentan una tolerancia al frío moderada, por lo que, bajo estas condiciones, permiten una mayor presencia de ciertas especies no-*Saccharomyces*, como *Hanseniaspora* spp. o *Candida zemplinina* (Zott *et al.*, 2008). Dentro del género

INTRODUCCIÓN

Saccharomyces, las especies *S. uvarum*, *S. eubayanus* y *S. kudriavzevii* muestran mayor criotolerancia que *S. cerevisiae* (García-Ríos y Guillamón, 2019). Sin embargo, no son adecuadas para llevar a cabo la fermentación alcohólica por la mayor sensibilidad al etanol. Las estrategias de hibridación entre estas especies *Saccharomyces* permiten la obtención de híbridos con las propiedades de ambos parentales, lo que les hace óptimos para llevar a cabo este tipo de fermentaciones a baja temperatura (Origone *et al.*, 2018).

La adición de conservantes durante el proceso de vinificación limita también la diversidad de microorganismos. Tanto los compuestos de cobre, comúnmente usados en el viñedo como fungicidas, y también para evitar aromas azufrados negativos durante la fermentación (Swiegers y Pretorius, 2007), como el dióxido de azufre (SO₂) añadidos en la bodega durante la fermentación vínica para proteger frente a microorganismos contaminantes y preservar el vino por su acción antioxidante (Boulton *et al.*, 1995), tienen un efecto antimicrobiano, principalmente por su capacidad de unirse a metabolitos y enzimas, interfiriendo múltiples procesos celulares (Hinze y Holzer 1986). El empleo de anhídrido sulfuroso limita especialmente la diversidad de levaduras no-*Saccharomyces*, altamente sensibles a los sulfitos (Jolly *et al.*, 2014). Solo algunas especies de levaduras además de *S. cerevisiae*, como *Z. bailii* o *S. pombe* son resistentes a altas concentraciones de sulfitos. Las levaduras también pueden modificar el contenido en sulfitos durante la fermentación. Por un lado, las levaduras producen SO₂ de forma natural, como un metabolito intermediario en la ruta de reducción del sulfato (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Esto puede afectar al posterior desarrollo de bacterias responsables de la fermentación maloláctica (Quirós *et al.*, 2012). Por otro lado, las levaduras también producen compuestos derivados de su metabolismo central, como el acetaldehído o el α -cetoglutarato, que pueden unirse a las moléculas libres de SO₂ afectando a su disponibilidad y, por tanto, a su actividad antimicrobiana (Wells y Osborne, 2011).

La alta concentración de azúcares del mosto de uva, normalmente entre 170 y 220 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), también afecta negativamente a la viabilidad de las levaduras. En general, las levaduras no-*Saccharomyces* son más sensibles al estrés osmótico que *S. cerevisiae*, aunque algunas especies como *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii* o *Metschnikowia pulcherrima* pueden mostrar cierta resistencia (García *et al.*, 2016). Por otro lado, las concentraciones sucesivamente crecientes de etanol durante la fermentación alcohólica (hasta un 12% - 16% (v/v) en la mayoría de los vinos) es el factor más determinante de la dinámica poblacional que ocurre durante este proceso. El etanol, incluso a bajas concentraciones, provoca la desnaturalización de

enzimas, aumenta la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática, aumenta la concentración de especies reactivas de oxígeno y provoca daño en el ADN, lo que lleva a una pérdida drástica de la viabilidad celular (Yang *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2010). La mayor tolerancia a altas concentraciones de etanol de *S. cerevisiae* le permite, entre otros factores, dominar la fermentación vínica (Boulton *et al.*, 1995), provocando la progresiva desaparición de las levaduras no-*Saccharomyces*. Estas levaduras tienen una tolerancia máxima de alrededor de 6% (v/v) (Fleet *et al.*, 1993), siendo superior sólo en algunas especies con carácter más fermentativo como *T. delbrueckii* o *S. pombe* (Benito *et al.*, 2019b). Otras especies contaminantes, como *Zygosaccharomyces* spp. o *Brettanomyces* spp., pueden mostrar tanta tolerancia al etanol como las especies del género *Saccharomyces* (Boulton *et al.*, 1995).

Durante la fermentación vínica también se produce el agotamiento de nutrientes esenciales que están en una concentración limitante en el mosto. Entre ellos, destacan los compuestos nitrogenados del mosto de uva (amonio, aminoácidos, polipéptidos y proteínas y, en pequeña concentración, nitratos, nucleótidos, aminos y vitaminas) siendo el amonio y los aminoácidos los únicos que constituyen el nitrógeno del fácilmente asimilable por las levaduras (NFA) (Gobert *et al.*, 2017). La concentración mínima de NFA que permite a las levaduras completar la fermentación -i.e. consumir la totalidad de azúcares del mosto- es de aproximadamente 140 mg N/L (Beltran *et al.*, 2005). Sin embargo, es común que los mostos no alcancen esta concentración. Además, la coexistencia de levaduras durante las primeras fases de las fermentaciones espontáneas, o la co-inoculación industrial de distintas especies, puede llevar al agotamiento temprano de las fuentes de nitrógeno, dificultando el desarrollo normal de la fermentación por parte de la cepa de *S. cerevisiae* y llevando a paradas en la fermentación (Rollero *et al.*, 2018). Por ello, la adición de nitrógeno al inicio de la fermentación, principalmente en forma de sales de amonio, es práctica habitual en las bodegas para permitir a las levaduras completar la fermentación alcohólica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.1.3.2 Factores bióticos

El vino representa un ambiente altamente competitivo, especialmente durante las primeras etapas de la fermentación, cuando coexisten un elevado número de especies y cepas de levadura y bacterias. Este contexto ecológico resulta fundamental para entender como las levaduras se han adaptado a los factores estresantes del ambiente vínico (Conacher *et al.*, 2019). El ecosistema microbiano del vino, principalmente representado

INTRODUCCIÓN

por la diversidad de levaduras existente y sus patrones de interacción, es también un factor decisivo en la calidad final del vino. Las interacciones, tanto intra- como interespecíficas, entre las levaduras durante la fermentación puede determinar la dominancia de *S. cerevisiae* y la contribución individual de cada especie de levadura a la composición del vino, a través de la producción de metabolitos específicos dentro de cada especie o cepa (Fleet, 2003; Ciani *et al.*, 2016a). Durante la fermentación del vino se producen numerosos tipos de interacciones (tanto negativas como positivas) entre las levaduras presentes de forma natural en el mosto de uva o inoculadas artificialmente (Liu *et al.* 2017).

El principal factor biótico que afecta a la interacción entre levaduras es la competición por nutrientes (Lleixà *et al.*, 2016). Por ello, la alta capacidad de las levaduras para rápidamente consumir las fuentes de carbono y nitrógeno del mosto les proporciona una gran ventaja adaptativa. Además de la capacidad de consumir rápidamente las fuentes de carbono y producir etanol durante la fermentación, la competencia por las fuentes de nitrógeno limitantes en el mosto es uno de los factores más determinantes en la dinámica de poblaciones durante este proceso. Por ello, los requerimientos nutricionales y las tasas de consumo de fuentes nitrogenadas de las levaduras vínicas serán determinantes para definir las interacciones entre las especies de levaduras durante la fermentación (Kemsawasd *et al.*, 2015; Roca-Mesa *et al.*, 2020). Por otro lado, la actividad de ciertas especies no-*Saccharomyces* puede tener un efecto positivo en la disponibilidad de nutrientes. Algunas cepas del género *Hanseniaspora* pueden enriquecer el contenido en nitrógeno del mosto gracias a su actividad proteolítica, promoviendo en co-fermentaciones el crecimiento de *S. cerevisiae* (Dizzy y Bisson, 2000).

Las levaduras pueden también pueden competir en el ambiente vínico a través de la producción de compuestos antimicrobianos. Ciertas levaduras pueden secretar toxinas de naturaleza proteica que son letales frente a un amplio rango de géneros de levadura, e incluso otras cepas de la misma especie (Marquina *et al.*, 2002). Aunque este fenómeno, llamado *killer*, fue descrito por primera vez en *S. cerevisiae*, una gran variedad de géneros de levaduras es capaz de secretar este tipo de toxinas, como *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Williopsis*, *Pichia*, etc. Estas toxinas, codificadas habitualmente en ARN de doble cadena de origen vírico, desencadenan distintos mecanismos de acción en las levaduras sensibles, la mayoría de ellos centrados en la membrana plasmática y en la pared celular. La capacidad de las levaduras de producir toxinas *killer*, y de resistir a ellas, es un factor

determinante en la capacidad competitiva de las cepas empleadas en la fermentación, y, por tanto, del éxito de implantación al final de la misma. Otros metabolitos producidos por las levaduras también pueden tener actividad antimicrobiana, incluyendo etanol o compuestos derivados de aminoácidos aromáticos como serotonina o triptamina (González *et al.*, 2018). También se han observado interacciones positivas entre las levaduras durante la fermentación del vino también. Por un lado, la autólisis de las levaduras no-*Saccharomyces* después de las primeras etapas de la fermentación puede liberar nutrientes que favorecen el crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae*. De la misma manera, la autólisis de las células de *S. cerevisiae* después de la fermentación alcohólica puede suponer una fuente de micronutrientes que favorecen el crecimiento de levaduras contaminantes como *Dekkera/Brettanomyces* spp. (Guilloux-Benatier *et al.*, 2001).

Las levaduras, como cualquier célula viva, produce moléculas señal que son recibidas por otras células, desencadenando una respuesta específica que puede coordinar un mecanismo específico en la comunidad, como la fusión sexual. Se han descrito en *S. cerevisiae* procesos de señalización que son dependientes de la densidad celular denominados mecanismos de detección de quórum o *Quorum Sensing* (Chen *et al.*, 2006). Aunque estos mecanismos de comunicación intercelular en levaduras permanecen en su mayoría inexplorados, pueden tener una gran importancia potencial en procesos industriales en la industria alimentaria (Barriuso *et al.*, 2018). Dos moléculas de alcoholes aromáticos (triptofol y 2-feniletanol) han sido identificados como las principales moléculas señalizadoras de *Quorum Sensing*, producidas por *S. cerevisiae* en condiciones de alta concentración celular y baja disponibilidad de nitrógeno (Hazelwood *et al.*, 2008). Estas moléculas pueden desencadenar respuestas como crecimiento filamentos, crecimiento invasivo o adhesión celular (Avbelj *et al.*, 2016). También se han demostrado mecanismos de contacto célula-célula en cultivos mixtos de *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae*, que están involucrados en la muerte temprana de poblaciones celulares de no-*Saccharomyces* (Nissen *et al.*, 2003; Renault *et al.*, 2013). Ciertos péptidos de la pared celular de *S. cerevisiae* juegan un papel en la actividad antimicrobiana frente a las levaduras no-*Saccharomyces* (Branco *et al.*, 2017). El contacto célula-célula permite la asociación estructural intraespecífica de las levaduras de la población. Este mecanismo, llamado floculación, está principalmente mediado por los genes de la familia *FLO* y supone un incremento de la protección de las células internas frente al estrés (Smukalla *et al.*, 2008). También se han descrito mecanismos de floculación interespecíficos en levaduras (Rossouw *et al.*, 2018).

INTRODUCCIÓN

Gracias a las tecnologías “ómicas” ha sido posible estudiar en profundidad el efecto de la interacción microbiana en la expresión génica de las levaduras (Belda *et al.*, 2021). Uno de los primeros estudios transcripcionales realizado sobre cómo la co-inoculación de levaduras (*Hanseniaspora guilliermondii* y *S. cerevisiae*) afecta al transcriptoma de *S. cerevisiae*, ha demostrado que la co-inoculación de las levaduras no-*Saccharomyces* tiene un impacto doble en el perfil sensorial del vino (Barbosa *et al.*, 2015a). En primer lugar, debido a las propiedades metabólicas especie-específicas de los no-*Saccharomyces* y, en segundo lugar, por la alteración de los patrones de expresión que causan en los genes de *S. cerevisiae* relacionados con la producción de compuestos aromáticos. De forma similar, los mecanismos de respuesta de *S. cerevisiae* frente a la co-inoculación con *Saccharomyces kudriavzevii* (Alonso-del-Real *et al.*, 2019) y otras especies no-*Saccharomyces*, como *T. delbrueckii*, *H. uvarum* y *C. sake* (Tronchoni *et al.*, 2017; Curiel *et al.*, 2017) han sido estudiados a nivel transcripcional. Sin embargo, el efecto sinérgico de los factores bióticos y abióticos sobre la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* apenas ha sido estudiado. En este sentido, cabe destacar el trabajo de Shekhawat *et al.*, (2019), en el que se analizó el efecto de la co-inoculación de *L. thermotolerans* sobre el transcriptoma de *S. cerevisiae* bajo distintas condiciones de disponibilidad de oxígeno. En el trabajo relativo al capítulo 3 de esta Tesis Doctoral se estudió a nivel transcripcional el efecto conjunto de la represión por amonio y la co-inoculación con *T. delbrueckii* en *S. cerevisiae* bajo condiciones de fermentación vínica (Ruiz *et al.*, 2020a).

1.2 Contribución de las levaduras a las propiedades sensoriales del vino

Las levaduras vínicas no solo son responsables de llevar a cabo la fermentación alcohólica -proceso fundamental en la transformación del mosto de uva en vino- sino que también, como consecuencia de su actividad metabólica, liberan una gran de metabolitos que determinan en gran medida la composición de la matriz química de los vinos y, por tanto, su calidad final. Estas levaduras pueden proceder de la microbiota asociada a la uva y a la bodega en el caso de las fermentaciones espontáneas o, en el caso de fermentaciones dirigidas, de la inoculación intencionada de cepas seleccionadas. Las levaduras comerciales inoculadas, normalmente en forma de levadura seca activa, permiten conseguir una fermentación controlada, estandarizándose las características de los vinos así elaborados y con un alto grado de reproductibilidad. Sin embargo, este método puede

afectar a la contribución positiva de las levaduras autóctonas a las propiedades del vino (de Celis y Ruiz *et al.*, 2019). Frente a los problemas de poca seguridad y resultados impredecibles de las fermentaciones espontáneas y, por el contrario, la uniformidad de características del vino y reducción de la biodiversidad de levaduras, surge la alternativa de la selección de levaduras autóctonas con óptimas propiedades enológicas presentes de forma natural en los mostos para su posterior inoculación para la elaboración del vino. A estas levaduras se les presupone un considerable nivel de adaptación a las microcondiciones de la región, pudiendo implantarse y dominar fácilmente el proceso de fermentación frente al resto de la microbiota no deseada asociada a la uva (Nikolaou *et al.*, 2006; Capece *et al.*, 2010).

Tabla 1. Resumen de la contribución de distintas especies de levaduras a la mejora de las propiedades del vino (fermentativas, tecnológicas y sensoriales).

Propiedades enológicas de interés	Especie	Descripción	Referencia	
Fermentativas	Rendimiento alcohólico moderado	<i>S. cerevisiae</i> + <i>S. kudriavzevii</i>	Reducción del rendimiento alcohólico para obtener vinos con un contenido en etanol moderado.	Alonso-del-Real <i>et al.</i> , 2017
	Tolerancia al etanol	Cepa híbrida <i>S. cerevisiae</i> / <i>T. delbrueckii</i>	Alta resistencia al etanol y al ácido acético para la reactivación de paradas de fermentación	Santos <i>et al.</i> , 2008
	Duración adecuada de las fase de latencia	<i>S. cerevisiae</i>	Aumento del tiempo de latencia de <i>S. cerevisiae</i> para favorecer el desarrollo de la cepa de no- <i>Saccharomyces</i> en fermentaciones mixtas	Albertin <i>et al.</i> , 2017
	Rango óptimo de temperatura	<i>S. cerevisiae</i>	Tolerancia a altas temperaturas para su uso en fermentaciones de vino tinto	Marullo <i>et al.</i> , 2009
Tecnológicas	Escasa demanda de nitrógeno	<i>S. cerevisiae</i> var <i>bayanus</i>	Baja demanda de nitrógeno para la fermentación de mostos deficitarios en fuentes nitrogenadas	Schwarz <i>et al.</i> , 2020
	Factor <i>killer</i>	<i>T. delbrueckii</i>	Producción de toxinas <i>killer</i> frente a levaduras contaminantes del vino	Villalba <i>et al.</i> , 2016
	Capacidad de floculación	<i>S. cerevisiae</i>	Capacidad de floculación para facilitar la sedimentación de las levaduras y la filtración del vino	Varela <i>et al.</i> , 2020
	Actividad pectinolítica	<i>M. pulcherrima</i>	Elevada actividad pectinolítica que facilita el proceso de clarificación de vinos	Belda <i>et al.</i> , 2016b
Sensoriales	Producción aromas fermentativos	<i>H. osmophila</i>	Aumento de la liberación del ester 2-feniletil acetato en co-fermentaciones con <i>S. cerevisiae</i>	Viana <i>et al.</i> , 2009
	Liberación de manoproteínas	<i>T. delbrueckii</i>	Aumento del contenido de manoproteínas en vino a través del proceso de envejecimiento sobre lias (mejora de la propiedades en boca)	Belda <i>et al.</i> , 2016d
	Liberación de aromas volátiles	<i>P. kluyveri</i>	Incremento en la liberación de tioles en co-fermentaciones con <i>S. cerevisiae</i>	Anfang <i>et al.</i> , 2009
	Baja producción de aromas azufrados negativos	<i>D. bruxellensis</i>	Baja producción de H ₂ S durante la fermentación alcohólica	Mendes-Ferreira <i>et al.</i> , 2002

La complejidad metabólica de estas levaduras, como consecuencia de la complejidad de su genoma y de su alta especialización para desarrollarse en el ambiente vínico, permite a los enólogos disponer de una gran gama de cepas vínicas con capacidad de contribuir positivamente a las propiedades del vino. A pesar de que *S. cerevisiae* es la principal levadura fermentativa, y su utilización como inóculo en las fermentaciones industriales está ampliamente extendido, el uso deliberado de levaduras no-

INTRODUCCIÓN

Saccharomyces en la fermentación vínica, o la aplicación de prácticas enológicas que favorezcan su desarrollo en fermentaciones espontáneas, se ha convertido en una interesante herramienta para hacer frente a los desafíos de la industria enológica moderna. De hecho, hoy en día, ciertas cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, de géneros como *Torulaspota*, *Lachancea* y *Metschnikowia*, son mundialmente producidas para su distribución y comercialización (Benito *et al.*, 2019a). Dentro de las propiedades deseables en las levaduras para su uso como inóculos en las fermentaciones vínicas, podemos encontrar propiedades tecnológicas, fermentativas y sensoriales (Tabla 1).

1.2.1 Impacto de las levaduras en el perfil aromático del vino

Los parámetros sensoriales del vino -determinados por su composición química- se encuentran entre los más importantes que afectan de la calidad de los vinos. El perfil sensorial está definido por el sabor, los atributos visuales y el aroma, siendo este último el factor más determinante de la calidad sensorial general del vino (Polaskova *et al.*, 2008). El aroma del vino se encuentra influido por varios factores (la variedad de uva, las condiciones geográficas y climáticas, las prácticas en bodega, etc.), jugando los metabolitos liberados por las levaduras durante la fermentación alcohólica un papel fundamental (Swiegers y Pretorius, 2007).

Los compuestos aromáticos del vino, según su origen, se pueden clasificar en aromas varietales (cuyos precursores se encuentran en la uva), aromas fermentativos (procedentes del metabolismo basal de los microorganismos durante la fermentación) y aromas de envejecimiento. Durante el envejecimiento del vino, además de los compuestos derivados de la madera (Tao *et al.*, 2014) y los polisacáridos, manoproteínas, péptidos o aminoácidos derivados de la lisis de células de levaduras y bacterias al final de la fermentación (Pérez-Serradilla y Luque de Castro, 2008), se produce la liberación de enzimas activas que contribuyen a la modificación del aroma durante este proceso. A pesar de la importancia de estos aromas en ciertos tipos de vino, a continuación, se discutirán en detalle la contribución de las levaduras a la producción de aromas varietales y aromas fermentativos, por su relación directa con esta Tesis.

1.2.1.1 Contribución de las levaduras al perfil varietal del vino.

Los aromas varietales son los aromas del vino que vienen determinados por las diferentes variedades de uva (Ruiz *et al.*, 2019a). En la uva podemos encontrar los compuestos aromáticos en forma no volátil, conjugados con azúcares, en el caso de los

terpenos o con aminoácidos o pequeños péptidos, en el caso de los tioles (Baumes, 2009). Las levaduras, gracias a la producción de enzimas específicas, pueden liberar los aromas varietales de la uva mediante su acción sobre los precursores no aromáticos, liberando los correspondientes compuestos volátiles que contribuirán así al aroma del vino.

1.2.1.1.1 Terpenos

Los terpenos son una diversa familia de compuestos aromáticos derivados del isopreno, con un gran impacto en el perfil aromático de los vinos elaborados con variedades “terpénicas” como *Albariño*, *Godello*, *Moscatel* o *Sauvignon*, impartiendo aromas florales, afrutados y cítricos. Dentro de la gran diversidad de terpenos podemos destacar, por su importancia en el aroma del vino, el linalool, el citronelol y el geraniol. En la uva, los terpenos se encuentran en forma de precursores glicosídicos, unidos a monosacáridos (β -D-glucosa) o disacáridos (6-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranososa o 6-O- α -L-arabinofuranosil- β -D-glucopiranososa o 6-O- β -D-apiofuranosil- β -D-glucopiranososa). La fracción volátil puede liberarse mediante hidrólisis ácida durante el envejecimiento de los vinos o por la actividad enzimática de las levaduras (Maicas y Mateo, 2005). La ruptura enzimática consiste en dos pasos; primero, las enzimas de tipo ramnosidasa, arabinofuranosidasa o apiosidasas rompen la unión entre la glucosa terminal y el disacárido correspondiente (ramnosa, arabinosa o apiosa). Después, las enzimas con actividad β -D-glucosidasa liberan los correspondientes monoterpenoides volátiles (Figura 2). En el caso de *S. cerevisiae*, aunque se ha demostrado una pobre producción de enzimas tipo ramnosidasa o arabinofuranosidasa (Delcroix *et al.*, 1994), sí se ha observado cierta actividad β -D-glucosidasa, aunque ésta parece ser una actividad dependiente de cepa, ser sensible al pH y al etanol y estar sometida a represión catabólica por las altas concentraciones de glucosa del mosto (Hernández *et al.*, 2003; Zietsman *et al.*, 2011). Como alternativa, las levaduras no-*Saccharomyces*, debido a su gran diversidad enzimática, aparecen como una interesante herramienta para mejorar la revelación/liberación de este tipo de aromas (Cordero-Otero *et al.*, 2003; Belda *et al.*, 2016a). Aunque estas actividades son raras en especies con cierta actividad fermentativa como *T. delbrueckii* o *Z. bailli*, se ha demostrado que especies como *H. uvarum*, *Debaryomyces* spp. o *Wickerhamomyces anomalus* presentan actividades como β -D-glucosidasa o β -D-xilosidasa y que, a pesar de su menor participación en la fermentación alcohólica, pueden tener un papel importante en la liberación de estos aromas durante las primeras etapas de la misma (Mateo *et al.*, 2011). También se ha detectado la presencia

INTRODUCCIÓN

de actividad β -D-glucosidasa en ciertas cepas de *M. pulcherrima*, que, debido a su moderada actividad fermentativa, puede tener mayor influencia en la revelación aromática durante la fermentación alcohólica (Rodríguez *et al.* 2010). A pesar del prometedor potencial del empleo de ciertas levaduras no convencionales para la mejora de la concentración de terpenos en el vino, aún son necesarios más estudios que permitan entender cómo está regulada la actividad glucosidasa de estas levaduras bajo condiciones de vinificación industrial.

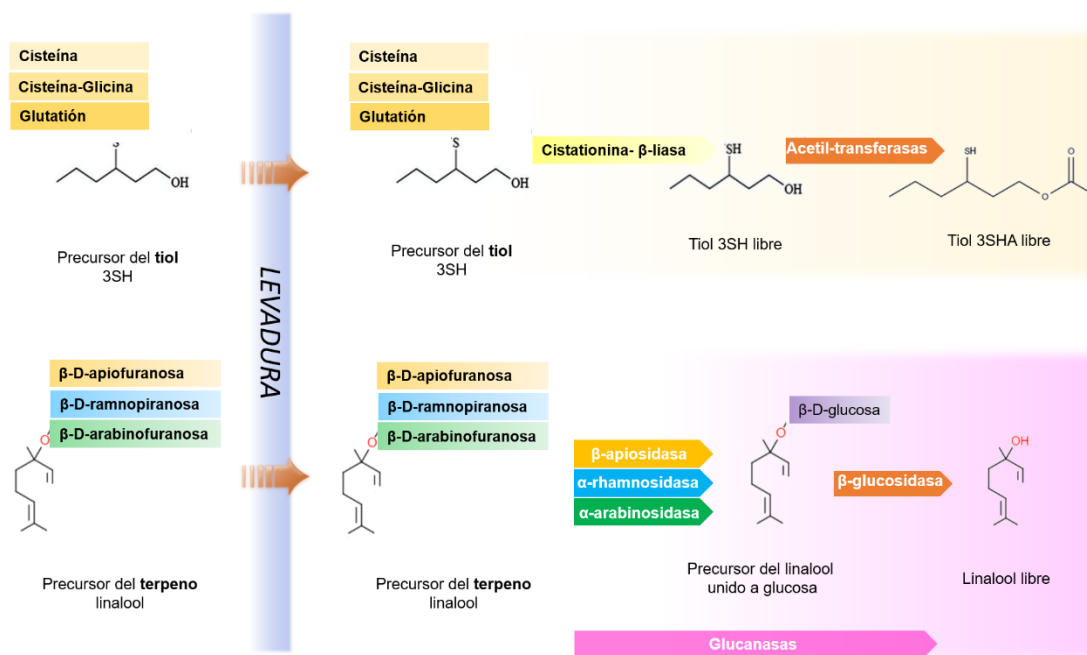


Figura 2: Esquemas de la biogénesis de tioles y terpenos a partir de sus precursores conjugados en la uva. A modo de ejemplo están representados el tiol 3MH y el terpeno linalool. Adaptada de Ruiz *et al.*, (2018).

1.2.1.1.2 Tioles

Los compuestos azufrados liberados por las levaduras durante la fermentación tienen una gran importancia en las propiedades organolépticas del vino, tanto negativa como el H_2S o el metanotiol, como positiva (Mestres *et al.*, 2000; Rauhut, 2017). Dentro de este último, destacan los tioles varietales, principalmente la 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona (4MSP), el 3-sulfanilhexan-1-ol (3SH) y el derivado acetilado de este último, el 3-sulfanilhexil acetato (3SHA). Son responsables del aroma varietal de variedades de vino blanco como Verdejo, *Sauvignon Blanc* o *Gewürztraminer*. A pesar de su baja concentración, estos aromas tienen un importante impacto en el aroma de estos vinos debido a su bajo umbral de percepción (entre 0,8 y 60 ng/L) (Ruiz *et al.*, 2019a) contribuyendo al carácter tropical y afrutado de estos vinos, aportando aromas de boj o grosella en el caso del 4MSP, o fruta de la pasión o maracuyá en el caso del 3SH y 3SHA.

Los aromas tiólicos no se expresan en el mosto de uva, sino que, al igual que los terpenos, se encuentran principalmente en forma de precursores conjugados no volátiles. Durante la fermentación, por acción de las levaduras, se rompen estos precursores, liberando los correspondientes tioles volátiles (Dubourdieu y Lavigne-Cruege, 2004). Los precursores tiólicos son producidos por la vid como un mecanismo de detoxificación a través de la unión de grupos alquenes o alquenos insaturados con glutatión (GSH). Después, el tripéptido GSH es hidrolizado hasta el dipéptido cisteína-glicina o hasta cisteína. Así, en el mosto de uva se pueden encontrar precursores GSH-4MSP, Cys-Gly-4MSP, Cys-3SH, GSH-3SH, Cys-Gly-3SH y Cys-3SH. El tiol 3SHA se forma por acetilación del 3SH liberado durante la fermentación (Waterhouse *et al.*, 2016).

Las levaduras pueden internalizar los precursores tiólicos y después escindirlos liberando los correspondientes tioles libres, usando el amonio y el piruvato derivados de la hidrólisis (Figura 2) (Howell *et al.*, 2004). Los genes implicados en este mecanismo han sido descritos en *S. cerevisiae* (Santiago y Gardner, 2015a) y están representados en la Figura 3. Los precursores tiólicos son internalizados mediante transportadores generales de aminoácidos, principalmente codificados por *GAP1* y *OPT1*. En el citoplasma, enzimas con actividad β -liasa rompen el enlace C-S de los precursores cisteinilados. Los genes *BNA3*, *CYS3*, *GLO1* y, principalmente, *IRC7* codifican para las enzimas implicadas en la liberación de 4MSP a partir de Cys-4MSP (Howell *et al.*, 2004; Roncoroni *et al.*, 2011). *STR3* se ha descrito como el gen responsable de la liberación de 3SH, aunque con baja especificidad (Holt *et al.*, 2012). Los precursores glutatiónilados, una vez en la célula, son transformados en precursores cisteinilados a través de una compleja ruta vacuolar que involucra a varias enzimas codificadas por los genes *DUG1*, *DUG2*, *DUG3*, *ECM38*, entre otros y, a continuación, siguen las vías de hidrólisis ya descritas anteriormente catalizadas por enzimas con actividad β -liasa (Belda *et al.*, 2017b). Respecto al tiol 3SHA, se ha propuesto que es la enzima codificada por el gen *ATF1* la responsable de su transformación desde 3SH (Swiegers *et al.* 2005). A pesar de su baja concentración en el mosto de uva, los precursores tiólicos constituyen una fuente de nitrógeno alternativa para las levaduras. Por ello, los mecanismos de liberación de tioles se encuentran regulados mediante represión catabólica por nitrógeno (NCR) (Harsch y Gardner, 2013). Tanto los genes responsables de la internalización de los precursores, como los genes responsables de su liberación, se encuentran reprimidos en presencia de fuentes preferenciales de nitrógeno, como el amonio (Subileau *et al.*, 2008; Thibon *et al.*, 2008; Deed *et al.*, 2011).

INTRODUCCIÓN

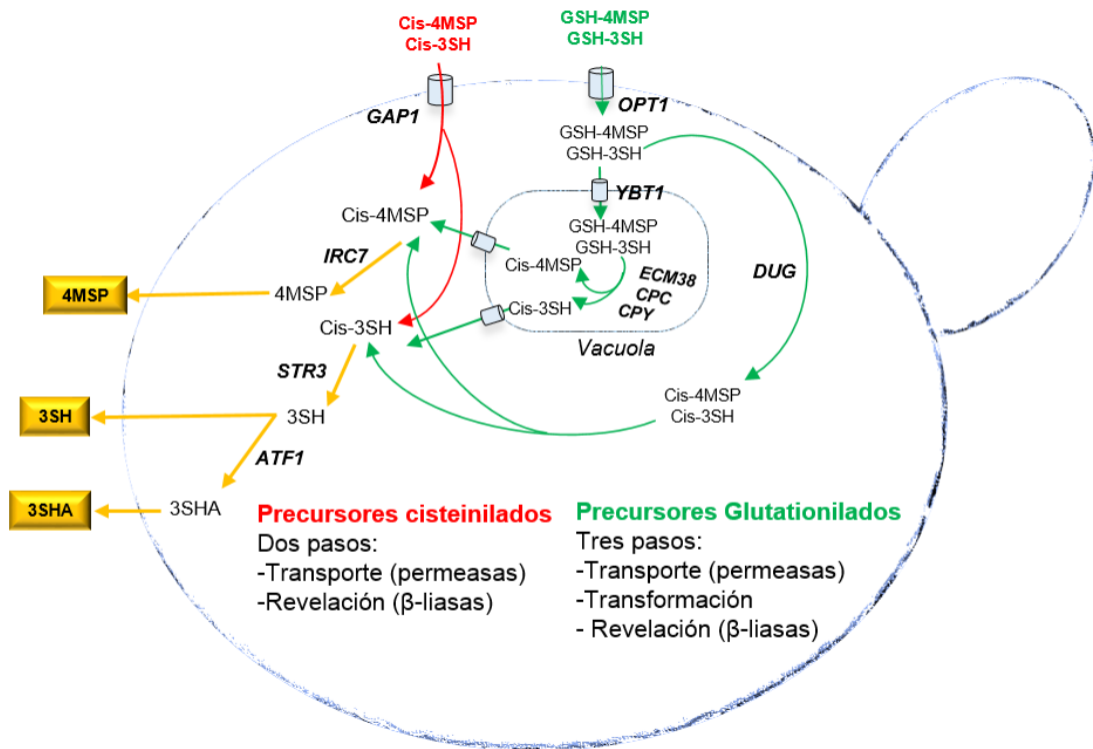


Figura 3: Rutas metabólicas de *S. cerevisiae* involucradas en la producción de tioles varietales. Adaptada de Ruiz et al., (Ruiz et al., 2019a).

El contenido final de tioles en el vino depende directamente de la concentración de sus precursores en el mosto que, a su vez, está determinada por la madurez de la uva, su variedad o los tratamientos con nitrógeno en el viñedo. Además, la cepa o especie de levadura utilizada en la fermentación es uno de los factores más importantes que determinan la concentración de estos compuestos aromáticos (Ruiz *et al.*, 2019a). Se han desarrollado estrategias de búsqueda de cepas con alta capacidad de liberación de tioles en la naturaleza, centrándose en la identificación de variantes alélicas del gen *IRC7* (Patente P-201500195; Belda *et al.*, 2016b). Roncoroni *et al.* (2011) describieron dos variantes alélicas para este gen en *S. cerevisiae*, una variante completa (*IRC7^F*) y una delecionada (*IRC7^S*) con 38 pb menos. Dicha deleción modifica el marco abierto de lectura de forma que aparece un codón de parada temprano, lo que se traduce en una enzima de tamaño inferior (340 aa, en lugar de los 400 aa que componen la enzima íntegra) que, a su vez, presenta una actividad catalítica inferior. Un trabajo posterior llevado a cabo por nuestro grupo de investigación confirmó que las cepas de *S. cerevisiae* que portan en homocigosis el alelo *IRC7^S* presentan una actividad β -liasa reducida y, por tanto, una baja o nula producción del tiol 4MSP (Belda *et al.*, 2016b). Además, ambos estudios confirmaron que la mayoría de cepas vínicas de *S. cerevisiae* son homocigotas

para el alelo deletado *IRC7^S*. Esta paradójica situación, en la que el alelo menos funcional del gen *IRC7* -relacionado directamente con la producción de tioles aromáticos- se encuentra altamente implantado en la población de cepas vínicas de *S. cerevisiae*, ha sido explorada en el marco de esta Tesis Doctoral. Así, se ha podido demostrar que el alelo *IRC7^S* aparece asociado a una serie de singularidades fenotípicas y genómicas dentro de las cepas de *S. cerevisiae* que permiten explicar su alta prevalencia entre las cepas vínicas (Ruiz *et al.*, 2020b).

Esta baja prevalencia de las cepas portadoras de una enzima β -liasa eficiente para la ruptura de los precursores tiólicos, junto con la NCR de los genes implicados en el metabolismo de tioles, hace indicar que la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* poseen una capacidad limitada en la producción de aromas tiólicos. Se ha demostrado que menos del 10% de los precursores en el mosto son transformados en tioles volátiles durante las fermentaciones vínicas (Murat *et al.*, 2001; Swiegers y Pretorius, 2007). Por ello, la búsqueda de levaduras no-*Saccharomyces* para su aplicación enológica se postula como una alternativa de interés en la mejora en la liberación de aromas tiólicos durante la fermentación vínica. La actividad β -liasa moderada es una característica común entre las especies no-*Saccharomyces*, aunque destacan ciertas especies como *T. delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus* y *M. pulcherrima* (Zott *et al.*, 2011; Belda *et al.*, 2016a). Otras especies, como *Pichia kluyveri* o *Candida zemplinina* en co-inoculación con *S. cerevisiae*, han proporcionado en fermentación incrementos en la concentración de tioles producidos al final de la misma, comparadas con las fermentaciones tan solo usando *S. cerevisiae* (Angang *et al.*, 2009; Padilla *et al.*, 2016).

1.2.1.2 Contribución de las levaduras al perfil de aromas fermentativos en el vino.

Los aromas fermentativos derivan del metabolismo central de las levaduras y constituyen el mayor porcentaje del total de compuestos aromáticos del vino. Estos aromas, representados principalmente por alcoholes y ésteres, debido a su alto umbral de percepción, contribuyen conjuntamente al perfil aromático estableciendo una matriz básica de aroma en el vino. Aunque la mayoría de los estudios centrados en determinar el papel del metabolismo de las levaduras en la producción de aromas fermentativos se han centrado en *S. cerevisiae*, las levaduras no-*Saccharomyces*, por su papel en las primeras etapas de la fermentación, también pueden modificar el perfil de aromas fermentativos de los vinos (Gamero *et al.*, 2016). Además, también se ha demostrado que la presencia de

INTRODUCCIÓN

levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación puede afectar a la expresión de determinados genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos en *S. cerevisiae*, afectando a la producción de ciertos aromas fermentativos (Barbosa *et al.*, 2015a; Ruiz *et al.*, 2020a).

1.2.1.2.1 Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores son compuestos aromáticos que derivan del catabolismo de ciertos aminoácidos (valina, leucina, isoleucina, metionina y fenilalanina) a través de la ruta de Ehrlich. Las levaduras consumen estos aminoácidos del mosto y, tras un primer paso de transaminación, producen α -ceto ácidos, que mediante los pasos de descarboxilación y reducción, se transforman en los correspondientes alcoholes superiores (Hazelwood *et al.*, 2008) (Figura 4).

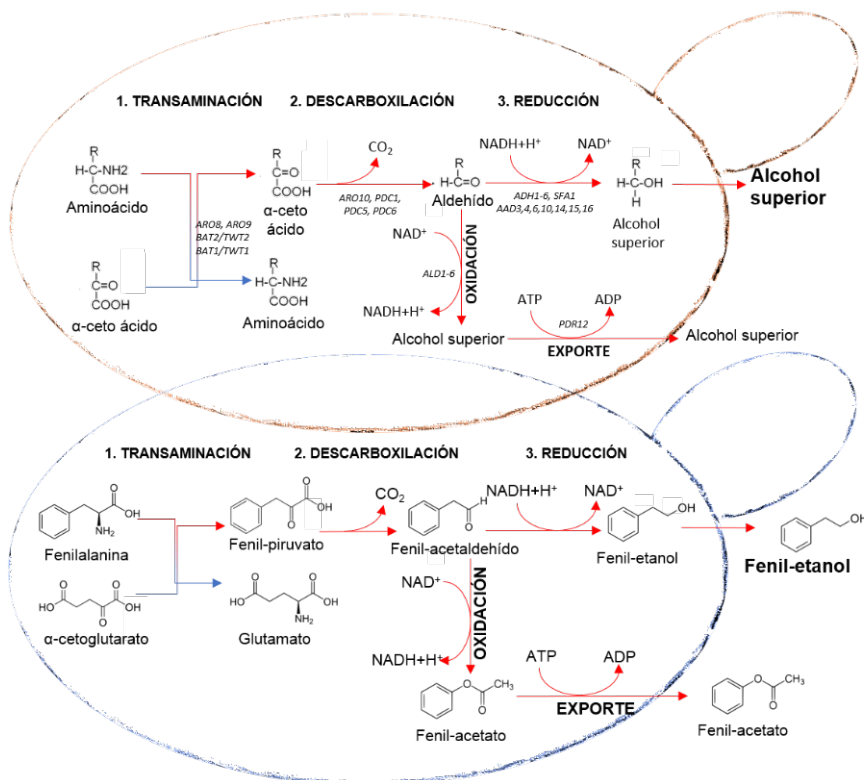


Figura 4: Esquema simplificado de la ruta Ehrlich en levaduras involucrada en la formación de alcoholes superiores a partir del catabolismo de aminoácidos. Los genes codificantes para las enzimas en cada paso están indicados. El catabolismo de la fenilalanina hasta la producción de compuesto feniletanol está representado a modo de ejemplo. Adaptada de Belda *et al.* (2017b).

En *S. cerevisiae* se han descrito varios mecanismos de regulación de esta ruta de producción de alcoholes superiores. Los mecanismos de NCR (a través de *URE2*) controlan el consumo de aminoácidos del mosto. Además, a través del regulador *Huwe1p*,

se controla la expresión de varias enzimas transaminasas (*ARO9*), decarboxilasas (*PDC1* y *PDC5*) y deshidrogenasas, que tienen un papel directo en la producción de alcoholes superiores.

Estos compuestos, entre los que destacan, entre otros, el propanol, el alcohol isoamílico, el isobutanol, el 2-fenil-etanol y tirosol, tienen un impacto positivo en el perfil aromático del vino, aunque por encima de 300 mg/L pueden aportar aromas negativos, o monopolizar en exceso el aroma del vino reduciendo así su complejidad (Ebeler, 2001). La concentración de alcoholes superiores en el vino está fuertemente condicionada por la cepa o la especie de levadura empleada como inóculo durante la fermentación. Dentro de las levaduras no-*Saccharomyces*, la acción de ciertas especies (como *L. thermotolerans* o *Hanseniaspora uvarum*) suele implicar un incremento en la concentración de estos alcoholes aunque otras producen bajas concentraciones de estos compuestos (como *Candida stellata*) tanto en fermentaciones individuales como en fermentaciones secuenciales o mixtas junto con *S. cerevisiae* (Jolly *et al.*, 2014). Para otras especies, como *T. delbrueckii*, se han observado tanto incrementos como reducciones en la concentración de alcoholes superiores, lo que demuestra que la producción de este tipo de compuestos puede ser dependiente de cepa (Comitini *et al.*, 2011; Belda *et al.*, 2015).

1.2.1.2.2 Ésteres

Los ésteres son compuestos aromáticos formados por la condensación de un fenol o un alcohol y el grupo carboxilo de un ácido orgánico. Aunque pueden tener distintos orígenes, los ésteres con mayor relevancia en el vino son los sintetizados por las levaduras durante la fermentación alcohólica. Las levaduras producen ésteres como sistema de detoxificación de alcoholes o ácidos, como un mecanismo de regeneración de la Coenzima A y como una forma de producir moléculas atrayentes de insectos, teniendo esto último, un papel importante en su diseminación (Lee *et al.*, 2004). Los ésteres, a pesar de su menor concentración, tienen un mayor impacto en el aroma del vino comparado con los alcoholes superiores, aportando aromas afrutados o florales. Sin embargo, concentraciones por encima de los 200 mg/L de ésteres pueden contribuir negativamente al aroma del vino, al enmascarar ciertos aromas varietales. Se pueden encontrar dos tipos principales de ésteres en el vino; etil ésteres de ácidos grasos y ésteres de acetato (Figura 5). Los etil ésteres se forman por la combinación del etanol (producto de la fermentación alcohólica) y ácidos grasos (u otros ácidos orgánicos no volátiles). Esos ésteres impactan de manera leve en el perfil aromático del vino, aportando aromas

INTRODUCCIÓN

relacionados con la cera o el jabón. Los ésteres de acetato derivan de la esterificación de un alcohol (que puede ser el etanol producto de la fermentación alcohólica o alcoholes superiores derivados de la degradación de aminoácidos) con un ácido. Este proceso es llevado a cabo por enzimas alcohol acetil transferasas (*ATF1* y *ATF2*, principalmente), que transfieren el grupo acilo del acetyl-CoA a un alcohol superior (Nagasawa *et al.*, 1998).

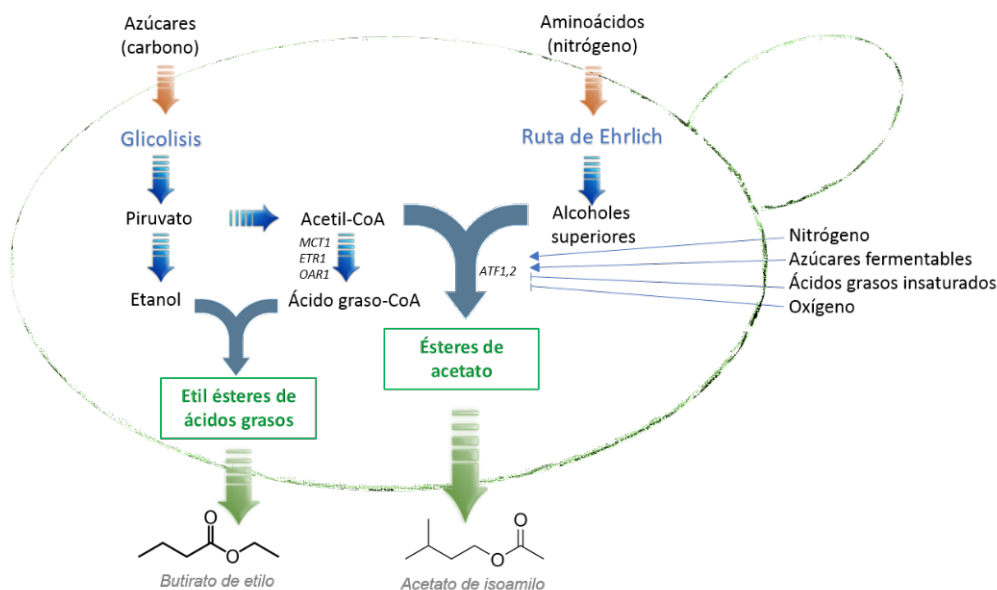


Figura 5: Esquema simplificado de la formación de ésteres en levaduras. Los genes codificantes para las enzimas involucradas, así como los factores que afectan a la regulación de la síntesis de ésteres, están representados. Adaptada de Belda *et al.* (2017b).

Entre estos ésteres destacan el acetato de isobutilo (aroma afrutado), acetato de isoamilo (aroma a plátano) y el 2-fenil acetato (aroma floral). Además de la capacidad de *S. cerevisiae* de producir este tipo de enzimas, otras especies no-*Saccharomyces* se han descrito como buenas herramientas para incrementar la concentración de ésteres en el vino. Entre ellas, destacan *H. guilliermondii*, *Hanseniaspora vineae* y *M. pulcherrima*, (Moreira *et al.*, 2005; Sadoudi *et al.*, 2012). La concentración final de ésteres en el vino también dependerá del balance entre la actividad de las enzimas de síntesis de ésteres y de las esterasas (Swiegers y Pretorius, 2006). La capacidad de producir esterasas extracelulares que degraden los ésteres se ha demostrado en *S. cerevisiae* (Iranzo *et al.*, 1998), aunque en el caso de levaduras no-*Saccharomyces*, se requieren más investigaciones para sacar conclusiones sobre su contribución al balance final de ésteres disponibles en el vino.

1.2.2 Búsqueda de diversidad de levaduras para mejorar las propiedades del vino

En la industria enológica, las cepas de *S. cerevisiae*, u otras especies no-*Saccharomyces*, utilizadas en las fermentaciones dirigidas han sido sometidas a extensos programas de selección buscando propiedades óptimas para llevar a cabo la fermentación alcohólica del vino y explotar al máximo su contribución al perfil sensorial del mismo. Así, estas estrategias de selección de nuevas cepas de levaduras se centran en la búsqueda de diversidad en viñedos, mostos y fermentaciones espontáneas, con la posterior caracterización fenotípica a nivel enológico.

Aunque en los últimos años ha crecido el interés en aprovechar el gran potencial enológico de las levaduras no-*Saccharomyces*, el hecho de que *S. cerevisiae* sea el principal actor en el proceso de elaboración del vino, y el profundo conocimiento que existe a sobre su genoma y metabolismo, ha supuesto que la mayoría de los esfuerzos de selección y caracterización enológico se hayan centrado en esta especie. Las cepas de *S. cerevisiae*, como consecuencia de la plasticidad de su genoma y de su complejidad metabólica, representan una enorme diversidad fenotípica (Liti *et al.*, 2009; Camarasa *et al.*, 2011; Warringer *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013). Los estudios fenotípicos, haciendo uso de las técnicas de cribado de alto rendimiento, permiten la identificación de esta gran diversidad de rasgos metabólicos entre las cepas de levaduras vínicas (Belda *et al.*, 2021). Dentro de las técnicas de HTS (Cribado de alto rendimiento - *High-throughput screening*), el análisis del crecimiento de cepas en microcultivos es una herramienta aceptable para determinar su *fitness* en una amplia gama de medios de cultivo y condiciones, explorando tanto la diversidad intra- como interespecífica (Warringer y Blomberg, 2014). Sin embargo, de esta forma no se cuantifican muchos parámetros de interés enológico, que pueden no estar relacionados con la tasa de crecimiento o la producción de biomasa. Recientemente, Peltier *et al.* (2018), describieron una nueva metodología para la cuantificación de características enológicas que permiten el fenotipado de cepas vínicas durante la fermentación alcohólica, a través del análisis de las cinéticas fermentativas y la producción de metabolitos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. El conocimiento sobre la diversidad fenotípica dentro de cepas de especies no-*Saccharomyces* es limitado comparado con *S. cerevisiae*. Sin embargo, ciertos estudios se han llevado a cabo para comprender la diversidad metabólica de estas levaduras, con el objetivo de definir su aplicación en la elaboración del vino. Belda *et al.* (2016a) realizaron un extenso estudio fenotípico basado en las actividades

INTRODUCCIÓN

enzimáticas de una colección de especies no-*Saccharomyces*, que permitió entender su potencial contribución al aroma del vino.

La combinación de estrategias fenómicas y genómicas ha permitido entender las bases genéticas de la diversidad metabólica encontrada entre las cepas de levaduras (Liti y Louis, 2012). Los análisis de loci que determinan un carácter cuantitativo (QTL, por sus siglas en inglés) permiten mapear el genoma de las levaduras para identificar las variables genéticas que son responsables de un determinado carácter. Varios estudios han desarrollado esta técnica para encontrar los patrones genéticos de ciertos rasgos específicos de interés enológico (Cubillos, 2016). A modo de ejemplo, el análisis de QTL en cepas vínicas ha permitido identificar a los genes *ARO1*, *PDCQ*, *CPS1*, *LYP1*, *ALP1* y *ASI2* como responsables de la variabilidad de las cepas de *S. cerevisiae* en el consumo de fuentes de nitrógeno durante la fermentación vínica (Cubillos *et al.*, 2017). De la misma forma, también se han identificado las variables genéticas de los genes *MET2* y *SKP2* que pueden determinar la producción de aromas azufrados no deseables durante la fermentación (Noble *et al.*, 2015).

1.2.2.1 Búsqueda de levaduras no-convencionales

Las estrategias genómicas y metagenómicas, basadas en las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) han permitido estudiar profundamente la diversidad de las comunidades microbianas asociadas al viñedo, la uva, y el vino (revisado por Belda *et al.*, 2021). Estas estrategias se pueden llevar a cabo con técnicas de amplificación por PCR seguida de secuenciación de genes marcadores específicos, como el gen de ARNr 16S para bacterias y el gen de ARNr D1/D2 26S o el gen ITS (*Internal Transcribed Spacer*) para hongos y levaduras, que permiten un estudio sobre la diversidad taxonómica de estas comunidades. Por otro lado, las técnicas de secuenciación *Shotgun* consisten en la obtención de millones de lecturas cortas que representan al azar los genomas de la comunidad microbiana. En este tipo de métodos, el estudio de la abundancia de los grupos microbianos menos representados requiere una profundidad de secuenciación muy elevada, con el correspondiente coste económico asociado. A pesar de ello, resultan útiles para conocer las capacidades funcionales de la comunidad.

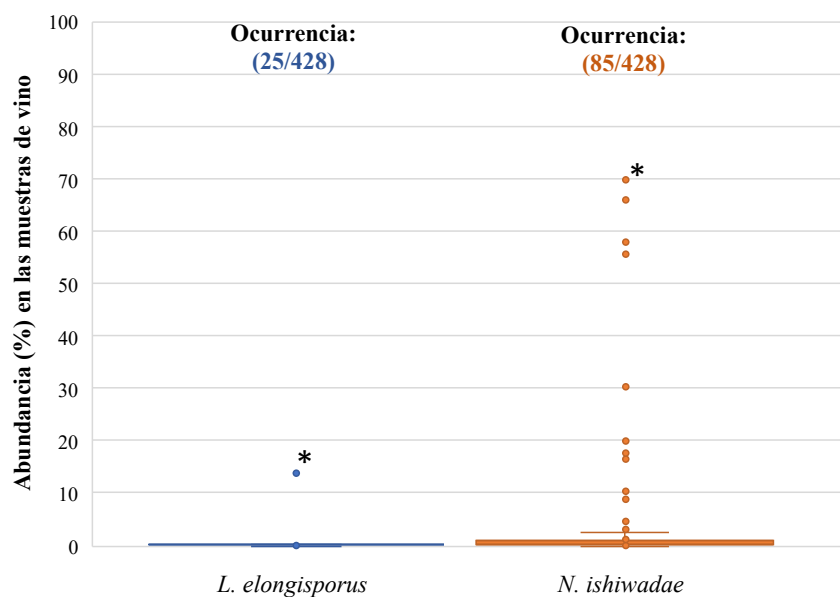


Figura 6: Abundancia relativa (%) de *L. elongisporus* y *N. ishiwadae* en la comunidad fúngica -evaluada por secuenciación masiva ITS- en 428 muestras de vino. La ocurrencia fue calculada con abundancias relativas > 0,01%. Los resultados fueron obtenidos de un análisis de 128 muestras de vino. Adaptada de Ruiz *et al.*, (2019a).

Las estrategias metagenómicas permiten además explorar una gran diversidad de nuevas especies de levaduras no convencionales en las prácticas enológicas, pero con un gran interés por su papel en la ecología dentro del ambiente vínico, tanto por su potencial aplicación en la mejora de las propiedades del vino, como por su papel en las alteraciones del mismo (producción de aromas negativos o efectos antagónicos con *S. cerevisiae*). A modo de ejemplo, un trabajo realizado en el marco de la investigación de esta Tesis Doctoral permitió la detección, y posterior aislamiento, de dos cepas de levadura pertenecientes a especies de levaduras no convencionales en muestras de vino: *Nakazawaea ishiwadae* y *Lodderomyces elongisporus* (Ruiz *et al.*, 2019a). A partir de un gran número de muestras de fermentaciones vínicas analizadas por secuenciación masiva del amplicón de la región *ITS1* eucariota, se pudo estudiar la incidencia promedio de estas dos especies en muestras vínicas, donde fueron detectadas en un número muy reducido de muestras, pero con unos niveles notables de abundancia relativa (Figura 6). Además, en este trabajo se caracterizaron las propiedades enológicas básicas de estas dos especies, y se estudió el impacto que tienen en la producción de metabolitos de los vinos en fermentaciones co-inoculadas con una cepa de *S. cerevisiae*. Así, se determinó que ambas especies mostraron relativamente una mayor resistencia al etanol y al sulfito, comparada con otros no-*Saccharomyces*. Además, ambas especies fueron capaces de afectar a la

INTRODUCCIÓN

composición química de los vinos co-inoculados con *S. cerevisiae*, incrementando el contenido en oligosacáridos y ciertos compuestos volátiles.

El reciente trabajo de Perpetuini *et al.* (2020) es otro ejemplo de la utilidad de conocer la diversidad de levaduras no convencionales asociadas al proceso de vinificación. En este estudio se identificaron y caracterizaron once cepas de *Pichia manshurica*, una especie de levadura alterante de las propiedades sensoriales del vino, por la producción de 4-etil fenol. Este compuesto, que aporta aromas descritos como sudor de caballo o cuero, es principalmente producido por la *B. bruxellensis*, por lo que las estrategias que tratan de minimizar su impacto negativo en el vino están principalmente dirigidas a la detección y control de esta levadura (Benito-Vázquez *et al.*, 2021), infravalorando el papel de otras especies de levadura. Así, la exploración y caracterización de levaduras no convencionales tiene también una gran importancia para encontrar el origen de ciertas alteraciones en el vino, cuya causa permanecía desconocida.

1.2.2.2 Estrategias basadas en ingeniería genética

Aunque menos habitual, la ingeniería genética también permite el desarrollo de cepas de levaduras con mejores propiedades para llevar a cabo la fermentación alcohólica y contribuir positivamente a la calidad final del vino (Ramón *et al.*, 2011). En los últimos años se han llevado a cabo interesantes estrategias para el desarrollo de cepas con óptimas propiedades enológicas, tanto desde un punto de vista tecnológico como sensorial. A modo de ejemplo, Lee *et al.* (2016) lograron por primera vez desarrollar una cepa vínica de *S. cerevisiae* capaz de producir cetona de frambuesa mediante la expresión heteróloga de la ruta completa de biosíntesis de este aroma. Más recientemente, van Wyk *et al.* (2020), haciendo uso de la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9, lograron sobreexpresar los genes *GDPI* (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) y *ATF1* (alcohol acetiltransferasa) de *S. cerevisiae*, mejorando la producción de glicerol y de éster de acetato en la fermentación vínica. Por último, el proyecto *Synthetic Yeast Genome* (Sc2.0) ha permitido la síntesis completa de los 16 cromosomas de *S. cerevisiae*, creando un microorganismo sintético, cruzando por primera vez la barrera *in silico* en un organismo eucariota. Este proyecto abre la posibilidad de creación de factorías celulares para la síntesis de compuestos altamente apreciados desde un punto de vista biotecnológico (Pretorius y Boeke 2018). Sin embargo, el uso de técnicas de ADN recombinante en la industria alimentaria exige cumplir una exigente normativa de seguridad. Además, el uso de organismos genéticamente modificados (OGM) en

alimentación aún sigue despertando rechazo en la mayoría de los consumidores, más aún en industrias con gran tradición como la del vino. Por ello, a pesar de estos interesantes y prometedores avances en el desarrollo de levaduras recombinantes con aplicación en el vino, el empleo de técnicas de ingeniería genética actualmente se restringe mayoritariamente a fines de investigación (Cebollero *et al.*, 2007).

1.3 Adaptación evolutiva de las levaduras vínicas

La capacidad de las levaduras vínicas de crecer y competir durante la fermentación vínica, principalmente *S. cerevisiae*, aunque también otras especies con capacidad fermentativa y cierta tolerancia al etanol como *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* y *Zygosaccharomyces* spp., es el resultado de un proceso de adaptación evolutiva a este tipo de ambientes (García-Ríos y Guillamón, 2019). El proceso evolutivo por el cual los organismos salvajes se adaptan a través de la selección natural o artificial a los ambientes antrópicos recibe el nombre de domesticación (Steensels *et al.*, 2019). Se ha estudiado la domesticación, tanto a nivel genómico como fenotípico, de plantas de cultivo, ganado y mascotas, como resultado de la actividad humana en la agricultura y la ganadería. Sin embargo, la domesticación no es exclusiva de plantas o animales. Una gran diversidad de microorganismos se ha adaptado eficientemente a multitud de ambientes antrópicos o industriales, como son los alimentos fermentados. La gran presión selectiva que supone este tipo de ambientes, junto con la plasticidad genómica de los microorganismos, han permitido una rápida adaptación evolutiva. El proceso de domesticación está determinando por la selección natural -dirigida por las condiciones estresantes impuestas durante los procesos industriales- y por la selección artificial, directa o indirectamente, de los caracteres de las cepas que definen la calidad de los alimentos. Así, durante este proceso, los microorganismos adquieren capacidades como la de consumir eficientemente algún tipo particular de nutriente, hacer frente a múltiples tipos de estrés asociados a los procesos industriales y, como consecuencia indirecta, son capaces de producir metabolitos que resultan de interés para la calidad final del alimento (Steensels *et al.*, 2019).

1.3.1 Origen de la capacidad fermentativa en las levaduras

Mucho antes de su proceso de domesticación, ciertos linajes de levaduras adquirieron la capacidad de realizar la fermentación alcohólica de azúcares. Entre estas levaduras se encuentra *S. cerevisiae*, cuyas cepas tienen la capacidad intrínseca de

INTRODUCCIÓN

fermentar azúcares, tanto en condiciones anaerobias como aerobias, produciendo etanol (por descarboxilación de ácido pirúvico) y CO₂ (van Dijken *et al.*, 1993). Por un lado, las altas concentraciones de glucosa del mosto llevan a la represión del metabolismo respiratorio, conocida como efecto Crabtree, y supone el desvío del metabolismo de las levaduras hacia la fermentación incluso en presencia de oxígeno (De Deken, 1966). Además, la fermentación de los azúcares es una gran ventaja a nivel competitivo, a pesar de su menor rendimiento energético respecto a la respiración. Esta ventaja de *S. cerevisiae* durante la fermentación, además de su mayor tolerancia al etanol (Stanley *et al.*, 2010), es consecuencia del desarrollo de la estrategia de “producir-acumular-consumir” etanol (Dashko *et al.* 2014), característica de las especies del género *Saccharomyces* y compartida evolutivamente por las especies del género *Dekkera/Brettanomyces*. Este mecanismo permite a estas levaduras consumir rápidamente los azúcares del mosto, producir etanol a través de fermentación alcohólica -que actúa como inhibidor del crecimiento de otras especies- y consumir como fuente de carbono parte del etanol generado cuando se ha producido el agotamiento de los azúcares. Antes del origen del linaje de cepas vnicas -relativamente temprano desde un punto de vista evolutivo- las cepas de *S. cerevisiae*, tanto salvajes como domesticadas, ya habían desarrollado un estilo de vida fermentativo. La adquisición de esta estrategia de “producir-acumular-consumir” ocurrió en varias etapas donde se produjeron distintos cambios genómicos de gran escala. Hace alrededor de 150 millones de años (MA) se produjo la pérdida del complejo respiratorio I que forma parte del transporte electrónico mitocondrial. Hace aproximadamente 100 MA se produjo la adquisición del gen *URA1* mediante un evento de Transferencia Horizontal de Genes (THG), aparentemente procedente de bacterias del orden *Lactobacillales*, requerido para la síntesis de uracilo en condiciones de anaerobiosis (Hall *et al.*, 2005). Además, alrededor de este tiempo, se produjo la Duplicación del Genoma Completo (WGD, por sus siglas en inglés) (Hagman *et al.*, 2013; Escalera-Fanjul *et al.*, 2019). La WGD de estas levaduras (pasando de 8 a 16 cromosomas) sucedió después de la divergencia de los linajes de *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces*. Como consecuencia, se produjo la duplicación, entre otros muchos genes, de genes relacionados desde el consumo de hexosas hasta la producción de etanol. Se duplicó también la enzima alcohol deshidrogenasa (*ADH1* y *ADH2*) adquiriendo la capacidad de metabolizar el etanol (Kellis *et al.*, 2004). La WGD también llevó a un reajuste genómico que supuso la pérdida masiva de elementos regulatorios involucrados en el metabolismo respiratorio (Ihmels *et al.*, 2005). Estas modificaciones genómicas, que condujeron al desarrollo de la

estrategia de “producir-acumular-consumir”, representan la importante adaptación que permitió la explotación del nuevo nicho ecológico de las plantas modernas con fruta, que constituían nichos muy ricos en azúcares fermentables, que aparecieron en los ambientes terrestres en el Cretácico, hace aproximadamente 125 MA (Piskur *et al.*, 2006).

1.3.2 Proceso de domesticación en *S. cerevisiae*

S. cerevisiae debido a su gran ubicuidad en todo tipo de ambientes salvajes y antrópicos, y al profundo conocimiento que existe, a nivel fisiológico y genómico, es un excelente ejemplo de microorganismo domesticado. La levadura no domesticada *Saccharomyces paradoxus* ha sido descrita como la especie más cercana filogenéticamente a *S. cerevisiae* (Peter *et al.*, 2018). A partir de ese momento, las distintas cepas de *S. cerevisiae* han ido adaptándose a una gran variedad de ambientes, originando distintos linajes filogenéticos. Recientemente, en estudios de genómica poblacional se ha llevado a cabo la secuenciación del genoma completo de miles de cepas de levaduras, incluyendo aislamientos de diferentes matrices y orígenes geográficos, permitiendo construir árboles filogenéticos que ayudan a comprender con mayor profundidad la historia evolutiva de esta especie, definiendo los distintos clados o linajes (Liti *et al.*, 2009; Gallone *et al.*, 2016; Legras *et al.*, 2018; Peter *et al.*, 2018; Pontes *et al.*, 2020). Estos linajes no solo están asociados a la distribución geográfica de las cepas, sino que también se han creado a través de eventos de domesticación independientes favorecidos por los ambientes antrópicos en los que se desarrollan. Así, se pueden encontrar linajes salvajes (*Taiwan, China, Philippines, Malaysia, North America, Japan and Mediterranean Oak*) y linajes domesticados (*Sake, African Beverages, Beer, Bread/Mixed, Dairy, Bioethanol, Wine*). Como se observa en la Figura 7, los linajes salvajes y los linajes domesticados se pueden agrupar en dos grupos más o menos definidos. La divergencia entre los linajes domesticados y los salvajes probablemente ocurrió en Asia y se estima que sucedió hace alrededor de 12.000 años (Almeida *et al.*, 2015; Steensels *et al.*, 2019).

1.3.3 Origen evolutivo de las cepas vínicas de *S. cerevisiae*

Aunque todas las cepas de *S. cerevisiae* de los distintos linajes se han desarrollado a partir del ancestro evolutivo que adquirió la ya mencionada estrategia de “producir-acumular-consumir”, las cepas vínicas se han originado a partir de un evento de domesticación concreto e independiente del resto de cepas domesticadas de *S. cerevisiae*.

INTRODUCCIÓN

Las primeras evidencias de la presencia de *S. cerevisiae* en fermentaciones vínicas datan de hace más de 3.000 años (Cavaliere *et al.*, 2003), aunque ya hay evidencias de bebidas fermentadas de hace más de 9.000 años (McGovern *et al.*, 2004).

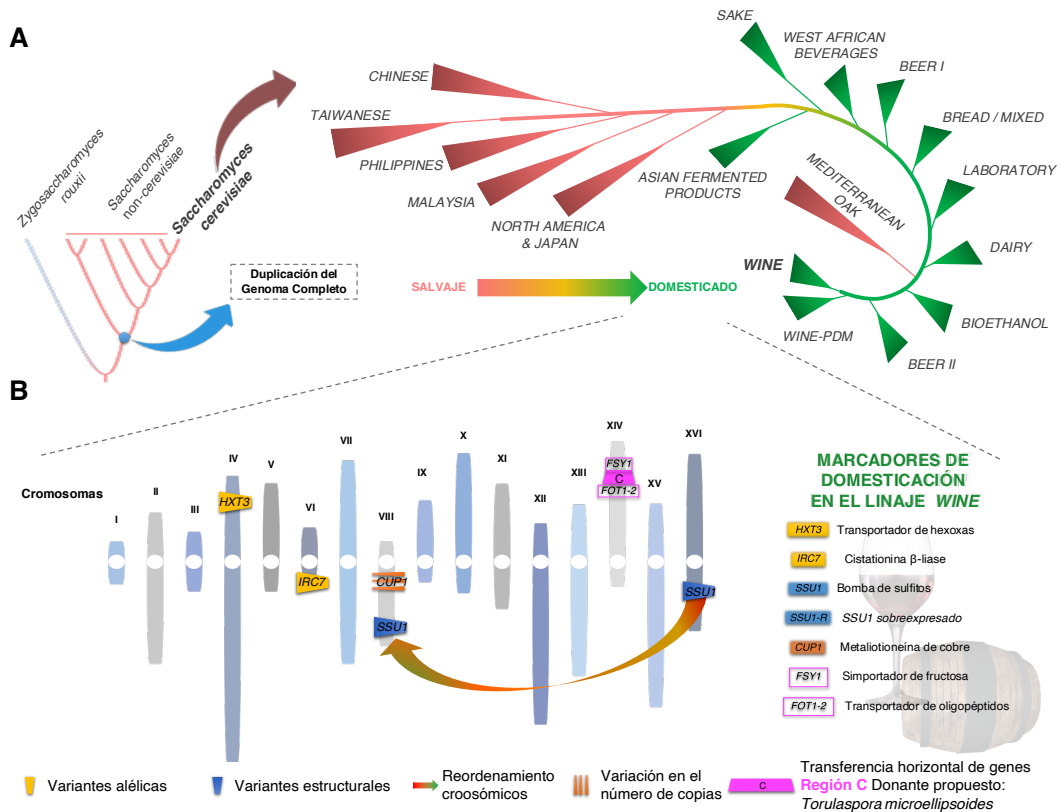


Figura 7: **A)** Esquema de la historia evolutiva de *S. cerevisiae*, representando el origen y los distintos linajes filogenéticos de esta especie. **B)** Representación esquemática de distintos marcadores de domesticación en el genoma de cepas vínicas de *S. cerevisiae*, que presentan una implicación fenotípica que permitió a estas cepas adaptarse y sobrevivir al ambiente vínico. Adaptada de Belda *et al.*, (2019).

Esta rápida adaptación de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* es consecuencia de las severas condiciones fisicoquímicas que el mosto de uva y la fermentación vínica que imponen a las levaduras, junto con la gran presión competitiva entre las especies y cepas de levaduras que se da al principio de cada fermentación. Además, la búsqueda de las cepas más aptas para el proceso de vinificación, y el uso iterativo de la biomasa procedente de fermentaciones exitosas para la inoculación de nuevos procesos fermentativos, supone una gran presión artificial que ha podido acelerar este proceso selectivo y de adaptación. Las cepas vínicas se han diversificado desde poblaciones no vínicas de cepas de *S. cerevisiae* a través de diversos mecanismos genómicos. A pesar de estos cambios genómicos, el linaje vínico -comparado con otros linajes filogenéticos de *S. cerevisiae*- presenta una baja diversidad nucleotídica, una baja frecuencia de

polimorfismos y una baja heterocigosidad entre las cepas (Warringer *et al.*, 2011; Peter *et al.*, 2018). Esto permite suponer que las cepas de la población vínica divergieron a partir de una población pequeña de cepas con poca diversidad genética entre ellas (evento de cuello de botella), en un único evento de domesticación (Legras *et al.*, 2007). El origen de este evento parece haber ocurrido en la antigua Mesopotamia (Sicard y Legras, 2011). A partir de este momento, las levaduras vínicas -indígenas de las vides- pudieron migrar a través de dos rutas asociadas a la expansión global de la viticultura. Por un lado, a través del Mar Mediterráneo hacia Italia, Francia y España y, por otro lado, a través del valle del Danubio. En este contexto, el linaje filogenético de Roble Mediterráneo se ha propuesto como la población no domesticada de la que divergieron las cepas vínicas (Almeida *et al.*, 2015).

1.3.4 Adaptación de las levaduras al ambiente vínico

Las adaptaciones fenotípicas de las cepas vínicas que les permiten hacer frente a los distintos factores de estrés del vino (García-Ríos y Guillamón, 2019) son consecuencia de la acumulación de una serie de cambios genómicos, conocidos como marcadores de domesticación (Figura 7), que se encuentran ausentes en las cepas no vínicas. Estas modificaciones pueden ir desde cambios a nivel de la secuencia nucleotídica (polimorfismos de un solo nucleótido, inserciones, deleciones o sustituciones) hasta cambios de mayor escala en el genoma (duplicaciones de cromosomas, translocaciones, aneuploidías o variación en el número de copia de los genes) (Marsit y Dequin, 2015). Además de estas singularidades genómicas, las cepas vínicas también presentan mecanismos transcripcionales que les permiten desarrollar estrategias de respuesta específica para cada uno de los estreses del vino.

El bajo pH del mosto ha llevado a las levaduras vínicas a desarrollar mecanismos transcripcionales para hacer frente a este estrés. De esta manera, se observa en estas cepas vínicas el aumento de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, el plegamiento de proteínas y funciones de la pared celular (Mira *et al.*, 2010). Las levaduras también se adaptan a las fermentaciones a baja temperatura con una respuesta fisiológica a gran escala (Aguilera *et al.*, 2007; García-Ríos *et al.*, 2014). Bajo estas condiciones, las levaduras aumentan la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (López-Malo *et al.*, 2014), y de glicerol (Aguilera *et al.*, 2007). Tronchoni *et al.* (2014) demostraron una respuesta inducida por frío de un gran número de genes en *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*. Entre estos genes destacaron los mecanismos de cambios de estructura

INTRODUCCIÓN

del ARN, evitando su hiper-estabilidad, o genes como *NSRI*, requerido para el procesamiento de precursores de ARN, o *HPS12*, involucrado en el plegamiento de proteínas, considerados todos ellos como marcadores de frío.

La alta exposición a conservantes en el vino ha llevado a las cepas vínicas a desarrollar mecanismos específicos de adaptación. Solo ciertas especies de levaduras (como *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* o *S. pombe*) son capaces de hacer frente eficientemente a las altas concentraciones de sulfitos del vino, mediante mecanismos como la reducción del sulfito, la producción de acetaldehído o su extrusión (Divol *et al.*, 2012). También se han encontrado marcadores genómicos de domesticación en el genoma de cepas vínicas altamente resistentes a sulfito. En este tipo de cepas se ha identificado una traslocación de un fragmento cromosómico entre los cromosomas XVI y VIII. Este evento genómico supuso la duplicación de la bomba de externalización de sulfito (*SSU1*). El alelo duplicado, al integrarse en el cromosoma VIII adquirió un promotor sobreexpresado, aumentando la expresión de la bomba de sulfito en este tipo de cepas (Goto-Yamamoto *et al.*, 1998; Nardi *et al.*, 2010). Gracias a ello, las cepas portadoras de este marcador de adaptación son capaces de crecer acortando la fase de latencia en el mosto de uva, maximizando sus posibilidades de dominar una comunidad microbiana (Zimmer *et al.*, 2014). Respecto a la resistencia a compuestos de cobre (empleado como fitosanitario en el viñedo), se ha observado una mayor tolerancia en las cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Warringer *et al.*, 2011) asociada a una mayor dosis génica del gen *CUPI* (metalotioneína de unión a cobre) (Fay *et al.*, 2004).

Las cepas vínicas también muestran marcadores de adaptación frente al estrés osmótico durante la fermentación. La alta concentración de azúcares es rápidamente percibida por la ruta de señalización MAPK-HOG (Gasch, 2003). Entre ellos, destaca el gen *GPD1*, que codifica para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, involucrada en la síntesis de glicerol, que actúa como osmoprotector (Pérez-Torrado *et al.*, 2002). La pérdida de la función de genes codificantes de acuaporinas (*AQY1* y *AQY2*) -canales de la membrana plasmática que permiten el intercambio de agua- también se ha establecido como un marcador de domesticación en cepas que se desarrollan en ambientes con altas concentraciones de azúcares, como el mosto de uva, ya que minimiza la pérdida de agua como consecuencia de la alta osmolaridad (Will *et al.*, 2010).

También se han identificado los mecanismos implicados en la tolerancia al etanol en las cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Lewis *et al.*, 2014; Voordeckers *et al.*, 2015). Entre

ellos, destaca la expresión de factores relacionados con la estabilización de proteínas y enzimas superóxido dismutasas (Teixeira *et al.*, 2009), y el incremento de la estabilidad de la membrana plasmática, debida al aumento de los niveles de ácidos grasos insaturados y ergosterol (Navarro-Tapia *et al.*, 2016).

Las adaptaciones de las levaduras a las concentraciones limitantes de nitrógeno en el vino merecen especial mención. El mosto de uva contiene una compleja mezcla de fuentes de nitrógeno, y no todas ellas permiten alcanzar la misma tasa de crecimiento y producción de biomasa en las levaduras (Gutiérrez *et al.*, 2013). Por ello, las fuentes de nitrógeno en el mosto pueden clasificarse en preferenciales (amonio, asparagina o glutamina) y no preferenciales (alantoína, urea o prolina) para las levaduras (Gutiérrez *et al.*, 2013; Cubillos *et al.*, 2017; Gobert *et al.*, 2019). Las levaduras, a través de los mecanismos NCR, pueden percibir los compuestos de nitrógeno disponibles en el mosto y consumirlos selectivamente (Crépin *et al.*, 2012). Así, ante fuentes preferenciales de nitrógeno, se reprime la expresión de genes involucrados en el consumo de fuentes más pobres de nitrógeno. En ausencia de fuentes preferenciales de nitrógeno, estos genes se desreprimen, y las fuentes de nitrógeno alternativas son consumidas (Magasanik y Kaiser, 2002). En *S. cerevisiae* se han estudiado ampliamente los mecanismos transcripcionales de la regulación por NCR (revisados por Zaman *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2018). La expresión de los genes sensibles a NCR está regulada por un complejo de rutas transcripcionales que involucran un conjunto de factores de transcripción. Estos factores de transcripción, conocidos como los factores GATA debido a que se unen a secuencias 5'-GATATA-3' localizadas aguas arriba del promotor de estos genes sensibles a NCR, son Gln3p, Gat1p (activadores de la expresión de los genes sensibles a NCR) Dal80p y Gzf3p (represores de la expresión de dichos genes). La activación de estos factores GATA se encuentra regulada por el gen *URE2* (Cunningham *et al.*, 1996). Cuando en el mosto está disponible una fuente preferencial de nitrógeno (como el amonio) Ure2p se expresa -a través de la ruta de respuesta a nutrientes TOR- y secuestra a los factores Gln3p y Gat1p en el citoplasma, y los factores Dal80p y Gzf3p están bloqueando la transcripción de los genes sensibles a NCR (involucrados en la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno). Cuando en el mosto la fuente preferencial de nitrógeno se ha agotado, Ure2p deja de expresarse, de forma que los factores Gln3p y Gat1p pueden entrar en el núcleo y activar la expresión de los genes sensibles a NCR, que permiten la utilización del resto de fuentes de nitrógeno no preferenciales del mosto (Salmon y Barre, 1998).

INTRODUCCIÓN

Las cepas de flor representan un interesante ejemplo de especialización dentro de la población de cepas vónicas (Legras, 2016). Estas cepas están involucradas en la fase de crianza biológica de los vinos de Jerez, formando una biopelícula (velo de flor) en la superficie de los vinos después de la fermentación alcohólica. En este proceso se establecen unas condiciones que son especialmente adversas para las levaduras (más de 15% de etanol, alta concentración de acetaldehído, estrés oxidativo y agotamiento de nutrientes esencial y glucosa) junto con el desarrollo de un metabolismo oxidativo. La adaptación a estas condiciones ha supuesto la acumulación de una serie de cambios a nivel genómico que implican la divergencia respecto al resto de cepas vónicas, estableciendo un linaje filogenético diferente al vónico: el linaje *Wine-PDM* (Legras *et al.*, 2014; Eldarov *et al.*, 2018). En primer lugar, la adquisición de mutaciones en el promotor y en la región codificante del gen *FLO11*, codificante para una glicoproteína de superficie celular, permite aumentar la expresión de este gen, incrementando la capacidad de adhesión entre las células que forman la biopelícula (Fidalgo *et al.*, 2006). Además, se ha identificado variantes genéticas en *HXT3* -codificante para un transportador de fructosa- que aumentan la capacidad de estas levaduras de fermentar los azúcares residuales al final de la fermentación (Coi *et al.*, 2017).

La adaptación al ambiente vónico también ha sido resultado de la adquisición de elementos genómicos desde otras especies de levadura, como consecuencia de eventos de THG. En el genoma de cepas vónicas de *S. cerevisiae* se han identificado introgresiones procedentes de las especies cercanas *S. paradoxus* y *S. mikatae* (Dunn *et al.*, 2012), conteniendo genes relacionados con el consumo de sacarosa (*SUC2*) o la actividad glucosidasa (*HPFI*) -cuya expresión resulta interesante para reducir los problemas de estabilidad proteica de algunos vinos blancos (Brown *et al.*, 2007). Otro estudio de genómica comparativa en levaduras vónicas reveló otro evento de HGT que favoreció la adaptación de estas levaduras al ambiente vónico. Analizando el genoma de la cepa vónica de *S. cerevisiae* EC1118 se identificaron tres grandes regiones cromosómicas adquiridas por tres eventos de HGT independientes, siendo *Z. bailli* y *T. microellipsoide* las especies donadoras propuestas (Novo *et al.*, 2009; Marsit *et al.*, 2015). Estas regiones contienen genes que contribuyen de forma importante a la adaptación de las cepas de *S. cerevisiae* a la fermentación vónica (transportadores de fructosa (*FSYI*) (Galeote *et al.*, 2010), transportadores de oligopéptidos (*FOT1*, *FOT2*) -que suponen una gran ventaja competitiva al aumentar la diversidad de fuentes nitrogenadas que las levaduras pueden

usar durante la fermentación (Marsit *et al.*, 2015)- y genes que participan en el metabolismo de la xilosa (*XDHI*) (Wenger *et al.*, 2010), entre otros).

1.4 Contribución de la Tesis Doctoral

A modo de conclusión, el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ha permitido explorar la capacidad de las levaduras para mejorar las características del vino, en concreto de sus propiedades sensoriales, bajo el contexto evolutivo y ecológico de las levaduras. Así, se ha realizado un estudio fenotípico y genómico sobre la distribución de alelos de uno de los genes más importantes de la producción de aromas tiólicos del vino (*IRC7*) en las poblaciones de cepas de *S. cerevisiae* (Ruiz *et al.*, 2020b). Además, se ha analizado el papel de levaduras no-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii* y *M. pulcherrima*) en la mejora del perfil sensorial del vino a través de la producción de tioles aromáticos, y su impacto en la producción de otros metabolitos de interés enológico (Belda *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2018). Por último, para entender cómo la inoculación de levaduras no-*Saccharomyces* en el vino y, por tanto, las interacciones intraespecíficas que ocurren durante la fermentación alcohólica, afectan a *S. cerevisiae* y a su impacto en las propiedades del vino, se ha estudiado el efecto combinado de la co-inoculación de *T. delbrueckii* y la nutrición nitrogenada en *S. cerevisiae*, tanto a nivel fenotípico como transcripcional (Ruiz *et al.*, 2020a).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El objetivo general de la investigación realizada en esta Tesis Doctoral fue contribuir al conocimiento disponible sobre el papel de *Saccharomyces cerevisiae* en la liberación de aromas tiólicos en el vino y explorar herramientas biológicas complementarias, basadas en el uso de levaduras no-*Saccharomyces*, para incrementar la producción de dichos aromas. Los distintos capítulos que conforman esta Tesis exploran aspectos tanto fundamentales como aplicados de dicha temática y surgen de premisas basadas en la utilidad de las levaduras vínicas como modelo de estudio en ecología evolutiva y el uso del vino como ecosistema modelo para el estudio de interacciones intra e interespecíficas, sin perder de vista la aplicación de los conocimientos generados a la realidad de la industria enológica.

Para ello, se definieron los siguientes objetivos parciales:

1. Definir la distribución global de alelos *IRC7* (*IRC7^S* e *IRC7^F*) -codificante para una enzima cistationina- β -liasa y principal enzima responsable de la liberación de tioles en el vino- entre los distintos linajes evolutivos de *S. cerevisiae*.
2. Estudiar el papel del alelo *IRC7* delecionado (*IRC7^S*)-codificante de una enzima menos funcional para la liberación de tioles- en el *fitness* y la habilidad competitiva de cepas vínicas de *S. cerevisiae*.
3. Identificar las variantes alélicas de otros genes asociadas a nivel genómico al alelo *IRC7^S* y estudiar su contribución a la gran prevalencia de este alelo entre las cepas vínicas de *S. cerevisiae*.
4. Estudiar la contribución de levaduras no-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima*) en co-fermentación con *S. cerevisiae* a la producción de tioles aromáticos y su percepción sensorial en vino blanco.
5. Definir el impacto de la co-inoculación de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en la matriz química del vino bajo diferentes condiciones de nutrición nitrogenada.
6. Estudiar la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* a la alta concentración de amonio en condiciones de inoculación individual y de co-inoculación con *T. delbrueckii*.

OBJETIVOS

3 CAPÍTULO 1:

**Estudio de la distribución de alelos de *IRC7* en
*Saccharomyces cerevisiae***

3.1 Planteamiento

En el trabajo presentado en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral se ha determinado la existencia de nuevas singularidades genéticas y fenotípicas dentro del linaje de cepas vínicas de *S. cerevisiae* que ayudan a explicar la paradójica distribución poblacional previamente descrita para las dos variantes alélicas del gen *IRC7*. Como se ha mencionado, este gen codifica una cistationina- β -liasa implicada en la liberación de tioles varietales durante la fermentación del vino. Se han descrito dos alelos para este gen, un alelo íntegro (*IRC7^F*) y un alelo portador de una delección de 38 pb (*IRC7^S*) que codifica una enzima menos funcional. Así, las cepas de *S. cerevisiae* se pueden clasificar en base a su genotipo *IRC7* en: HF (homocigotas para el alelo *IRC7^F*), HT (heterocigotas para *IRC7*) y HS (homocigotas para el alelo *IRC7^S*). Sorprendentemente, la gran mayoría de cepas vínicas de *S. cerevisiae* son portadoras en homocigosis del alelo *IRC7^S*-codificante para una enzima con menos actividad β -liasa- y, por tanto, presentan una menor capacidad de revelación de tioles aromáticos. Para entender la gran prevalencia de las cepas HS en las poblaciones vínicas, en este trabajo se llevó a cabo i) un genotipado del gen *IRC7* en una amplia colección de genomas de *S. cerevisiae* representando distintos linajes y sustratos de aislamiento, ii) un fenotipado a gran escala para determinar diferentes patrones de crecimiento y metabólicos entre las cepas en base a su genotipo *IRC7*, iii) un estudio genómico en busca de variantes de secuencia asociadas al alelo *IRC7^S* con el objetivo de encontrar genes potencialmente relacionados con el fenotipo asociado al genotipo *IRC7* y, por tanto, con su alta prevalencia en el ambiente vínico.

3.2 Material y métodos

3.2.1 Cepas de y genomas de levaduras

En este estudio se empleó una colección de 30 cepas de *S. cerevisiae* (listadas en la Tabla I-anexo capítulo 1), 10 representantes por cada uno de los 3 genotipos *IRC7* (HS, HT y HF), que incluye cepas comerciales y no comerciales, todas de origen vínico. Se empleó el medio *Sabouraud* (Oxoid, Reino Unido) para el mantenimiento y manejo rutinario de las cepas. Además, se usó una extensa colección de 283 genomas de *S. cerevisiae* (listadas en la Tabla II-anexo capítulo 1) incluyendo genomas representativos de diferentes orígenes de aislamiento (hábitats) y linajes filogenéticos (domesticados y salvajes). Dentro de esta colección se establecieron dos sub-colecciones de genomas para el análisis filogenético y el análisis de búsqueda de variantes de secuencia (*Variant Calling*) dentro de los linajes domesticados (indicadas en la Tabla II-anexo capítulo 1).

3.2.2 Genotipado del gen *IRC7*

En el marco del primer capítulo de esta Tesis Doctoral se realizó un genotipado del gen *IRC7* (para identificar los alelos *IRC7^F*/*IRC7^S*) empleando la información genómica de 283 cepas de *S. cerevisiae* (Tabla II-anexo capítulo 1). Para ello, se empleó el software BLAST, usando búsquedas BLASTn (corte de $1e^{-4}$ en el valor de *E*). Cada genoma se estableció como base de datos local de BLAST, y se utilizó la secuencia del alelo *IRC7^F* de la cepa de *S. cerevisiae* VL3 (número de acceso *GeneBank*: EGA87043.1) como secuencia problema (*query*). Las cepas con el alelo *IRC7^F* mostraron un porcentaje de identidad $\geq 99,9\%$, mientras que las cepas con alelo *IRC7^S* mostraron un porcentaje de identidad de 98,5%. Esta diferencia en el porcentaje de identidad corresponde con el fragmento de 38-pb delecionado en el alelo *IRC7^S*. Las cepas empleadas en este genotipado, clasificadas en función de su linaje filogenético y su genotipo *IRC7*, están listadas en la Tabla II -anexo capítulo 1.

3.2.3 Estudio fenotípico de cepas de *S. cerevisiae* con diferente genotipo *IRC7*

3.2.3.1 Fenotipado de alto rendimiento de cepas de *S. cerevisiae*

Con el objetivo de encontrar patrones asociados a cada genotipo *IRC7*, se llevó a cabo un fenotipado de la capacidad de crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* representativas de los tres genotipos *IRC7*. Treinta cepas (diez pertenecientes a cada

grupo genotípico de *IRC7*) fueron sometidas a un extenso análisis fenotípico, bajo 48 condiciones de crecimiento diferentes.

Las células fueron precultivadas durante 48 h en 300 μ L de medio sintético definido (SD) descrito por Warringer y Blomberg (2003), con las siguientes modificaciones: 2% de glucosa; 0,14% *Yeast Nitrogen Base* (YNB, BD Difco™, EE.UU.); 0,5% sulfato amónico; 2,27% ácido succínico (sal disódica) y 0,077% *Complete Supplement Mixture* (CSM, MP Biomedicals™, R.U.), pH ajustado a 5,8. Después, las cepas fueron inoculadas, en ensayos por triplicado, a una concentración final de 0,2 unidades de D.O._{600 nm} en 300 μ L de medio SD en placas transparentes de 96 pocillos. Las 48 condiciones de crecimiento estudiadas están listadas en la Tabla III -anexo capítulo 1. La fuente de carbono indica que el 2% de glucosa del medio base fue sustituida por la concentración correspondiente de la fuente de carbono especificada. De la misma manera, la fuente de nitrógeno indica que el 0,5% de sulfato amónico fue sustituido por la concentración correspondiente de la fuente de nitrógeno especificada. En los ensayos de determinación de la capacidad de crecimiento, las cepas fueron cultivadas durante 60h y la D.O._{600 nm} fue medida cada 4h usando un lector de microplacas (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, EE.UU.). Los datos crudos de las lecturas de densidad óptica fueron procesados de la siguiente manera: se restó el dato de D.O._{600 nm} del medio control no inoculado a cada dato crudo observado. Después, se corrigió la no linealidad de los cultivos de alta densidad usando la ecuación (Warringer y Blomberg (2003): $D.O. \text{ correg} = 0,2453 (D.O. \text{ obs})^3 + 0,2735 (D.O. \text{ obs})^2 + 0,9779 (D.O. \text{ obs}) - 0,0577$). Finalmente, los datos erróneos fueron eliminados para permitir el cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento y las curvas de crecimiento fueron ajustadas a un modelo de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994). La capacidad de crecimiento de cada cepa en cada medio de cultivo fue analizada mediante la extracción de los parámetros de crecimiento (fase de latencia (tiempo necesario para iniciar la fase de crecimiento exponencial), tasa de crecimiento (medida durante la fase de crecimiento exponencial) y eficiencia (incremento total alcanzado en la densidad celular)) usando el paquete *GrowthRates* en el entorno R (Hall *et al.*, 2014). El cálculo automatizado de la fase de latencia no fue posible en todas las curvas de crecimiento (datos en blanco en la Figura 9) debido al escaso crecimiento en ciertos medios y la influencia de este en el perfil de la cinética de la curva de crecimiento. Esos datos ausentes no fueron incluidos en los análisis estadísticos ni en las representaciones gráficas.

3.2.3.2 Ensayos de micro-vinificaciones

Las treinta cepas vínicas de *S. cerevisiae*, representantes de cada genotipo *IRC7*, fueron cultivadas en ensayos de micro-vinificaciones. En primer lugar, las cepas fueron precultivadas en frascos de 15 mL con 10 mL de medio durante 48h en medio YNB-G (0,17% de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (BD Difco™, EE.UU.) y 2% de glucosa; pH 3,5), a 28°C con 120 rpm de agitación orbital. Después, las cepas fueron inoculadas a una concentración final de 10⁶ células/mL en Mosto Sintético de Uva, descrito por Henschke y Jiranek (1993) suplementado con 300 mg/L de metabisulfito sódico y ajustado a pH 3,5. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado en botellas de 30 mL con 25 mL de medio, a 25 °C con 120 rpm de agitación orbital. Los cultivos fueron pesados diariamente para determinar el fin de la fermentación (caída de peso inferior a 0,01 g/día durante dos días consecutivos). Una vez que la fermentación terminó, se centrifugó los cultivos a 7.000 rpm durante 10 min para eliminar la biomasa residual. Después, los sobrenadantes se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis. Para la detección y cuantificación de los metabolitos básicos de los vinos se empleó el método espectroscópico de infrarrojo cercano, utilizando el instrumento monocromático *Foss NIR Systems 6500 SY-I* (Silver Spring, MD, EE.UU.). Este método se empleó para analizar los siguientes parámetros: etanol, azúcares residuales (glucosa y fructosa), densidad, pH, ácido málico, ácido láctico, acidez volátil y acidez total.

3.2.3.3 Ensayos de competición entre cepas

Además de la caracterización de parámetros de crecimiento asociados a la capacidad de crecimiento de las cepas estudiadas, se realizaron ensayos de competición por parejas, donde cepas con distinto genotipo homocigoto para *IRC7*, fueron inoculadas, a la misma concentración, en cultivos mixtos. Así, se emplearon 4 cepas HF (HF_1, HF_2, HF_8 y HF_9) y tres cepas HS (HS_4, HS_6 y HS_9) para los ensayos. Estos experimentos fueron llevados a cabo utilizando tres medios de cultivo diferentes. Para ello se utilizó Medio Sintético de Uva (Henschke y Jiranek, 1993) suplementado con 300 mg/L de metabisulfito sódico para simular la fermentación vínica, Mosto de Cerveza (13,2 % de extracto de malta; pH 5,2) para simular la fermentación para obtener cerveza y medio no fermentativo (6% de glicerol; 0,017% de YNB sin aminoácidos ni sulfato amónico (BD Difco™, EEUU); 0,077 %; *Complete Supplement Mixture* (CSM) (MP Biomedicals™, Reino Unido) y 0,5% sulfato amónico). Los cultivos mixtos se llevaron a cabo, por triplicado, en botellas de 40 mL con 30 mL del medio correspondiente, e incubados a 25

°C con 120 rpm de agitación orbital. Previamente, las cepas fueron pre-cultivadas durante 48h en el medio YNB-G, e inoculadas a una concentración de $1 \cdot 10^6$ células/mL en una proporción 1:1 (HF:HS), alcanzando una concentración final total de $2 \cdot 10^6$ células/mL en el medio de cultivo a ensayar. La cinética fermentativa fue monitorizada calculando la caída de peso diaria en las fermentaciones. Una vez alcanzado el final de la fermentación (determinado por el momento en que la caída de peso fue inferior a 0,01 g en 24h), se tomó una muestra y se sembraron 50 μ l de una dilución adecuada en placas de *Sabouraud* para obtener colonias tras 48h de crecimiento a 28 °C. Se seleccionaron al azar diez colonias de cada ensayo para cada réplica para, posteriormente, determinar la implantación de cada una de las dos cepas mediante su posterior tipado mediante la determinación por PCR de los polimorfismos de la región interdelta (Querol *et al.* 1992; Legras y Karst, 2003). Así, se calculó el porcentaje de implantación de las cepas HF y HS (prevalencia final de cada cepa) y la tasa de éxito (número de competiciones ganadas - con una implantación mayor del 50%- entre el número total de competiciones) al final del cultivo en cada condición de competición estudiada.

3.2.3.4 Ensayos de actividad *killer*

La actividad *killer* y la sensibilidad *killer* de las treinta cepas de estudio (representantes de los tres genotipos *IRC7*) fueron medidas siguiendo el método descrito por Santos *et al.*, (2009). La actividad *killer* de las cepas se determinó en ensayos de antibiograma realizados en el medio YMA-MB (glucosa 1%; extracto de levadura 0,3%, extracto de malta 0,3%, proteosa peptona 0,5%, azul de metileno 0,03 %, cloruro sódico 3 % y agar 2%). Suspensiones celulares ($5 \cdot 10^5$ células/mL) de todas las cepas ensayadas como sensibles se sembraron en forma de césped sobre el medio YMA-MB y, a continuación, la biomasa de las cepas ensayadas como *killer*, obtenida a partir de precultivos en placa, se inoculó con asa de siembra de forma puntual sobre la superficie del mismo. Las placas se incubaron durante una semana a 20° C. La actividad y la sensibilidad *killer* se determinaron mediante la medida del halo de inhibición del crecimiento generado alrededor de cada depósito de biomasa. La actividad *killer* se estimó mediante el cálculo del diámetro total del halo de inhibición dividido entre el diámetro del depósito de biomasa concentrada.

3.2.3.5 Ensayo de determinación del estrés oxidativo

Para comparar los niveles de estrés oxidativo en condiciones de fermentación en las cepas de levadura pertenecientes a los grupos genotípicos HF y HS, se midieron los

CAPÍTULO 1 – Material y Métodos

niveles de especies reactivas de oxígeno acumulados en las células. Las cepas fueron pre-cultivadas e inoculadas en el medio SGM, siguiendo el procedimiento descrito en la sección del fenotipado de cepas de *S. cerevisiae* (sección 3.2.3.1). Tras 24h de crecimiento, los cultivos se trataron con menadiona 1 mM durante 90 min. Tras ello, se añadió el fluorocromo dihidrorodamina 123 (Sigma-Aldrich, EE.UU.) a una concentración final de 7,5 µg/mL, y los cultivos se incubaron con agitación orbital en oscuridad, a 28 °C durante 90 min. Después, los cultivos se centrifugaron, descartando el sobrenadante, y las células fueron lavadas y resuspendidas en tampón fosfato salino. Por último, el nivel de estrés oxidativo fue estimado mediante la cuantificación de la emisión de fluorescencia verde (540 nm), usando una longitud de onda de excitación a 485 nm en un lector de microplacas *Varioskan Flash Multimode Reader* (Thermo Scientific, EE. UU.).

3.2.3.6 Test de pseudofilamentación

Para el estudio de la capacidad de pseudofilamentación, las cepas fueron pre-cultivadas en medio mínimo (YNB sin aminoácidos ni amonio 0,17%, glucosa 2% y sulfato de amonio 10 mM) a 28 °C durante 16h. Después, se obtuvo una suspensión celular de los pre-cultivos y se sembraron 100 µL de una dilución adecuada en el medio sólido SLAD (*Synthetic Low-Ammonium-Dextrose*) (YNB sin aminoácidos ni amonio 0,17%, glucosa 2% y sulfato de amonio 50 µM). Las placas fueron cultivadas a 28 °C y se observaron las colonias con el microscopio óptico (10X) para determinar el tipo de crecimiento, a los 5 días y a los 30 días de cultivo.

3.2.4 Secuenciación del genoma completo de cepas de *S. cerevisiae*

El genoma completo de 10 de las cepas de *S. cerevisiae* caracterizadas a nivel fenotípico, y representativas de los 3 genotipos *IRC7*, fue secuenciado. El ADN genómico total se extrajo usando el kit comercial *ZR Fungal/Bacterial.DNA Miniprep* (Zymo Research®, EE.UU.). La preparación de la librería se llevó a cabo por fragmentación enzimática usando el kit comercial *Nextera DNA Library Prep* (Illumina, EE.UU.). Las librerías generadas para cada cepa fueron secuenciadas usando la tecnología Illumina *NEXTseq 2000*, empleando el kit comercial *Illumina NextSeq 500/550 v2.5*. La cobertura de secuenciación fue 50X y se obtuvieron secuencias con las siguientes estadísticas: número total de lecturas de 6.876.948 a 11.022.748; número total de bases

secuenciadas de 1.018.248.534 a 1.637.804.639; y una longitud media de cada lectura de 148 bases (longitud mínima de 35 bases y longitud máxima de 151 bases).

3.2.5 Construcción del árbol filogenético de cepas de *S. cerevisiae*

Para el análisis filogenético se seleccionó una sub-colección de 128 genomas (incluidos en la Tabla II-anexo capítulo 1), representando todos los distintos linajes filogenéticos de *S. cerevisiae*. Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) fueron extraídos de los alineamientos de secuencia con una confianza en los residuos de todas las cepas $\geq 85\%$. Los SNPs fueron concatenados para generar un alineamiento de SNPs de todo el genoma. La filogenia fue inferida usando un análisis de máxima verosimilitud utilizando el software I1-TREE v 1.6.7 (Nguyen *et al.*, 2015) usando la aproximación *ultrafast bootstrap* (UFBoot) de 1000 réplicas (Minh *et al.*, 2013). La filogenia se visualizó usando el software ITOL, v 3.0 (Letunic y Bork, 2016).

3.2.6 Identificación de variantes de secuencia asociadas al alelo *IRC7^S*

Para el análisis de búsqueda de variantes de secuencia se utilizaron los 9 genomas secuenciados de las cepas de este estudio (indicados en la Tabla I-anexo capítulo 1), representando distintos linajes domesticados de *S. cerevisiae*. Las secuencias de los genomas fueron filtradas utilizando el programa Trimm-o-matic v 0.38 (Bolger *et al.*, 2014) con los parámetros *Sliding window* 15, calidad mínima Q20 y longitud mínima de 140. Las secuencias filtradas fueron alineadas con el programa BWA (0.7.15-r1140) (Li y Durbin, 2010) frente al genoma de *S. cerevisiae* referencia VL3 (número de acceso a GenBank: GCA_000190235.1_ScVL3_v01). El proceso de búsqueda de variantes (*Variant Calling*) fue llevado a cabo con el programa GATK4 v 4.0.4.0 (McKenna *et al.*, 2010). Este proceso incluye: realineamiento de las inserciones/deleciones (INDEL), eliminación de las regiones duplicadas y descubrimiento de los SNPs y los INDEL. Los parámetros fueron establecidos según las recomendaciones de GATK. Las anotaciones funcionales de los SNP y los INDEL se llevaron a cabo con el programa *SnpEFF4.3t* (Cingolani *et al.*, 2012). Los resultados del análisis *Variant Calling* fueron visualizados usando los programas de R (R Development Core Team, 2013) *vcfR* (Knaus y Grunwald, 2017) y *tidyverse* (Wickham *et al.*, 2019). Las variantes alélicas identificadas para cada cepa se emplearon para construir una red bipartita, combinando los cromosomas de cada cepa e identificando la posición de la variante. La red resultante se visualizó usando el programa Gephi versión 0.9.2 (Bastian *et al.*, 2009). Solo se han tenido en cuenta para

CAPÍTULO 1 – Material y Métodos

posteriores análisis las variantes de secuencia identificadas como “moderadas” y “alta importancia”, mediante el programa SnpEFF4.3t. Este programa identifica los diferentes efectos de las variantes de secuencia detectadas, que se clasifican en cuatro clases (alto, moderado, bajo y modificador) por su impacto funcional putativo. A partir de este análisis preliminar, se seleccionaron para el posterior análisis con aquellas mutaciones presentes en todas las cepas HS y ausentes en todas las HF.

3.2.7 Identificación de variantes alélicas asociadas a *IRC7^S* en distintos linajes de *S. cerevisiae*

Con el objetivo de estudiar la distribución de las mutaciones previamente identificadas, con altas tasas de co-ocurrencia con el alelo *IRC7^S*, en las distintas poblaciones domesticadas de *S. cerevisiae*, se realizó una búsqueda dirigida de dichas variantes de secuencia en una sub-colección de genomas (incluidas en la Tabla II-anexo capítulo 1) publicados por Gallone *et al.* (2016) (incluyendo genomas de *S. cerevisiae* de seis poblaciones filogenéticas diferentes pertenecientes a linajes domesticados: *Wine*, *Wine-PDM*, *Beer1*, *Beer2*, *Sake* y *Bread*). Para comparar y combinar los resultados, las secuencias *fastq* originales fueron descargadas de la base de datos ENA. Todas las muestras fueron procesadas de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección anterior (sección 3.2.6). Los genomas fueron procesadas usando el programa *tidyverse* de R. El mapa de mutaciones presentado en la Figura 14 fue realizado usando el programa *phatmap* de R. Las tasas de co-ocurrencias con la variante alélica *IRC7^S* para cada mutación fueron obtenidas a partir de los resultados de distribución de las mutaciones en la sub-colección de genomas. La tasa de co-ocurrencia entre variantes de secuencia fue calculada siguiendo el método probabilístico descrito por Veech *et al.* (2013).

3.2.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa *stats* de R (v 3.6.3). Los análisis de varianza (ANOVA) y se aplicaron los test *post-hoc* de *Tukey* para comparar las medias de los diferentes ensayos. Los Análisis de Componentes Principales (PCA) se aplicaron para la ordenación de las muestras en base a los parámetros básicos de fermentación de los ensayos de micro-vinificaciones.

3.3 Resultados

3.3.1 Distribución de alelos de *IRC7* en las poblaciones de cepas de *S. cerevisiae*

La Figura 8 muestra la distribución filogenética de una colección de 283 genomas de *S. cerevisiae* (Tabla II-anexo capítulo 1), destacando la separación de los linajes domesticados y salvajes en dos grupos bien definidos, con las excepciones de Roble Mediterráneo y Sake.

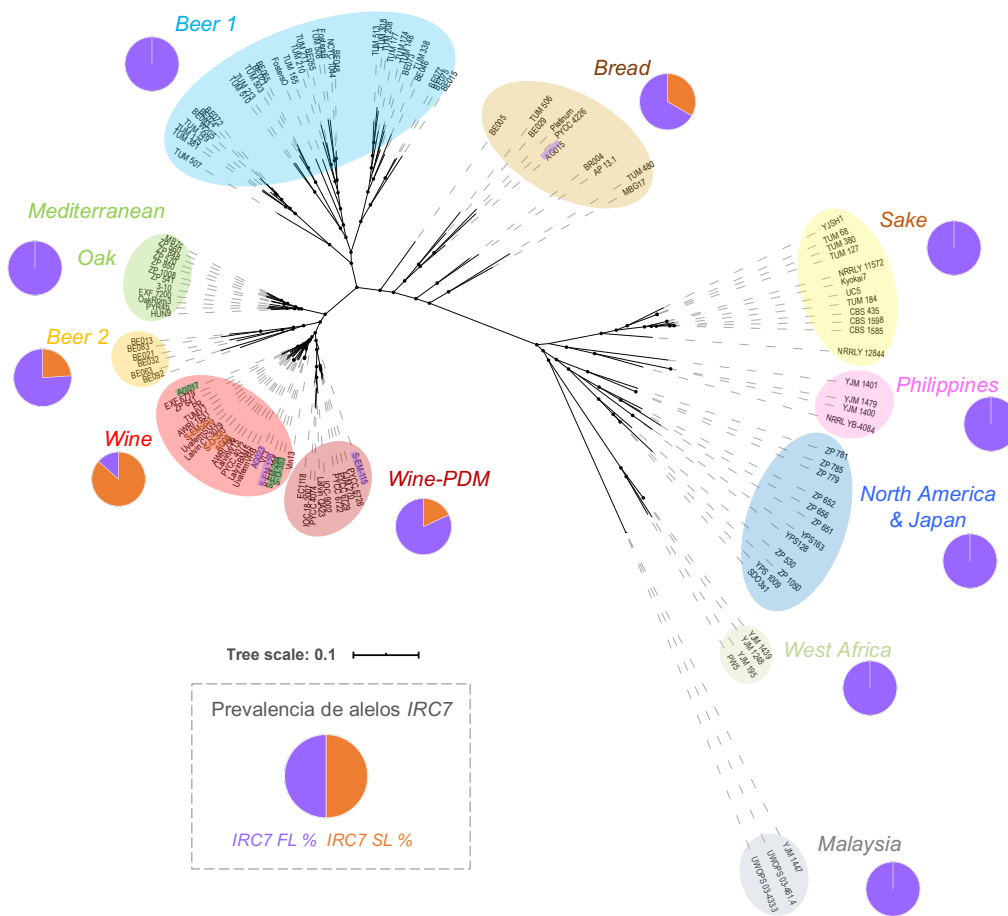


Figura 8: Árbol filogenético de máxima verosimilitud realizado a partir de los polimorfismos de nucleótido único (SNPs), extraídos de los alineamientos de los genomas de las cepas de *S. cerevisiae* con el genoma de referencia S288C. Las 128 cepas incluidas en el análisis están listadas en la tabla II-anexo capítulo 1. Las cepas estudiadas en este trabajo están representadas en árbol según su genotipo *IRC7*; HS (naranja), HT (verde) y HF (morado): HS_4 (S-EM-25), HS_6 (S-O-320), HS_9 (AG08), HT_3 (S-EM-294), HT_6 (S-O-353), HT_10 (AG017), HF_1 (S-EM-115), HF_2 (S-EM-129), HF_8 (AG015), HF_9 (AG023). Se representa también el porcentaje de prevalencia de alelos de *IRC7* (naranja para el alelo *IRC7*^S y morado para el alelo *IRC7*^F) en cada linaje filogenético.

CAPÍTULO 1 – Resultados

Así como los linajes salvajes representan diferentes orígenes geográficos (Roble Mediterráneo- *Mediterranean Oak*; Norte América y Japón- *North America & Japan*; África Occidental- *West Africa*; Filipinas- *Philippines*; Malasia- *Malaysia*), los linajes domesticados se definen en base a su hábitat de origen antrópico (Vino- *Wine* y *Wine-PDM*; Cerveza- *Beer 1* y *Beer 2*; Pan- *Bread*; Sake-*Sake*) (Belda *et al.*, 2021). Asimismo, se muestra la prevalencia de los alelos de *IRC7* (*IRC7^S* / *IRC7^F*) en los diferentes linajes filogenéticos, calculada tras el genotipado de *IRC7* de una colección más amplia de 283 genomas de *S. cerevisiae* (Tabla II -anexo capítulo 1), representando los diferentes linajes filogenéticos identificados en el árbol de la Figura 8. Así, se confirmó que el alelo *IRC7^S*, se encuentra ampliamente distribuido en el linaje vínico *Wine* (85% de las cepas). Sin embargo, otros linajes domesticados como *Wine-PDM* (“*Prise de Mousse*”, una familia de cepas principalmente representada por cepas aisladas de la segunda fermentación de vinos espumosos), *Beer 2* y *Bread* mostraron una prevalencia minoritaria del alelo *IRC7^S* (27,3%, 35,0% y 37,5% respectivamente). Finalmente, los genomas de las cepas pertenecientes a los otros linajes domesticados (*Beer 1* y *Sake*) y a todos los linajes salvajes solo presentan el alelo *IRC7^F* que, por tanto, podríamos considerar como alelo salvaje o *wild type*.

3.3.2 Caracterización fenotípica de cepas de *S. cerevisiae* representativas de los distintos genotipos *IRC7*

Para arrojar luz sobre las posibles bases biológicas que expliquen la alta prevalencia del alelo *IRC7^S* -codificante para una enzima *Irc7p* menos funcional- dentro del linaje *Wine*, se llevó a cabo un fenotipado a gran escala para buscar patrones de crecimiento en los distintos genotipos *IRC7*. Treinta cepas de *S. cerevisiae*, (10 representantes de cada uno de los tres genotipos definidos para *IRC7* (HF, HT y HS)) (Tabla I -anexo capítulo 1), fueron cultivadas en 48 condiciones diferentes (incluyendo diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, condiciones fisicoquímicas y presencia de antimicrobianos) (Tabla III -anexo capítulo 1). Las curvas de crecimiento obtenidas para cada cepa y condición ensayada fueron analizadas para obtener los parámetros de crecimiento: fase de latencia, tasa de crecimiento exponencial y eficiencia.

La Figura 9 representa los valores promedio (normalizados con la media de cada condición) de cada parámetro de crecimiento obtenido en todas las condiciones ensayadas para cada grupo de cepas representante de cada genotipo *IRC7*.

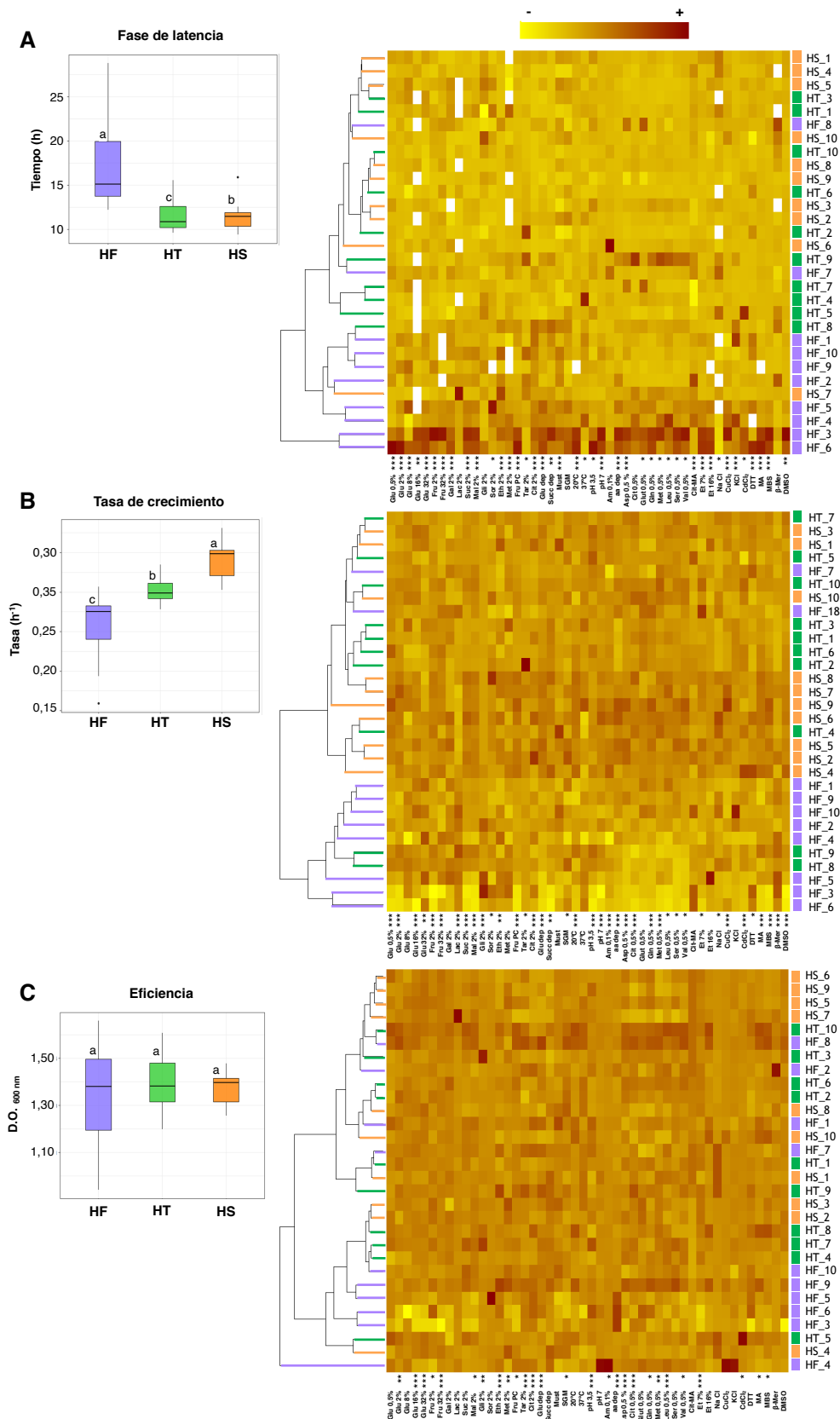


Figura 9: Capacidad de crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* en base a su genotipo *IRC7*. Los paneles de la izquierda representan los valores medios de la duración de la fase de latencia (A), la tasa de crecimiento (B) y la eficiencia (C) (considerando los valores medios normalizados para todas las condiciones) de los diferentes grupos de cepas, establecidos de acuerdo su genotipo *IRC7*. Las letras diferentes (a, b, c) indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Asimismo,

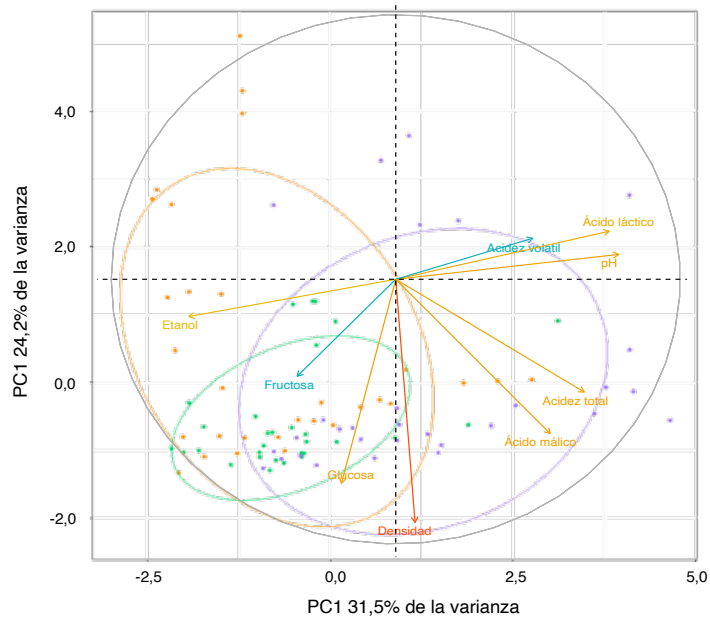
CAPÍTULO 1 – Resultados

en la derecha se muestran los valores de los parámetros de crecimiento en cada cepa y condición. Las cepas están agrupadas jerárquicamente según su comportamiento fenotípico en todas las condiciones. Las diferencias estadísticas de los parámetros de crecimiento entre los grupos de cepas en base a su genotipo *IRC7* se analizaron mediante un ANOVA y test de *Tukey post-hoc* para cada condición (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$). Los datos ausentes están indicados por cuadrados en blanco.

A pesar de la variabilidad entre las cepas para los distintos parámetros de crecimiento analizados (especialmente acusada en la duración de la fase de latencia), las cepas HF presentaron, en promedio, datos indicativos de una menor capacidad de crecimiento con fases de latencia más largas y menores tasas de crecimiento en la mayoría de las condiciones ensayadas ($p < 0,05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la eficiencia, medida como la producción de biomasa final, entre los tres grupos genotípicos de *IRC7*. La Figura 9 representa los datos de cada parámetro de crecimiento en todas las condiciones ensayadas para las 30 cepas. Así, se puede observar como las cepas se agrupan según patrones de crecimiento asociados al genotipo *IRC7* (Figura 9), donde las cepas HS mostraron un mejor *fitness* general.

Complementando los estudios fenotípicos de los parámetros de crecimiento de las cepas en estudio, se llevaron a cabo micro-vinificaciones usando mosto sintético de uva para evaluar posibles patrones en la producción de metabolitos de interés enológico en el vino asociados a los distintos genotipos *IRC7* de las cepas. La Figura 10A muestra que el perfil global de metabolitos producidos por las cepas HS y HF permite definir, a pesar de la notable variabilidad en el conjunto de las cepas (Figura 10B), grupos significativamente diferentes en un análisis de ordenación, observándose diferencias significativas en base a las distancias de los grupos HS y HF (PERMANOVA, $p < 0,01$), y los grupos HT y HF ($p < 0,05$), mientras que no se observaron diferencias significativas entre los grupos de cepas HS y HT. Ya que la Componente Principal 1, que explica el 30,8% de la varianza observada, aparece como el principal componente que diferencia los grupos de metabolitos en HS y HF, se puede establecer que el mayor contenido en etanol y el menor pH en los vinos resultantes de las fermentaciones llevadas a cabo por cepas HS (Figura 10B) son los principales determinantes de este agrupamiento asociado al genotipo *IRC7* que, cabe destacar, se establece de acuerdo a un perfil general de metabolitos derivados de rutas metabólicas en las que *IRC7* no está directamente involucrada.

A



B

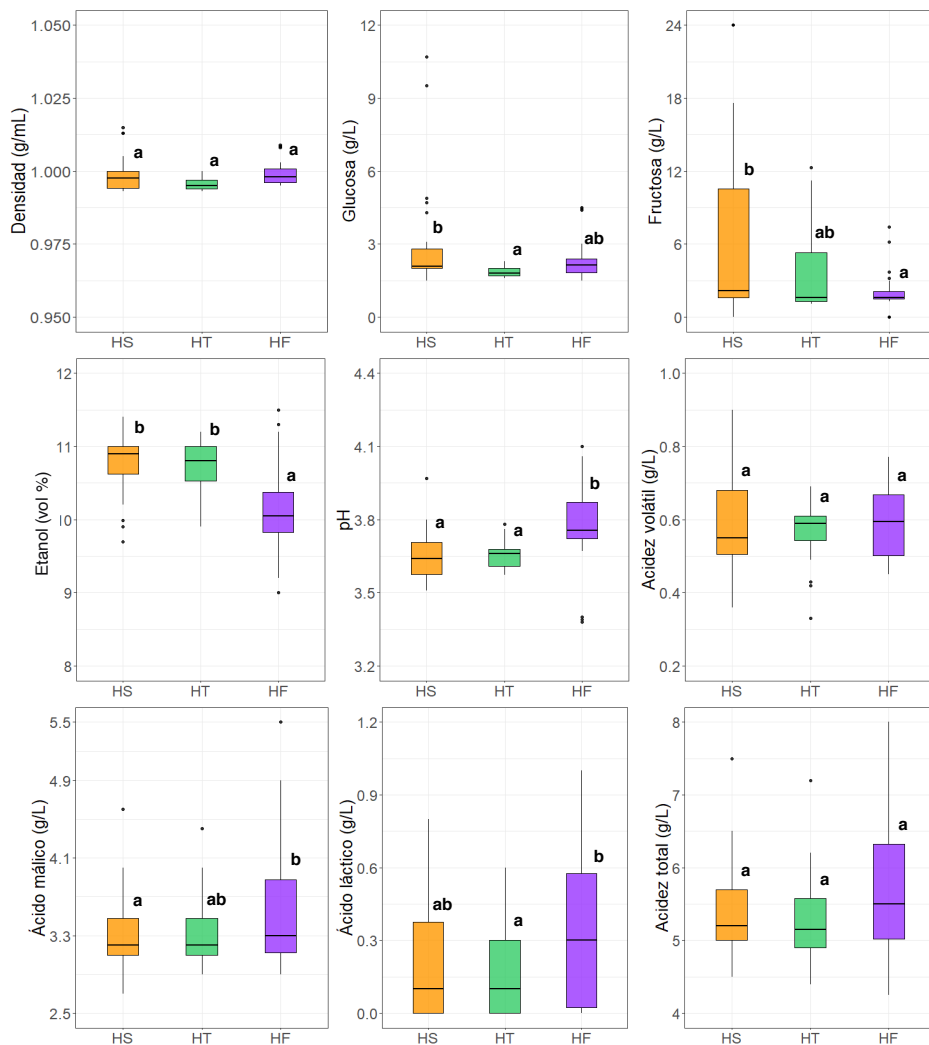


Figura 10: A) Representación mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA) de los parámetros enológicos en los vinos resultantes de las fermentaciones con las cepas HS (naranja), HT (verde) y HF (morado). La contribución de cada parámetro a la ordenación final de datos esta también

representado mediante la longitud de los vectores. Las elipses representan la desviación estándar desde el centroide de cada grupo de cepas (agrupadas por su genotipo *IRC7*). Se realizó una comparación por pares (PERMANOVA) de la matriz de distancias euclidianas usadas para representar el PCA. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos HS-HF ($p = 0,003$) y HT-HF ($p=0,024$), pero no entre los grupos HS-HT ($p=0,171$). **B**) Concentración y valores analíticos de los parámetros fisicoquímicos analizados en los vinos resultantes de las fermentaciones con las cepas HS (naranja), HT (verde) y HF (morado). Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos genotípicos para cada parámetro.

3.3.3 Capacidad competitiva de las cepas de *S. cerevisiae* según sus genotipos *IRC7*

Para evaluar la potencial ventaja de las cepas HS para dominar las fermentaciones vínicas como consecuencia de su mayor *fitness*, se llevaron a cabo competiciones entre cepas de distinto genotipo *IRC7* (HF vs HS), bajo condiciones fermentativas (mosto de vino y cerveza) y no fermentativas (medio con glicerol como única fuente de carbono). Se seleccionaron siete cepas representando los grupos genotípicos HS (HS4, HS6 y HS9) y HF (HF1, HF2, HF8 y HF9), donde cada cepa HS fue co-inoculada con cada cepa HF, ambas a la misma concentración celular. La Figura 11 confirma una capacidad competitiva superior para las cepas HS con independencia del ambiente de crecimiento, con valores promedio de porcentajes de implantación del 65%, 82% y 75% y tasas de éxito del 67%, 100% y 83% para las cepas HS, en mosto de vino, mosto de cerveza, o medio no fermentativo, respectivamente.

Con el objetivo de encontrar evidencias adicionales que ayuden a explicar la ventaja competitiva de las cepas HS, se evaluó el fenotipo *killer* de las cepas estudiadas en este trabajo, buscando patrones de actividad *killer* o resistencia a dichas toxinas entre los grupos genotípicos HS, HT y HF. La Figura 12 muestra los resultados de inhibición del crecimiento en los ensayos cruzados de antibiosis, representando los fenotipos de actividad *killer* y de sensibilidad/resistencia de las cepas ensayadas. Como se observa, el fenotipo *killer* presenta un patrón asociado con el genotipo *IRC7* de las cepas, puesto que todas las cepas HS fueron resistentes frente a todas las cepas ensayadas como potenciales productoras de toxinas *killer*. Contrariamente, 7 de las 10 cepas HT y solo 2 de las 10 cepas HF fueron resistentes frente a las cepas ensayadas. Además, se observó producción de toxinas *killer* (actividad frente al menos frente a una de las cepas ensayadas) en 9/10 cepas HS, 7/10 cepas HT y solo 4/10 cepas HF. Adicionalmente, también se pudo observar que las cepas HS y HT no solo son cepas predominantemente productoras de factor *killer*, sino que además presentan un amplio espectro de cepas sensibles, mientras solo 2 de las 10 cepas HF presentaron un factor *killer* con amplio espectro de actividad.

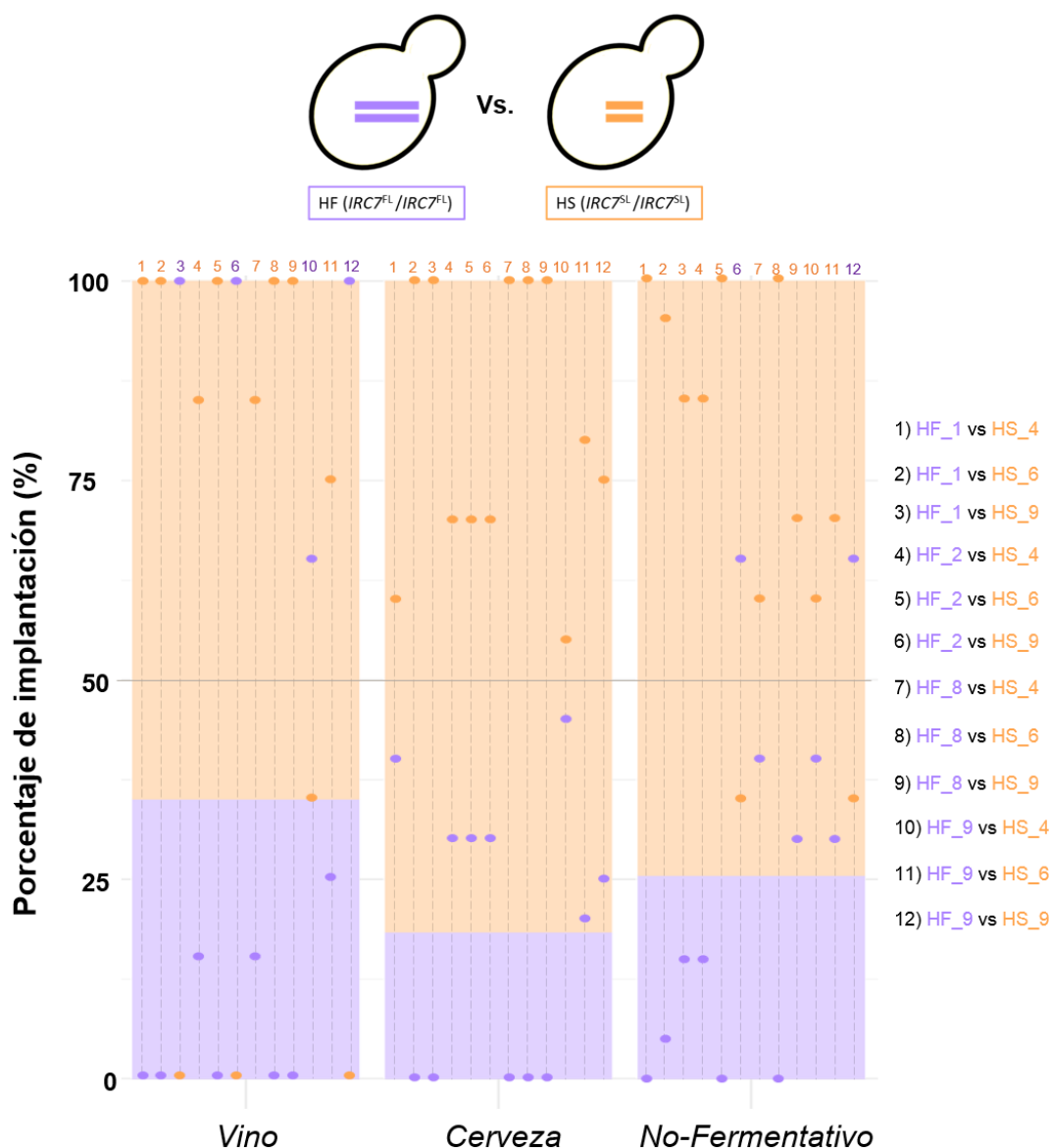


Figura 11: Ensayos de competición de 3 cepas HS (HS4, HS6, HS9) frente a 4 cepas HF (HF1, HF2, HF8, HF9) en condiciones de mosto de vino, mosto de cerveza y medio no fermentativo. Se realizaron 12 combinaciones HS vs. HF (proporción 1:1) en las tres condiciones. Se representan los porcentajes de implantación a los 7 días del cultivo. Los gráficos de barras indican el porcentaje de implantación medio de los grupos de cepas HS (naranja) y HF (morado), y los puntos sobre los gráficos indican el porcentaje de implantación de las cepas en cada ensayo de competición.

En este momento, conviene aclarar que, hasta donde se conoce, la enzima *Irc7p* no está directa o indirectamente relacionada con la producción de toxinas *killer* o la resistencia frente a ellas. Por tanto, este resultado, junto con el *fitness* ventajoso y el patrón de producción de metabolitos en fermentaciones vínicas observado en las cepas HS, que va más allá de la actividad cistationina- β -liasa de *Irc7p*, lleva a hipotetizar que otras variantes alélicas adicionales, afectando a genes y a rutas y actividades metabólicas distintas, pueden estar co-ocurriendo con el alelo *IRC7^S* en un número significativo de

CAPÍTULO 1 – Resultados

casos, y podrían explicar en conjunto los patrones fenotípicos de las cepas HS y su alta prevalencia en las poblaciones de cepas vínicas.

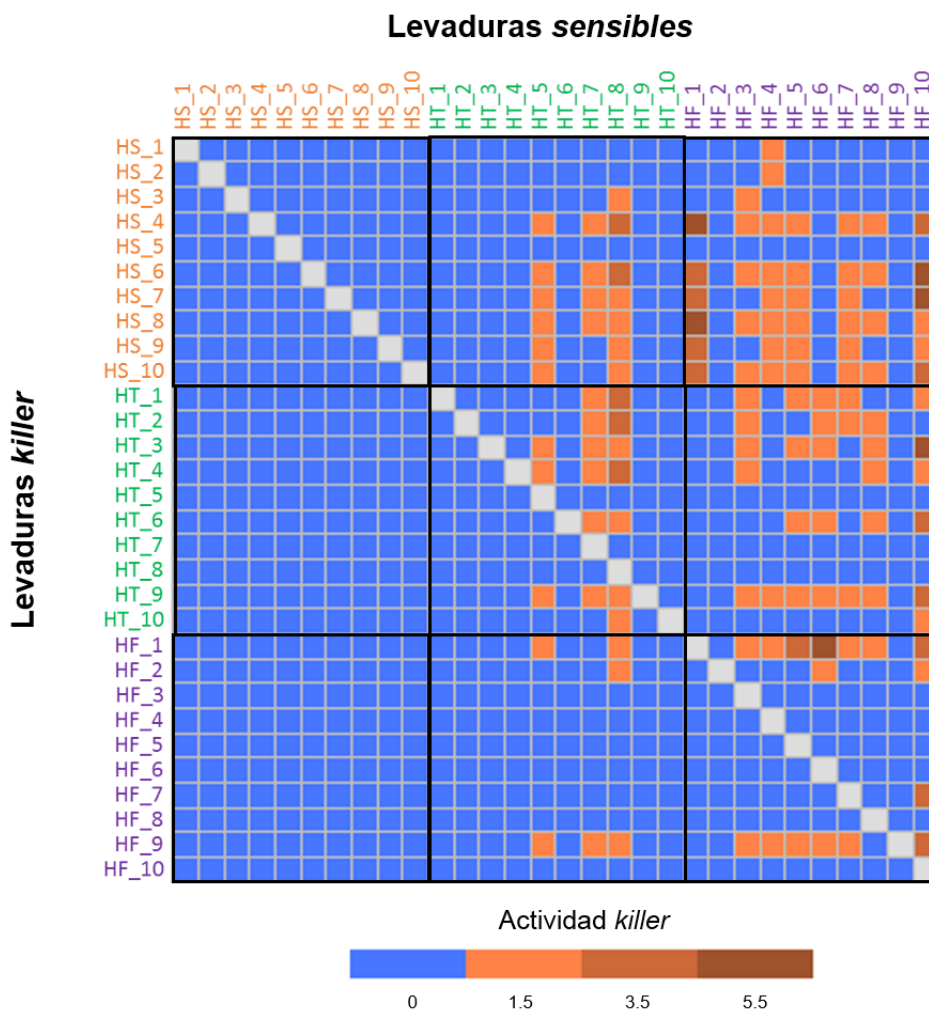


Figura 12: Representación de la actividad *killer* en cada cruce utilizando las 30 cepas de estudio, de los tres grupos genotípicos para *IRC7*. El término levaduras *killer* se refiere a las cepas ensayadas para valorar su actividad *killer*, y levaduras sensibles se refiere a las cepas ensayadas para valorar su resistencia *killer*. El color azul indica ausencia de actividad y la gradación de color naranja indica la intensidad de actividad *killer* (diámetro del halo de inhibición dividido entre el diámetro de la zona concentrada de biomasa).

Adicionalmente, cabe destacarse que las cepas de *S. cerevisiae* estudiadas también mostraron una capacidad de crecimiento pseudofilamentoso diferente en función del grupo genotípico *IRC7* al que pertenecían. Este comportamiento puede tener un papel en la capacidad competitiva de las cepas al aumentar la habilidad de estas en la búsqueda y obtención de nutrientes en condiciones de escasez de recursos. Así, en los ensayos realizados en un medio con concentraciones limitantes de nitrógeno, el 100% de las cepas HS analizadas mostraron capacidad de crecimiento pseudofilamentoso, mientras que solo el 40% de las cepas HT y el 30% de las cepas HF mostraron este fenotipo (Figura 13).

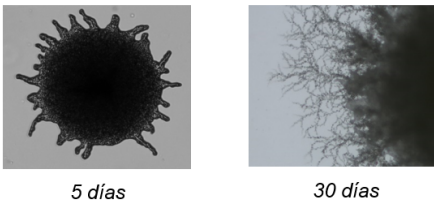
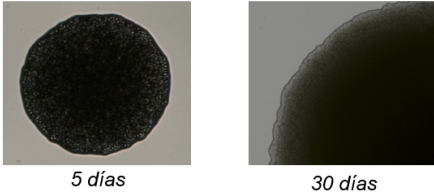
A	Cepa	Genotipo <i>IRC7</i>	Pseudofilamentación	B
	HS_1	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	+	 <p>5 días 30 días</p> <p>Pseudofilamentación +</p>
	HS_2	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	+	
	HS_3	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	+	
	HS_4	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	+	
	HS_5	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	nd	
	HS_6	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	+	
	HS_7	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	+	
	HS_8	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	+	
	HS_9	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	+	
	HS_10	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	+	
	HT_1	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	-	 <p>5 días 30 días</p> <p>Pseudofilamentación -</p>
	HT_2	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	-	
	HT_3	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	nd	
	HT_4	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	+	
	HT_5	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	-	
	HT_6	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	+	
	HT_7	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	+	
	HT_8	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	-	
	HT_9	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	+	
	HT_10	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	+	
	HF_1	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	-	
	HF_2	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	-	
	HF_3	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	-	
	HF_4	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	-	
	HF_5	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	+	
	HF_6	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	-	
	HF_7	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	-	
	HF_8	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	+	
	HF_9	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	+	
	HF_10	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	-	

Figura 13: **A)** Ensayo de capacidad de crecimiento pseudofilamentoso en el panel de cepas de estudio, representando cada uno de los genotipos *IRC7* usando el medio SLAD (nd: no determinado). **B)** Ejemplo de resultado positivo y negativo en los ensayos. (Las fotografías fueron tomadas a los 5 y 30 días con un objetivo 10X).

3.3.4 Variantes genómicas asociadas a los genotipos *IRC7* de las cepas de *S. cerevisiae*

Con el objetivo de explorar las bases genómicas de la prevalencia poblacional y el patrón fenotípico de las cepas HS, se llevó a cabo una búsqueda de marcadores genómicos asociados al alelo *IRC7^S* en las cepas de *S. cerevisiae*. Para una identificación preliminar de dichos marcadores genómicos se secuenció el genoma completo de diez de las cepas caracterizadas a nivel fenotípico (incluyendo, al menos, tres cepas representantes de cada genotipo *IRC7*: HS4, HS6, HS9; HT3, HT6, HT10; HF1, HF2, HF8, HF9) y, posteriormente, se realizó un análisis de identificación de variantes en dichos genomas que presentasen un patrón de co-ocurrencia significativo con el alelo *IRC7^S*. Como vemos en la Figura 8, el análisis filogenético permitió identificar el linaje filogenético de las cepas de *S. cerevisiae* secuenciadas en este estudio. Cabe destacar que, a excepción de la cepa HF8 (que, a pesar de haber sido aislada de una muestra de vino, el análisis filogenético sitúa su genoma como perteneciente al linaje *Bread*), todas las cepas del

CAPÍTULO 1 – Resultados

estudio cuyo genoma fue secuenciado, pertenecían al linaje *Wine* y que, dentro de este, no se observó ninguna agrupación filogenética asociada al genotipo *IRC7* de las cepas, por lo que se descarta un origen común de las cepas HF diferente al de las cepas HS.

3.3.4.1 Variantes de secuencia asociadas al alelo *IRC7^S* en *S. cerevisiae*

Para el análisis de identificación de variantes de secuencia se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* VL3 como genoma de referencia, ya que es una cepa vínica bien estudiada (a nivel genómico y fenotípico) y homocigota para el alelo *wild-type IRC7^F*. Tras la identificación de todas las variantes de secuencia (con un grado de importancia moderada o alto, de acuerdo a lo descrito por Cingolani *et al.*, 2012) en las 9 cepas secuenciadas en este estudio (descartando HF8, debido a su origen filogenético *Bread*) frente al genoma de referencia *S. cerevisiae* VL3, se representaron sus patrones de co-ocurrencia en una red bipartita, descartando aquellas mutaciones presentes en todas las cepas y aquellas mutaciones presentes en solo una de las cepas (Figura 14).

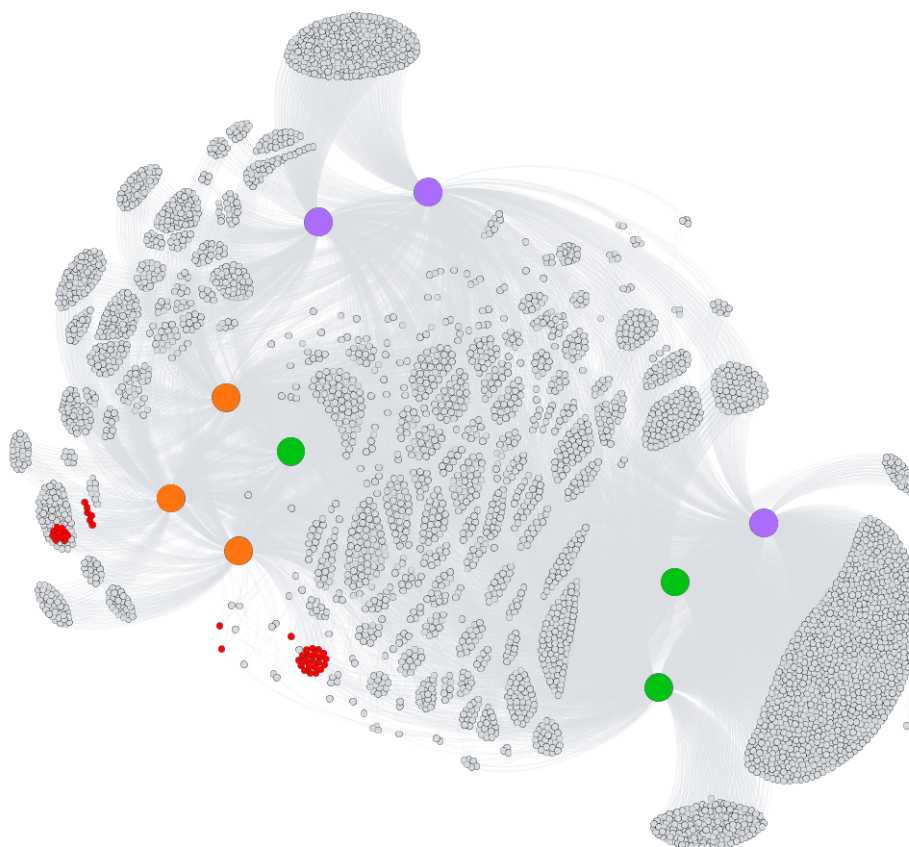


Figura 14: Representación mediante una red bipartita de las mutaciones con un impacto moderado y alto detectadas en el análisis de búsqueda de variantes usando el genoma de la cepa VL3 de *S. cerevisiae* como referencia. Aquellas variantes de secuencia identificadas en todas las cepas y aquellas identificadas solo en una cepa, fueron descartadas. Las 39 variantes de secuencia presentes en las 3 cepas HS y ausentes en las 3 cepas HF están resaltadas como nodos rojos en la red. Las cepas HS, HT y HF están representadas por los nodos naranjas, verdes y morados, respectivamente. Las aristas conectan cada nodo principal (genoma) con las variantes de secuencia (nodos secundarios) presentes en dicho genoma. La identidad, el efecto y el impacto de cada variante génica, así como una descripción del gen al que afectan puede encontrarse en la Tabla 2.

Cada uno de los nodos principales (de mayor tamaño) representa el genoma de las 9 cepas, coloreado en función del genotipo *IRC7*, y los nodos secundarios (de menor tamaño) representan las variantes de secuencia identificadas respecto al genoma de la cepa VL3, destacando en rojo aquellas que cumplen el requisito de presencia en el 100% de los genomas de cepas HS y ausencia en el 100% de los genomas de cepas HF.

Cabe destacar que, en general y con especial significancia en el caso de HS, las cepas tienden a situarse en la red agrupadas en base al genotipo *IRC7* (Figura 14). Para centrar el análisis en los potenciales marcadores genómicos asociados al alelo *IRC7^S*, se identificaron aquellas variantes alélicas conservadas en todas las cepas HS y ausentes en todas las cepas HF detectadas en este análisis preliminar (resaltadas en rojo en la Figura 14). Con esta premisa, las cepas HS compartieron 39 variantes de secuencia, afectando a 13 genes diferentes, las cuales no fueron identificadas en ninguno de los tres genomas HF estudiados (Tabla 2).

Estas variantes de secuencia fueron exploradas en una colección de genomas más amplia, con 150 genomas de diferentes linajes domesticados (*Wine, Sake, Bread, Beer 1* y *Beer 2*), presentes en Gallone *et al.* (2016), con el objetivo de confirmar aquellas variantes de secuencia que tienen patrones de co-ocurrencia significativos con el alelo *IRC7^S*. En la Figura 15 se presenta la distribución de las variantes alélicas y el alelo de referencia para cada variante identificada en el análisis entre los genomas de *S. cerevisiae*, representando los distintos linajes.

En primer lugar, se observó que algunas variantes de secuencia, agrupadas en la parte izquierda del *heatmap* en la Figura 15, se encontraban ampliamente distribuidas entre todas las cepas estudiadas (afectando a los genes *UTP18* (2/2 variantes de secuencia detectadas); *BBC1* (1/1 variantes de secuencia detectadas); *VPS10* (1/24 variantes de secuencia detectadas) y *YML083C* (1/1 variantes de secuencia detectadas). Así, se asumió que representaban variantes alélicas específicas del genoma usado como referencia (VL3), identificadas artefactualmente en el análisis preliminar del genoma de nuestras 9 cepas, por lo que fueron descartadas para una discusión posterior. Por contra, se identificaron una serie de variantes de secuencia con elevadas tasas de co-ocurrencia con el alelo *IRC7^S* (Tabla 3).

Tabla 2: Mutaciones compartidas entre las cepas HS (resaltadas en rojo en la Figura 14) identificadas en el análisis de búsqueda de variantes usando 9 de las cepas de estudio (incluyendo 3 cepas representativas de cada genotipo *IRC7* (HS4, HS6, HS9; HT3, HT6, HT10; HF1, HF2, HF9) y VL3 como cepa de referencia.

Gen afectado	Descripción	Coordenadas genómicas	Impacto	Cambio de base	Cambio de aminoácido	Efecto
<i>VPS10</i> (YBL017C)	Receptor transmembrana tipo I para hidrolasas vacuolares	cr02:173796	Moderado	c,2492A>G	p,Asn831Ser	Variante de pérdida de sentido
		cr02:173844	Moderado	c,2444C>T	p,Thr815Ile	Variante de pérdida de sentido
		cr02:173857	Moderado	c,2431T>C	p,Tyr811His	Variante de pérdida de sentido
		cr02:173883	Moderado	c,2405G>A	p,Ser802Asn	Variante de pérdida de sentido
		cr02:173919	Moderado	c,2369A>T	p,Tyr790Phe	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174133	Moderado	c,2155A>G	p,Lys719Glu	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174139	Moderado	c,2149G>A	p,Val717Ile	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174141	Moderado	c,2147G>A	p,Gly716Glu	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174151	Moderado	c,2137T>C	p,Ser713Pro	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174162	Alto	c,2125_2126insTGAAC	p,Ser709fs	Variante de cambio de marco
		cr02:174166	Alto	c,2117_2121delCAGTC	p,Thr706fs	Variante de cambio de marco
		cr02:174180	Moderado	c,2108A>C	p,Lys703Thr	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174202	Moderado	c,2086G>A	p,Val696Ile	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174217	Moderado	c,2071A>G	p,Lys691Glu	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174220	Alto	c,2067_2068insTA	p,Val690fs	Variante de cambio de marco
		cr02:174221	Alto	c,2065_2066delCC	p,Pro689fs	Variante de cambio de marco
		chr02:174229	Moderado	c,2059A>T	p,Thr687Ser	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174233	Moderado	c,2055A>T	p,Lys685Asn	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174235	Moderado	c,2053A>G	p,Lys685Glu	Variante de pérdida de sentido
		cr02:174241	Moderado	c,2047A>T	p,Thr683Ser	Variante de pérdida de sentido
cr02:174253	Moderado	c,2035G>A	p,Val679Ile	Variante de pérdida de sentido		
cr02:174256	Moderado	c,2032G>A	p,Asp678Asn	Variante de pérdida de sentido		
cr02:174259	Moderado	c,2026_2028delCTC	p,Leu676del	Delección de marco conservado		
cr02:174264	Moderado	c,2023_2024insCCT	p,Val675delinsAlaPhe	Delección de marco conservado		

APC4 (YDR118W)	Subunidad del complejo promotor de la anafase (APC/C); proteína ubiquitina-ligasa necesaria para la degradación de los inhibidores de la anafase	cr04:650193	Moderado	c,1751A>G	p, Glu584Gly	Variante de pérdida de sentido
YDR185C-like protein	Proteína mitocondrial de función desconocida	cr04:791034	Moderado	c,481G>A	p, Val161Ile	Variante de pérdida de sentido
VHS1 (YDR247W)	Serina/treonina quinasa citoplasmática	cr04:904204	Moderado	c,716G>A	p, Ser239Asn	Variante de pérdida de sentido
IRC7 (YFR055W)	Cistationina-β-liasa involucrada en la producción de tioles	cr06:229734	Alto	c,1023_1060delCGACTCTTGTGATTACCC CTGTAAATCCTTGTAAATAATA	p, Tyr341fs	Variante de cambio de marco
YJL163C-like protein	Proteína putativa con función desconocida	cr10:108960	Moderado	c,1615G>A	p, Gly539Arg	Variante de pérdida de sentido
UTP18 (YJL069C)	Subunidad pequeña del proteosoma involucrada en la maduración del pre ARNr 18S	cr10:303542 cr10:303621	Moderado Moderado	c,304A>G c,225A>C	p, Thr102Ala p, Glu75Asp	Variante de pérdida de sentido Variante de pérdida de sentido
BBC1 (YJL020C)	Proteína similar a la floculina de superficie celular Flo11p	cr10:391243	Moderado	c,2469_2495delACCTCCAGCACCTCCAG CACCTCCAGC	p, Pro824_Ala832del	Delección de disrupción de marco
SDHI (YKL148C)	Subunidad flavoproteica de la enzima succinato deshidrogenasa	cr11:167775	Moderado	c,604C>T	p, His202Tyr	Variante de pérdida de sentido
PAU6 (YNR076W)	Miembro de la familia multigénica serinpauperina; activo durante la fermentación alcohólica	cr12:2020 chr12:2021 chr12:2022	Moderado Moderado Moderado	c,156G>T c,155T>C c,154A>T	p, Met52Ile p, Met52Thr p, Met52Leu	Variante de pérdida de sentido Variante de pérdida de sentido Variante de pérdida de sentido
MAPI (YLR244C)	Amino peptidasa de metionina	cr12:565747	Moderado	c,53C>T	p, Thr18Ile	Variante de pérdida de sentido
YML083C-like protein	Proteína de función desconocida, se expresa durante el crecimiento anaeróbico	cr13:93636	Moderado	c,238G>A	p, Asp80Asn	Variante de pérdida de sentido
RSF1 (YMR030W)	Activador transcripcional requerido para el crecimiento respiratorio, a través de la interacción con factores de transcripción que median la transición al crecimiento respiratorio	cr13:313035	Moderado	c,542A>G	p, Asp181Gly	Variante de pérdida de sentido

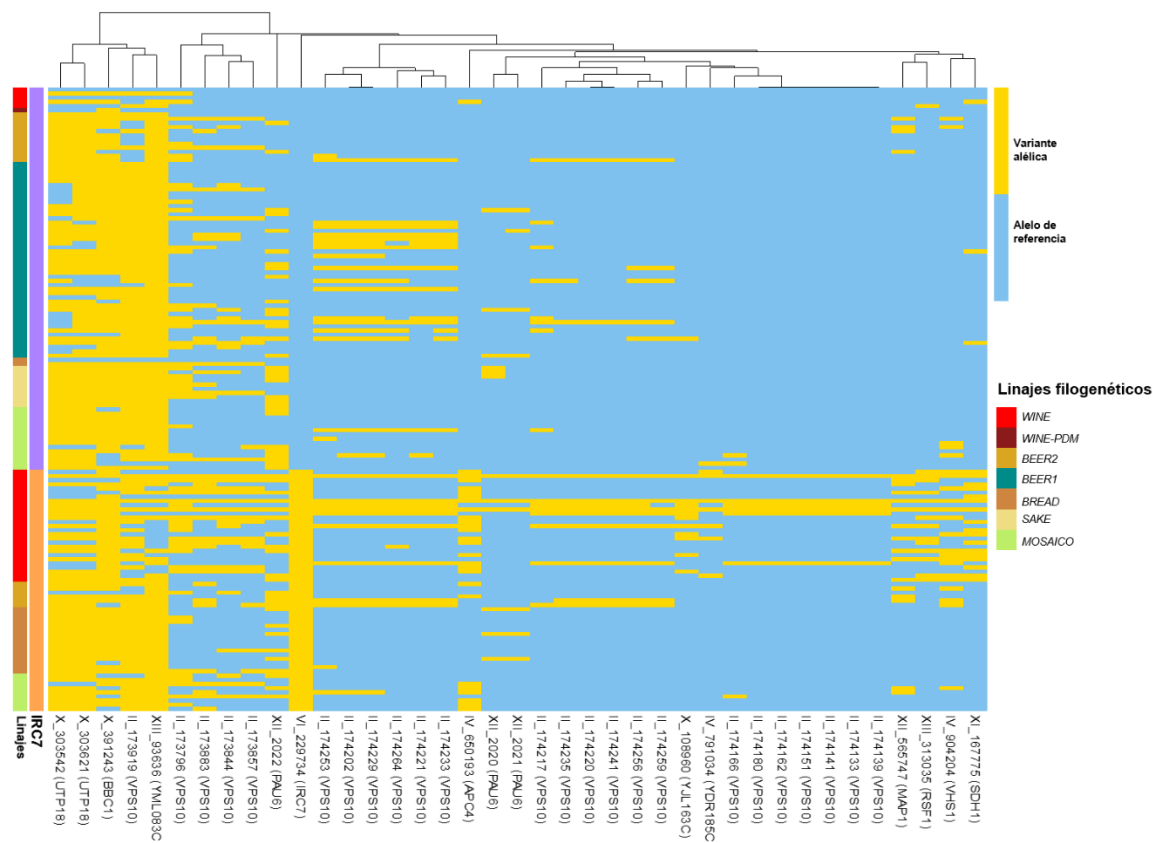


Figura 15: Distribución de las 39 variantes de secuencia identificadas (que afectan a 13 genes diferentes) como potencialmente asociadas al alelo *IRC7^S* (resaltadas en rojo en la red bipartita de la Figura 14). La variante de secuencia del alelo *IRC7^S* (deleción de 38 pb encontrada en la posición VI_229734) está resaltada en negrita. La presencia/ausencia (variante alélica/alelo de referencia) de cada variante de secuencia en la colección de genomas (representando seis linajes domesticados de *S. cerevisiae*) está indicada en color amarillo y azul, respectivamente. Las cepas están ordenadas según su genotipo *IRC7*, mientras que las variantes de secuencia están ordenadas en el dendrograma según su distribución entre la colección de genomas.

Entre los genes que portan estas variantes de secuencia destacan los siguientes: *VPS10* (receptor de proteínas vacuolares), *VHS1* (ser/thr quinasa), *SDHI* (subunidad flavoproteica de la succinato deshidrogenasa), *APC4* (subunidad del complejo promotor de la anafase), *RSF1* (factor requerido para la respiración) y *YJL163C* (proteína transmembrana de función desconocida). Además, se puede observar que algunas de estas variantes de secuencia están altamente conservadas en el linaje Wine, algunas de ellas incluso presentes, exclusivamente en este linaje (mutación que afecta al gen *RSF1*) (Figura 15). Estas variantes de secuencia, que presentan tasas de co-ocurrencia significativas con el alelo *IRC7^S*, no solo en el linaje vínico, sino también aquellos genomas portadores de dicho alelo en otros linajes domesticados de *S. cerevisiae*, son potenciales candidatos para explicar el fenotipo característico y ventajoso descrito en las cepas HS, así como su alta prevalencia en las poblaciones vínicas. La anotación de la función de estos genes será utilizada para discutir (en la sección de 6.1 de la discusión

general) el posible papel de las variantes alélicas detectadas en el fenotipo y la prevalencia poblacional de las cepas HS.

Tabla 3: Co-ocurrencia de las mutaciones con la variante alélica *IRC7^S* (c,1023_1060delCGACTCCTTGATTACCCCTGTAAATCCTTGTAATAATA) entre las cepas de *S. cerevisiae* detectadas en el análisis de búsqueda de secuencia (Tabla III del anexo del capítulo 1). Solo las mutaciones con una probabilidad de co-ocurrencia mayor de 0,95 y una co-ocurrencia con *IRC7^S* mayor de 10 están indicadas.

Mutación	Gen afectado	Total de mutaciones	Co-ocurrencia con <i>IRC7^S</i>	Porporción ¹	Tasa ²	Probabilidad
IV_650193	<i>APC4</i> (YDR118W)	27	26	0,96	0,45	1,00
XIII_313035	<i>RSF1</i> (YMR030W)	15	14	0,93	0,24	1,00
X_108960	<i>YJL163C</i>	12	11	0,92	0,19	1,00
XI_167775	<i>SDH1</i> (YKL148C)	20	17	0,85	0,29	1,00
XII_565747	<i>MAP1</i> (YLR244C)	20	16	0,80	0,28	1,00
IV_904204	<i>VHS1</i> (YDR247W)	22	17	0,77	0,29	1,00
II_173857	<i>VPS10</i> (YBL017C)	29	18	0,62	0,31	1,00
II_173883	<i>VPS10</i> (YBL017C)	39	21	0,54	0,36	0,98

¹ Número de co-ocurrencias con *IRC7^S* entre el número de mutaciones totales.

² Número de co-ocurrencias con *IRC7^S* entre el número total de mutaciones *IRC7^S* (58).

CAPÍTULO 1 – Anexo

3.4 ANEXO CAPÍTULO 1

Tabla I: Cepas de *S. cerevisiae* usadas en el estudio presentado en el capítulo 1. “*” cepas cuyo genoma completo fue secuenciado en este estudio.

Cepa	Genotipo <i>IRC7</i>	Grupo <i>IRC7</i>	Código de cepa	Origen
S-EM-25	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_1	Complutense Yeast Collection
S-EM-73	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_2	Complutense Yeast Collection
S-EM-107	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_3	Complutense Yeast Collection
S-EM-251*	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_4	Complutense Yeast Collection
S-EM-271	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_5	Complutense Yeast Collection
S-O-320*	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_6	Complutense Yeast Collection
AG001	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_7	Agrovin S,A,
AG006	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_8	Agrovin S,A,
AG008*	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_9	Agrovin S,A,
AG012	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{SL}</i>	HS	HS_10	Agrovin S,A,
S-EM-10	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_1	Complutense Yeast Collection
S-EM-100	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_2	Complutense Yeast Collection
S-EM-294*	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_3	Complutense Yeast Collection
S-O-10	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_4	Complutense Yeast Collection
S-O-166	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_5	Complutense Yeast Collection
S-O-353*	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_6	Complutense Yeast Collection
AG004	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_7	Agrovin S,A,
AG007*	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_8	Agrovin S,A,
AG013	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_9	Agrovin S,A,
AG017	<i>IRC7^{SL} / IRC7^{FL}</i>	HT	HT_10	Agrovin S,A,
S-EM-115*	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_1	Complutense Yeast Collection
S-EM-129*	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_2	Complutense Yeast Collection
S-O-203	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_3	Complutense Yeast Collection
S-O-213	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_4	Complutense Yeast Collection
S-O-331	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_5	Complutense Yeast Collection
S-O-335	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_6	Complutense Yeast Collection
AG003	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_7	Agrovin S,A,
AG015*	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_8	Agrovin S,A,
AG023*	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_9	Agrovin S,A,
WY09	<i>IRC7^{FL} / IRC7^{FL}</i>	HF	HF_10	Agrovin S,A,

CAPÍTULO 1 – Anexo

Tabla II: Lista de genomas usados para el genotipado *IRC7* de cepas de *S. cerevisiae*. Se indica el nombre de cepa, el sustrato de aislamiento y su localización geográfica, el linaje filogenético al que pertenecen y el alelo *IRC7* identificado en su genoma. “°” indica qué genomas fueron usados para el análisis filogenético, y “*” qué genomas fueron usados para el análisis de búsqueda de secuencias (*Variant Calling*).

Cepa	Sustrato de aislamiento	Localización	Linaje filogenético	Alelo <i>IRC7</i>	Referencia	Código de proyecto
AWRI 1631	Vino	Australia	<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Borneman <i>et al.</i> 2008	PRJNA30553
AWRI 796 °	Cepa vínica comercial	Sudáfrica	<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Borneman <i>et al.</i> 2011	PRJNA48559
beer014 *	Cerveza (Strong ale)		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer020 *	Cerveza		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer024 *	Cerveza (refermentación)		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer030 *	Cerveza (Trappist)		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer033 *	Cerveza (Strong ale)		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer088 *			<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
DBVPG6765	Vino		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Yue <i>et al.</i> , 2017	PRJEB7245
EXF 6719 °	Vino	Eslovenia	<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
Lalvin BM45 °	Cepa vínica comercial	Italia	<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
Lalvin W15 °	Cepa vínica comercial		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
LalvinCY3079 °	Cepa vínica comercial		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
PR °	<i>Pasteur Red</i>		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
PYCC 4072 °	Cepa vínica comercial		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
RM11_1A	Viñedo	EEUU	<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	-	PRJNA13674
sake002 *	Sake		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
Spirits002 *	Bebidas espirituales		<i>Wine</i>	<i>IRC7 F</i>	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
Spirits004 *			<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> 201	PRJNA323692
Spirits011 *	Bebidas espirituales		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
TUM V1 °	Vino		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
Uvaferm SGV °	Cepa vínica comercial		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
Uvaferm VRB °	Cepa vínica comercial		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
Vin13 °	Cepa vínica comercial	Sudáfrica	<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Borneman <i>et al.</i> , 2011	PRJNA48563
VL3 °*	Cepa vínica comercial	Francia	<i>Wine</i>	<i>IRC7 F</i>	Borneman <i>et al.</i> , 2011	PRJNA48565
Wine001 *	Vino		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine003 *	Vino		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine004 *	Vino		<i>Wine</i>	<i>IRC7 S</i>	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691

CAPÍTULO 1 – Anexo

Wine005 *	Vino		Wine	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine006 *	Vino		Wine	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine007 *	Vino		Wine	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine009 *	Vino		Wine	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine010 *	Vino		Wine	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine011 *	Vino		Wine	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine013 *	Vino		Wine	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine014 *	Vino		Wine	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine015 *	Vino		Wine	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine017 *	Vino		Wine	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Wine018 *	Vino		Wine	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
YJM1078	Clínica	Portugal	Wine	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA183131
YJM1129	Destilería		Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189300
YJM1242	Fruta		Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189886
YJM1244	Fruta		Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189887
YJM1250	Caña de azúcar		Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189889
YJM1332	Vino	Italia	Wine	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189896
YJM1332	Vino	Italia	Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189896
YJM1336	Vino	Italia	Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189897
YJM1341	Mosto	Sudáfrica	Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189898
YJM1387	Vino	Japón	Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189907
YJM1415	Vino	Francia	Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189914
YJM1433	Vino		Wine	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189918
ZP641 °	Vino en fermentación	Portugal	Wine	IRC7 S	Almeida <i>et al.</i> , 2015	PRJEB7601
AG08 °*	Cepa vínica comercial	España	Wine	IRC7 S	This work	PRJNA646611
AG017 °*	Cepa vínica comercial	España	Wine	IRC7 F/ IRC7 S	This work	PRJNA646611
AG023 °*	Cepa vínica comercial	España	Wine	IRC7 F	This work	PRJNA646611
S-EM-129 °*	Vino en fermentación	España	Wine	IRC7 F	This work	PRJNA646611
S-EM-251 °*	Vino en fermentación	España	Wine	IRC7 S	This work	PRJNA646611
S-EM-294 °*	Vino en fermentación	España	Wine	IRC7 F /IRC7 S	This work	PRJNA646611
S-O-320 °*	Vino en fermentación	España	Wine	IRC7 S	This work	PRJNA646611
S-O-353 °*	Vino en fermentación	España	Wine	IRC7 F/ IRC7 S	This work	PRJNA646611
S-EM-115 °*	Vino en fermentación	España	Wine - PDM	IRC7 F	This work	PRJNA646611
IOC 18-2007 °	Cepa vínica comercial		Wine - PDM	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> , 2017	PRJEB19382

CAPÍTULO 1 – Anexo

EC1118 °	<i>Prise de Mousse</i>	Francia	<i>Wine - PDM</i>	IRC7 F/ IRC7 S	Novo <i>et al.</i> , 2009	PRJEA37863
IOC 9002 °	Cepa vínica comercial		<i>Wine - PDM</i>	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJNA264372
Lalvin QA23 °	Vino	Portugal	<i>Wine - PDM</i>	IRC7 F	Borneman <i>et al.</i> 2011	PRJNA48561
PYCC 4074 °	Cepa vínica comercial	Portugal	<i>Wine - PDM</i>	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
PYCC 6722 °	Vino	Armenia	<i>Wine - PDM</i>	IRC7 S	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
PYCC 6726 °	Jerez-Vino	España	<i>Wine - PDM</i>	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
PYCC 6729 °	Jerez-Vino	Armenia	<i>Wine - PDM</i>	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2017	PRJEB19382
YJM1574	Vino		<i>Wine - PDM</i>	IRC7 S	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189934
YJM270 °	Vino	Eslovenia	<i>Wine - PDM</i>	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> , 2015	PRJNA189852
beer002 *	Cerveza		<i>Beer2</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer003 *	Cerveza		<i>Beer2</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer004 *	Cerveza		<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer011 *	Cerveza (Abbey)		<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer013 °*	Cerveza (referemtación)	Bélgica	<i>Beer2</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer021 °*	Cerveza (Pale ale)	Canada	<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer027 *	Cerveza referemtación)		<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer032 °*	Cerveza	Inglaterra	<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer034 *	Cerveza (Saison)		<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer039 *	Cerveza (Lager)		<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer040 *	Cerveza (Lager)		<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer059 *			<i>Beer2</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer062 *			<i>Beer2</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer063 °*	Cerveza	Inglaterra	<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer080 *			<i>Beer2</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer083 °*	Cerveza (Saison)	Bélgica	<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer084			<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer085 *			<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer086 *			<i>Beer2</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer092 °	Cerveza (Strong ale)	Bélgica	<i>Beer2</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
3-10 °	Quercus cerris	Italia	<i>Mediterranean Oak</i>	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
EXF 7200 °	Quercus robur	Montenegro	<i>Mediterranean Oak</i>	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJNA264372
HUN 9.1s1 °	Roble	Hungría	<i>Mediterranean Oak</i>	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
MB 7c °	Quercus pubescens	Francia	<i>Mediterranean Oak</i>	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJNA264372

CAPÍTULO 1 – Anexo

OakRom 3 °	Roble	Rumanía	Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7675
PYR 4b °	Quercus pubescens	Grecia	Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP1008 °	Quercus faginea	Portugal	Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJNA264372
ZP541 °	Fagus sylvatica	Portugal	Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP560 °	Quercus pyrenaica	Portugal	Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP562	Quercus ilex		Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP570 °	Bebidas espirituales.	Portugal	Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP736	Rotten figs		Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP848 °	Quercus ilex	Portugal	Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7675
ZP850 °	Quercus ilex	España	Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP851	Quercus ilex		Mediterranean Oak	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
beer001 *	Cerveza	Inglaterra	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer008 *	Cerveza (Ale)	Alemania	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer009 *	Cerveza (Stout)	Inglaterra	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer010 *	Cerveza	Inglaterra	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer012 *	Cerveza (Bitter)	Alemania	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer015 °*	Cerveza	Alemania	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer016 *	Cerveza	Alemania	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer022 *	Cerveza (referemtación)	Alemania	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer026 *	Cerveza (referemtación)	Alemania	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer031 *	Cerveza (Trappist)	Alemania	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer036 *	Cerveza (Trappist)	Inglaterra	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer037 *			Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer041 *	Cerveza (Lager)	Alemania	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer043 *	Cerveza (Lager)	Alemania	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer045 *			Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer046 °*	Cerveza	Bélgica	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer047 *	Cerveza (Stout)	Inglaterra	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer048 °*	Cerveza (Pale ale)	Inglaterra	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer049 *	Cerveza (Pale ale)	Inglaterra	Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer050 *			Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer052 *			Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer051 *			Beer1	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691

CAPÍTULO 1 – Anexo

beer053 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer054 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer055 °*	Cerveza	Inglaterra	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer056 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer064 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer065 °*	Cerveza	EEUU	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer066 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer068 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer069 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer070 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer071 °*	Cerveza	EEUU	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer073 °*	Cerveza (Hefeweizen)	Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer075 °*	Cerveza de trigo	Bélgica	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer076 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer077 °*			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer078 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer079 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer081			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer082 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer087 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer089			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer090			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer094			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer096 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer098			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer099			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer100			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer101			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer102 *			<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
FostersB °	Cepa cervecera		<i>Beer1</i>	IRC7 F	Borneman <i>et al.</i> , 2011	PRJNA48569
FostersO °	Cepa cervecera		<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	ERS1108627
NCYC 1044 °	British ale		<i>Beer1</i>	IRC7 F	Dunn <i>et al.</i> 2012	SAMN00779790
Spirits005 *	Bebidas espirituales	Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691

CAPÍTULO 1 – Anexo

TUM 148 °	Cerveza	Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 149 °	Cerveza de trigo	Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
TUM 165 °	British ale	Inglaterra	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 174 °	Cerveza regional	Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 175 °	Cerveza de trigo	Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 177 °	Alt / Kölsch Cerveza	Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 205	Cerveza de trigo		<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
TUM 208	Cerveza	Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 210 °	British ale / stout	Inglaterra	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 211 °	British ale / stout	Inglaterra	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 213 °	British Ale / Stout	Inglaterra	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 308 °	Cerveza	Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 338 °	Cerveza Alt	Düsseldorf, Alemania	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 381 °	Cerveza	Bélgica	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 503 °	California Ale		<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 507 °	Cerveza		<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 508 °	Irish ale / stout	Irlanda	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 509	Irish Ale	Inglaterra	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
TUM 510 °	British Ale	Inglaterra	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
TUM 513 °	California ale		<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
W205 °	Hefeweizen ale		<i>Beer1</i>	IRC7 F	Dunn <i>et al.</i> 2012	SAMN00779790
Wine012 *	Vino	Inglaterra	<i>Beer1</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
bread001 *	Pan		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
AG015 °*	Cepa vinica comercial	España	<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	This work	PRJNA646611
AP13.1 °	Levadura panadera	Portugal	<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Barbosa <i>et al.</i> 2018	PRJEB24932
beer005 °*	Ale Cerveza	Bélgica	<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer006 *	Cerveza (refermentación)		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer023 *	Cerveza (refermentación)		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer025 *	Cerveza (refermentación)		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer028 *	Cerveza (refermentación)		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer029 °*	Ale Cerveza (refermentación)	Bélgica	<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer038 *			<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2017	PRJNA323692
beer061 *			<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2018	PRJNA323693

CAPÍTULO 1 – Anexo

bread002 *	Pan		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
bread003 *	Pan		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
bread004 °*	Pan	Bélgica	<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
MBG17 °	Levadura panadera	Marruecos	<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 S	Dunn <i>et al.</i> , 2012	SAMN00779790
Platinum °	Cepa comercial		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
PYCC 4226 °	Cepa comercial		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 S	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
Spirits001 *	Bebidas espirituales		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
Spirits003 *	Bebidas espirituales		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
TUM 480 °	Cerveza Opaque	Sudáfrica	<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
TUM 506 °	British ale	Inglaterra	<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
wild005 *	Salvaje		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
wild006 *	Salvaje		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
wild007 *	Salvaje		<i>Bread / Mixed</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
bioethanol001 *	Bioetanol		<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
bioethanol003 *	Bioetanol		<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
bioethanol004 *	Bioetanol		<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
CBS 1585 °	Sake	Japón	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
CBS 1598 °	Sake	Japón	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
CBS 435 °	Sake	Japón	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
Kyokai 7 °	Sake	Japón	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Akao <i>et al.</i> , 2010	PRJDA45827
NRRLY 11572 °	Budod	Filipinas	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
NRRLY 12844 °	Budod	Filipinas	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
sake001 *	Sake		<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
sake003 *	Sake		<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
sake004 *	Sake		<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
sake005 *	Sake		<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
sake006 *	Sake		<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
sake007 *	Sake		<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
TUM 127 °	Cerveza de trigo	Alemania	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
TUM 184	Cerveza Alt	Alemania	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
TUM 380 °	Cerveza Lambic	Bélgica	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
TUM 68 °	Cerveza de trigo	Alemania	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016	PRJEB13332
UC5 °	Sake	Japón	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Justin Fay, WU	PRJNA60197

CAPÍTULO 1 – Anexo

wild004 *			<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323692
YJSH1°	Bioetanol	China	<i>Sake / Asian</i>	IRC7 F	Zheng <i>et al.</i> 2012	PRJNA72403
NRRL-YB-4084 °	Coco	Filipinas	<i>Philippines</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
YJM1400 °	Guava	Filipinas	<i>Philippines</i>	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189911
YJM1401 °	Papaya	Filipinas	<i>Philippines</i>	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189912
YJM1479 °	Coco	Filipinas	<i>Philippines</i>	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189929
beer007	Cerveza (Ale)		North American & Japón	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
beer044	Cerveza (Pale ale)		North American & Japón	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> 2016	PRJNA323691
SDO 3s1 °	Roble	EE.UU.	North American & Japón	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
YJM1273	Roble tree	EE.UU.	North American & Japón	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189891
YJM1434	Roble		North American & Japón	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189919
YPS 1009 °	Roble	EE.UU.	North American & Japón	IRC7 F	Justin Fay, WU	PRJNA60223
YPS 128 °	<i>Quercus alba</i>	EE.UU.	North American & Japón	IRC7 F	Yue <i>et al.</i> 2017	PRJEB7245
ZP1050 °	<i>Quercus ilex</i>	Portugal	North American & Japón	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7675
ZP530 °	<i>Castanea sativa</i>	Portugal	North American & Japón	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP651 °	<i>Quercus acutissima</i>	Japón	North American & Japón	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP652 °	<i>Quercus acutissima</i>	Japón	North American & Japón	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP656 °	<i>Quercus acuta</i>	Japón	North American & Japón	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP779 °	<i>Quercus acutissima</i>	Japón	North American & Japón	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP781 °	<i>Quercus serrata</i>	Japón	North American & Japón	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
ZP785 °	<i>Quercus dentata</i>	Japón	North American & Japón	IRC7 F	Almeida <i>et al.</i> 2015	PRJEB7601
PW5 °	Vino de palma	Nigeria	<i>West Africa</i>	IRC7 F	Justin Fay, WU	PRJNA60181
SK1	Suelo		<i>West Africa</i>	IRC7 F	Yue <i>et al.</i> , 2017	PRJEB7245
YJM1439 °	Cerveza	África occidental	<i>West Africa</i>	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189920
YJM1248 °		África occidental	<i>West Africa</i>	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189888
YJM195 °	Vino de palma	Nigeria	<i>West Africa</i>	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189849
UWOPS 03-433.3 °	Néctar de palma	Malasia	<i>Malaysia</i>	IRC7 F	Gonçalves <i>et al.</i> 2016	PRJEB13332
UWOPS 03-461.4 °	Néctar de palma	Malasia	<i>Malaysia</i>	IRC7 F	Yue <i>et al.</i> 2017	PRJEB7245
YJM1447 °	Néctar de palma	Malasia	<i>Malaysia</i>	IRC7 F	Strope <i>et al.</i> 2015	PRJNA189923
beer017 *			<i>Mosaic</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323691
beer018 *			<i>Mosaic</i>	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323693
beer019 *			<i>Mosaic</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323692
beer035 *			<i>Mosaic</i>	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323707

CAPÍTULO 1 – Anexo

beer042 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323696
beer057 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323708
beer058 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323709
beer060 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323710
beer072 °*	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323715
beer074 °*	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323713
beer093 °	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323714
bioethanol002 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323695
bioethanol005 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323694
laboratory001 *	Mosaic	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323716
laboratory002 *	Mosaic	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323717
Spirits006 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323704
Spirits007 *	Mosaic	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323706
Spirits008 *	Mosaic	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323705
Spirits009 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323711
Spirits010 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323712
wild001 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323701
wild002 *	Mosaic	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323702
wild003 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323700
Wine002 *	Mosaic	IRC7 F	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323703
Wine008 *	Mosaic	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323697
Wine016 *	Mosaic	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323698
Wine019 *	Mosaic	IRC7 S	Gallone <i>et al.</i> , 2016	PRJNA323699

CAPÍTULO 1 – Anexo

Tabla III: Medios de cultivo usados en el fenotipado de cepas de *S. cerevisiae*.

Medio	Código	Categoría
Glucosa 0,5%	Glu 0,5%	Fuente de carbono
Glucosa 2%	Glu 2%	Fuente de carbono
Glucosa 8%	Glu 8%	Fuente de carbono
Glucosa 16%	Glu 16%	Fuente de carbono
Glucosa 32%	Glu 32%	Fuente de carbono
Fructosa 2%	Fru 2%	Fuente de carbono
Fructosa 32%	Fru 32%	Fuente de carbono
Galactosa 2%	Gal 2%	Fuente de carbono
Lactosa 2%	Lac 2%	Fuente de carbono
Sacarosa 2%	Suc 2%	Fuente de carbono
Maltosa 2%	Mal 2%	Fuente de carbono
Glicerol 2%	Gli 2%	Fuente de carbono
Sorbitol 2%	Sor 2%	Fuente de carbono
Etanol 2%	Eth 2%	Fuente de carbono
Metanol 2%	Met 2%	Fuente de carbono
Precultivo con fructosa	Fru PC	Fuente de carbono
Ácido tartárico 2%	Tar 2%	Fuente de carbono
Ácido cítrico 2%	Cit 2%	Fuente de carbono
Precultivo sin glucosa	Glu dep	Fuente de carbono
Sin ácido succínico	Succ dep	Fuente de carbono
Mosto natural	Must	Ambiente
Mosto de uva sintético ¹	SGM	Ambiente
Baja temperatura (20°C)	20°C	Ambiente
Alta temperatura (37°C)	37°C	Ambiente
Bajo pH (3,5)	pH 3,5	Ambiente
Alto pH (7)	pH 7	Ambiente
Bajo amonio (0,1%)	Am 0,1%	Fuente de nitrógeno
Sin aminoácidos	aa dep	Fuente de nitrógeno
Asparagina 0,5%	Asp 0,5 %	Fuente de nitrógeno
Citrulina 0,5%	Cit 0,5%	Fuente de nitrógeno
Ácido glutámico 0,5%	Glut 0,5%	Fuente de nitrógeno
Glutamina 0,5%	Gln 0,5%	Fuente de nitrógeno
Metionina 0,5%	Met 0,5%	Fuente de nitrógeno
Leucina 0,5%	Leu 0,5%	Fuente de nitrógeno
Serina 0,5%	Ser 0,5%	Fuente de nitrógeno
Valina 0,5%	Val 0,5%	Fuente de nitrógeno
Citrulina-Metilamina ²	Cit-MA	Fuente de nitrógeno
Etanol 7%	Et 7%	Químicos
Etanol 16%	Et 16%	Químicos
NaCl 0,85 M	NaCl	Químicos
CuCl ₂ 375 µM	CuCl ₂	Químicos
KCl 2 M	KCl	Químicos
CdCl ₂ 100 µM	CdCl ₂	Químicos
Ditiotreitol 1,6 mM	DTT	Químicos
Metilamina 100 mM	MA	Químicos
Metabisulfito sódico 400 ppm	MBS	Químicos
β-mercaptoetanol 15 mM	β-Mer	Químicos
Dimetil sulfóxido 2%	DMSO	Químicos

¹ Henschke y Jiranek (1993), ² Thibon *et al.* (2008)

4 CAPÍTULO 2:

Influencia de *Torulaspora delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima* en el perfil sensorial del vino a través de la liberación de tioles (3SH, 3SHA y 4MSP) en fermentaciones secuenciales con *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1 Planteamiento

La composición química de los vinos y, por tanto, sus características sensoriales están determinadas, en gran medida, por los metabolitos liberados por las levaduras durante la fermentación alcohólica. Por ello, la diversidad genética y metabólica asociada a las levaduras es determinante en el perfil aromático de los vinos. Entre los metabolitos volátiles odorantes liberados por las levaduras, los compuestos azufrados tienen un gran impacto en el aroma de los vinos, debido a su bajo umbral de percepción. Los tioles volátiles polifuncionales destacan como los compuestos azufrados más importantes dentro del aroma varietal de ciertos vinos blancos (i.e. var. Sauvignon blanc, Verdejo). Este grupo incluye el 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona (4MSP), el 3-sulfanilhexan-1-ol (3SH) y su derivado acetilado, el 3-sulfanilhexil acetato (3SHA). Las bases genéticas de la liberación de tioles por parte de las levaduras han sido estudiadas en *S. cerevisiae*, estableciendo al gen *IRC7*, codificante para una enzima cistationina- β -liasa, como uno de los genes más determinantes en la liberación de tioles, especialmente el 4MSP, a partir de los correspondientes precursores cisteinilados (cys-4MSP). Como se ha demostrado en el capítulo 1, la mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* poseen un alelo no funcional para la liberación de tioles. En este contexto, y en base a las evidencias aportadas por Belda *et al.* (2016a), las levaduras no-*Saccharomyces* se postulan como una herramienta interesante para la revelación de tioles volátiles en el vino. Así, en el estudio presentado en el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral se analizó el impacto, en fermentaciones secuenciales junto con *S. cerevisiae*, de dos cepas de especies no-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii* NS-TD y *M. pulcherrima* NS-EM-34) en la mejora del perfil sensorial de los mismos.

4.2 Material y métodos

4.2.1 Cepas de levaduras, medios de cultivo e identificación molecular

Las cepas de *S. cerevisiae* Viniferm AG012 y Viniferm AG023 y la cepa de *T. delbrueckii* Viniferm NS-TD fueron provistas por Agrovín S.A. (España). La cepa de *M. pulcherrima* NS-EM-34 fue obtenida de la *Complutense Yeast Collection* (CYC). Para el mantenimiento rutinario de las cepas se empleó el medio *Sabouraud-Cloranfenicol* (Oxoid, Reino Unido). Para identificación taxonómica de los cultivos se realizó la extracción de ADN, siguiendo el método descrito por Querol *et al.* (1992), seguida de la secuenciación parcial del gen de la subunidad 26S del ARNr (cebadores NL-1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' y NL-4 5'-GGTCCG TGTTC AAGACGG') (Kurtzman y Robnett, 1997). Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas haciendo uso de la herramienta BLAST, confirmándose la pureza de los cultivos. Los tipados de las cepas de *S. cerevisiae* se realizaron mediante la amplificación de la región interdelta del genoma de *S. cerevisiae* (cebadores delta 12 5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3' y delta 21 5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3') siguiendo el procedimiento de PCR y electroforesis de ácidos nucleicos descritos en la bibliografía (Legras y Karst 2003).

4.2.2 Genotipado del gen *IRC7*

Las cepas de *S. cerevisiae* Viniferm AG012 y Viniferm AG023 fueron usadas como cepas homocigotas para el alelo completo de *IRC7* (*IRC7^F*) y para el alelo portador de una delección de 38-pb (*IRC7^S*), respectivamente. Se confirmaron los genotipos *IRC7* usando los cebadores PF6 (5'-AGCTGGTCTGGAGAAAATGG-3') y PR7 (5'-TCTTCTGCGAGACGTTCAA-3') diseñados por Roncoroni *et al.* (2011). Estos cebadores amplifican una región cercana al extremo 3' del gen *IRC7* que comprende una secuencia de un tamaño comprendido entre 219 pb y 181 pb, según se trate del alelo completo o del portador de la delección, respectivamente. Para la reacción de PCR se empleó una mezcla de reacción compuesta por 25 µl del preparado de polimerasa DreamTaq Green (Life Technologies Ltd., UK), 2 µl de cada cebador y 19 µl de agua Milli-Q, en un volumen final de 48 µl, al que se adicionan 2 µl de ADN muestra (50 ng/µl) extraído de las levaduras según el método descrito por Querol *et al.* (1992). Se utilizó el termociclador “Eppendorf Mastercycler” con el siguiente programa de PCR: desnaturalización inicial: 4 minutos a 94 °C; 35 ciclos de amplificación

(desnaturalización: 15 segundos a 94 °C; hibridación: 30 segundos a 56 °C; elongación: 60 segundos a 72 °C); elongación final: 5 minutos a 72 °C; refrigeración: 10 °C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (2% p/v) en un volumen de 150 ml de tampón TAE 1X, con 7 µl de GelRed® (Biotium) como colorante para ácidos nucleicos. Para el desarrollo de la electroforesis se empleó un voltaje de 80 V durante 60 minutos.

4.2.3 Búsqueda y caracterización del gen *IRC7* ortólogo de *S. cerevisiae* en las levaduras no-*Saccharomyces*

A partir del genoma secuenciado de dos cepas de *T. delbrueckii* (*T. delbrueckii* NRRL Y-50541, números de acceso GenBank de CP011778 a CP011785; y *T. delbrueckii* CBS 1146, números de acceso GenBank de NC_016501 a NC_0165018), y utilizando la herramienta bioinformática BLAST-NCBI se identificó el gen *IRC7* putativo en *T. delbrueckii* (número de acceso GeneBank: TDEL0D06630). Por el contrario, no se encontró el gen ortólogo de *IRC7* en el genoma de *M. pulcherrima* disponible en GenBank (número de acceso GenBank GCA_009932455.1). Se usó el programa informático Clustal Omega para llevar a cabo los alineamientos de las secuencias de proteínas, y el programa MUSCLE para estimar las distancias filogenéticas entre las secuencias de proteínas de las distintas cepas, manteniendo los parámetros por defecto. Se diseñaron los cebadores *IRC7-TOR-F* e *IRC7-TOR-R*, con la secuencia ortóloga a los cebadores PF6 y PR7 (Roncoroni *et al.*, 2011), para la amplificación por PCR de la región 3' del gen *IRC7* en el genoma de *T. delbrueckii* de las siguientes cepas procedentes de la colección CYC: NS-G-9, NS-G-27, NS-G-46, NS-G-62, NS-G-66, NS-G-71, NS-G-72 y NS-PDC-169. Además, se usó la cepa *S. cerevisiae* S-EM-10 como cepa control heterocigota para el gen *IRC7* para la correcta visualización de las bandas de electroforesis correspondientes a ambos alelos. Por último, y para comprobar la especificidad de los cebadores, se procedió a la amplificación de la región 3' del gen *IRC7* de la cepa de *S. cerevisiae* S-EM-10 con la pareja de cebadores *IRC7-TOR-F* e *IRC7-TOR-R*, no observándose amplificación. Para la amplificación de la región polimórfica de *IRC7* en *T. delbrueckii* se utilizó el siguiente programa de PCR: desnaturalización inicial: 2 minutos a 94 °C; 35 ciclos de amplificación (desnaturalización: 15 segundos a 94 °C; hibridación: 30 segundos a 57 °C; elongación: 60 segundos a 72 °C); elongación final: 5 minutos a 72 °C; refrigeración: 10 °C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis de la misma manera que los productos de amplificación de los genes de *S. cerevisiae*.

CAPÍTULO 2 – Material y Métodos

4.2.4 Vinificaciones y cinéticas de crecimiento

Se realizaron los siguientes ensayos de fermentación por triplicado: 1) Inoculación de *S. cerevisiae* Viniferm Diana (ScD); 2) Inoculación de *S. cerevisiae* Viniferm Revelación (ScR); 3) Inoculación secuencial de *M. pulcherrima* NS-EM-34 seguida de *S. cerevisiae* Viniferm Diana (MP...ScD); 4) Inoculación secuencial de *M. pulcherrima* NS-EM-34 seguida de *S. cerevisiae* Viniferm Revelación (MP...ScR); 5) Inoculación secuencial de *T. delbrueckii* NS-TD seguida de *S. cerevisiae* Viniferm Diana (TD...ScD); 6) Inoculación secuencial de *T. delbrueckii* NS-TD seguida de *S. cerevisiae* Viniferm Revelación (TD...ScR). En los ensayos de fermentaciones secuenciales, el inóculo de la correspondiente cepa de *S. cerevisiae* fue incorporado tras determinar un descenso de 15 g/L en la densidad inicial del mosto, asegurando una contribución significativa de la cepa no-*Saccharomyces* inoculada inicialmente.

Se realizaron precultivos de todas las cepas en un medio predefinido a base de mosto de uva (12,5% de mosto concentrado (concentración final de glucosa + fructosa de 50 g/L), 1% de extracto de levadura, 0,5% de proteosa peptona n°3, pH 3,5). Este medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Los precultivos se ajustaron para alcanzar una concentración final en el mosto de 10⁶ células/mL para cada cepa (consiguiendo una proporción de 1:1 en el caso de los ensayos de fermentaciones secuenciales). Todas las fermentaciones se prepararon usando el mosto procedente de la variedad Verdejo de *Vitis vinifera* L., con la siguiente composición: 223 g/L de azúcares (glucosa + fructosa), 214 mg/L de nitrógeno asimilable, 189 g/L de ácido málico y pH de 3,31. Se utilizaron botellas de 5L con 3,5L de mosto, dejando suficiente espacio para la emisión de CO₂. Todas las fermentaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 20 °C. Una vez que la fermentación de los azúcares se completó (es decir, se alcanzó una concentración final de glucosa y fructosa por debajo de 4 g/L), se añadió 50 mg/L de SO₂ en forma de metabisulfito potásico (Panreac, España). Después, las fermentaciones se almacenaron durante 7 días a 4 °C, tras los cuales, se embotelló el vino. Las botellas se almacenaron en posición horizontal en una cámara climática TR2V120 (La Sommelière, Francia) a 18 °C y 70% de humedad relativa. Estas condiciones se mantuvieron hasta que se llevó a cabo la evaluación sensorial.

Las cinéticas de crecimiento se monitorizaron mediante la siembra de 50 µL de la dilución apropiada en medio *Sabouraud-Cloranfenicol* (para el recuento total de levaduras) y en medio lisina (Oxoid, Reino Unido) (para el recuento de las levaduras no-

Saccharomyces). Las colonias se contaron tras la incubación de los cultivos a 28 °C durante 48h.

4.2.5 Determinación analítica de compuestos no volátiles

Las concentraciones de azúcares (glucosa+fructosa), Nitrógeno Amino Primario (NAP), amonio, ácido L-málico, ácido L-láctico, ácido acético, ácido pirúvico, acetaldehído, ácido cítrico, glicerol y el índice de etanol fueron determinadas por valoración enzimática y espectrofotometría mediante el uso del Autoanalizador Y15 (Biosystems, España), con los kits adecuados suministrados por el fabricante. El contenido en etanol se determinó utilizando el método de ebullición GAB Microebu (GAB, España). El pH se determinó con un pH-metro *Crison Basic* (Crison, España).

4.2.6 Determinación analítica de compuestos volátiles

Los compuestos aromáticos producidos en la fermentación alcohólica, constituyentes de las distintas familias de aromas fermentativos (alcoholes superiores, ésteres y ácidos grasos volátiles) se determinaron siguiendo el método de Rapp *et al.*, (1994) con las siguientes modificaciones. Para la extracción, se añadió 2g de cloruro de sodio (Carl Roth, Alemania) a 10 mL de la muestra de vino, seguido de 10 µL de la solución del estándar interno (2,6-dimetilhept-5-en-2-ol (1188 µg/L) y cumeno (107 µg/L)), y 100 µL del solvente de extracción (1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano (Kaltron, Alemania)). La mezcla se agitó durante 20 min y después centrifugada durante 8 min a 3000 rpm. La fase orgánica se eliminó y se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Carl Roth, Alemania). Para la cromatografía de gases-espectrometría de masas, se inyectaron 2 µL del extracto en una columna capilar VF-5MS (5% de fenil metil siloxano, Varian, Alemania) de 60 m x 0.32 mm x 1.0 µm instalada en un cromatógrafo de gas (Hewlett Packard 5890 Serie II) equipado con un sistema de inyección refrigerado CIS 3 (Gerstel, Alemania) que funciona en modo sin división (temperatura inicial 30 °C, velocidad de 12 °C/s hasta 230 °C, mantenido durante 4 minutos). Se usó helio como gas portador a una velocidad de flujo constante (1,0 ml/min). La temperatura del cromatógrafo de gases se programó de 40 °C (5 min) a 125 °C a una velocidad de 3 °C/min y luego hasta 200 °C a una velocidad de 6 °C / min (14,2 min). Se utilizó un detector selectivo de masas (Hewlett Packard 5972) que funciona en modo de impacto de electrones para la detección (temperatura de 180 °C) en modo de exploración (rango de exploración: masa 35 a masa 250; 3,43 exploraciones/s).

CAPÍTULO 2 – Material y Métodos

La cuantificación de tioles volátiles se llevó a cabo mediante el método descrito por Ferreira *et al.* (2007), optimizado por Kapaklis (2014), usando un cromatógrafo de gases Agilent 6890 N (Agilent, EE. UU.), equipado con un sistema de inyección refrigerado CIS4 (Gerstel, Alemania) y acoplado a un detector selectivo de masas MS 5975C (Agilent). La separación se realizó usando una columna capilar BP200 (SGE, Australia) con las dimensiones 50m x 0.22 mm ID x 0,25 μm (grosor de película). Antes de la extracción, se añadió una solución del estándar interno (4-metoxi-2-metilbutano-2-tiol) a 50 ml de muestra de vino para lograr una concentración de 200 ng/L. Posteriormente, los tioles volátiles se extrajeron selectivamente del vino por combinación reversible del tiol a p-hidroximercuribenzoato sódico, según lo descrito por Tominaga y Dubourdieu (2006). Se inyectaron 7 μL del extracto resultante en un programa de modo de ventilación con solvente, inicialmente a 30 °C, elevado a 230 °C a 12 °C/s y un tiempo de retención de 30 min, mientras que el flujo de purga fue de 50 mL/min usando helio (Praxair) como gas de purga. La temperatura del horno se estableció inicialmente en 40 °C, manteniendo esta temperatura durante 4 min, y luego la temperatura se incrementó a hasta 200 °C (3° C/min), después hasta 240 °C (15 °C/min) durante 60 min, seguido de 20 min manteniendo la temperatura a 240 °C. Se utilizó helio como gas portador a un caudal constante de 1 mL/min. La temperatura de la interfaz de espectrometría de masas se ajustó a 260 °C y la temperatura de la fuente de iones a 230° C. Los datos de espectrometría de masas se adquirieron en modo de impacto de electrones (energía de colisión 70 eV) en monitorización de iones seleccionados (SIM).

4.2.7 Análisis sensoriales

Los vinos finales fueron analizados sensorialmente a ciegas por un panel de 10 catadores experimentados, miembros del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Madrid. Los miembros del panel evaluaron los vinos por triplicado, usando 20 atributos previamente descritos de acuerdo con la idea de tipicidad de vinos Verdejo, en dos sesiones en días diferentes. Para cada atributo se utilizó una escala de percepción desde 0 (sin percepción del atributo) a 10 (percepción del atributo muy fuerte).

4.2.8 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el *software* R, versión 3.6.3 (R Development Core Team 2013). El Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test de Tukey se aplicaron para comparar las medias en las distintas comparativas.

4.3 Resultados

4.3.1 Cinéticas poblacionales y consumo de azúcares

Observando las cinéticas de consumo de azúcares, las fermentaciones individuales con las cepas de *S. cerevisiae* (ScD y ScR) tardaron 15 días en finalizar el consumo de los azúcares del mosto, mientras que las fermentaciones secuenciales con *M. pulcherrima* (MP...D y MP...R) y *T. delbrueckii* (TD...D y TD...R) tardaron 25 y 20 días, respectivamente (Figura 16). En las fermentaciones secuenciales se observó un ligero consumo de azúcares durante los primeros 4 días de fermentación, atribuible a la actividad de las levaduras no-*Saccharomyces* inoculadas (Figura 16C-F) pero que fue, en todos casos, inferior al consumo mostrado en el mismo periodo por las cepas de *S. cerevisiae* en los correspondientes ensayos de fermentación individuales (Figura 16A-B). Tras la inoculación de la cepa de *S. cerevisiae* en las fermentaciones secuenciales (día 4 de fermentación) se observó un rápido descenso de la concentración de azúcares, hasta su consumo total al final de la fermentación. Sin embargo, las tasas máximas de consumo de azúcares fueron menores en las fermentaciones secuenciales con ambas especies no-*Saccharomyces* que en las fermentaciones individuales.

Teniendo en cuenta las dinámicas poblacionales, las dos fermentaciones individuales de *S. cerevisiae* (ScD y ScR) muestran cinéticas de crecimiento similares, en las que se alcanzó la concentración celular máxima a los 4 días desde la inoculación ($6 \cdot 10^7$ ufc/mL de promedio), y manteniendo la población viable (más de $2 \cdot 10^6$ ufc/mL para las dos cepas) hasta el final de la fermentación. En el caso de las fermentaciones secuenciales, las poblaciones de *M. pulcherrima* NS-EM-34 alcanzaron su concentración celular máxima a los 4 días, coincidiendo con el día en que se inoculó la correspondiente cepa de *S. cerevisiae*, momento a partir del cual se observó un rápido descenso de su población viable, hasta que dejó de detectarse en la fermentación (día 9). En el caso de la población de *T. delbrueckii* NS-TD, pudo observarse el crecimiento de dicha cepa incluso después de la inoculación de la cepa de *S. cerevisiae*, en concreto hasta el día 6 de fermentación, momento en el cual su concentración comenzó a disminuir hasta dejar de ser detectable por cultivo en placa en el día 9 de fermentación (Figura 16).

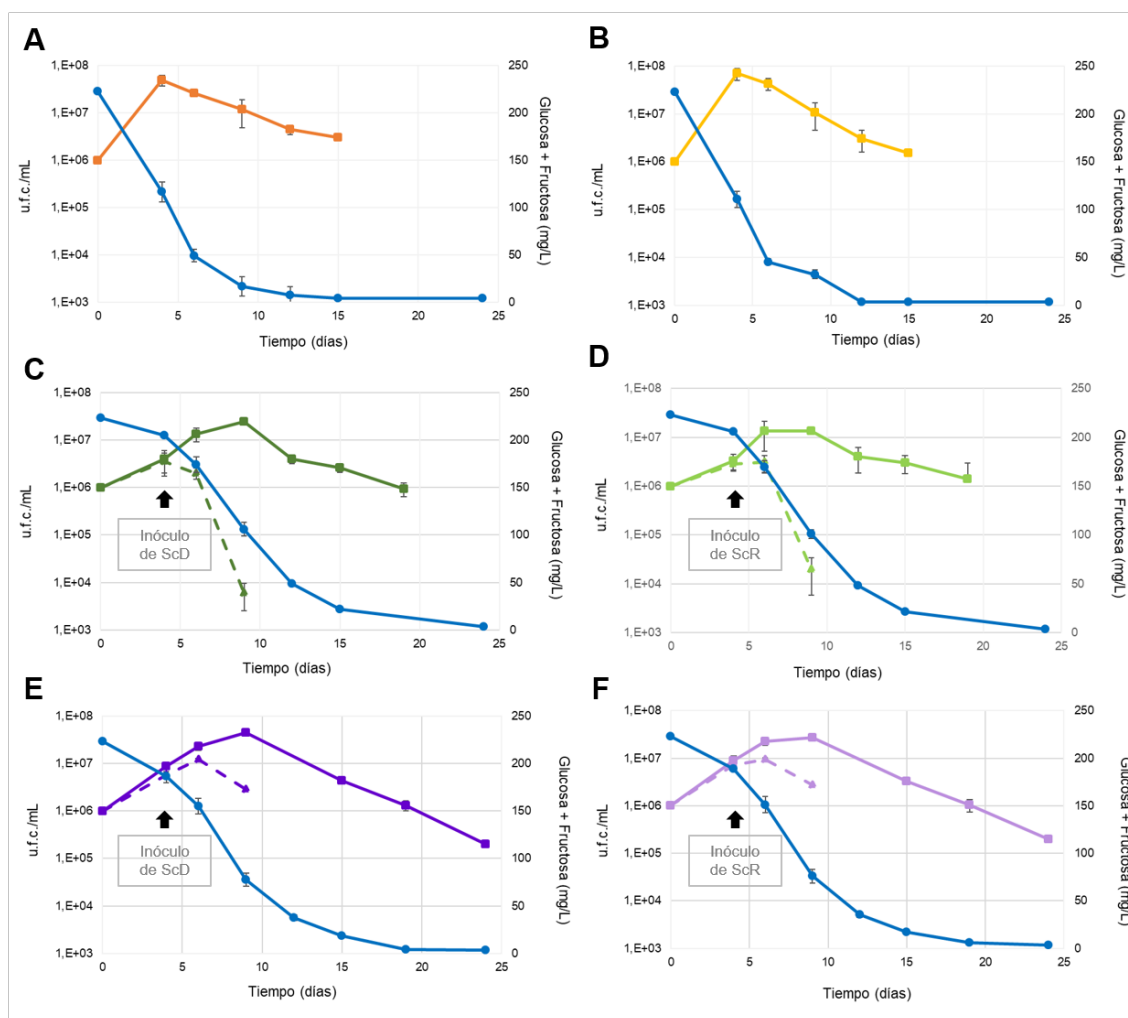


Figura 16: Representación del recuento de levaduras durante los ensayos de fermentación. El consumo de glucosa y fructosa (línea azul) está también representado. El recuento total de levaduras está representado por una línea continua mientras que el recuento de levaduras no-*Saccharomyces* está representado por una línea discontinua. La flecha negra representa el momento de inoculación de la correspondiente cepa de *S. cerevisiae*. u.f.c. (unidades formadoras de colonias). **A)** Fermentación individual de *S. cerevisiae* Viniferm Diana. **B)** Fermentación individual de *S. cerevisiae* Viniferm Revelación (ScR). **C)** Fermentación secuencial llevada a cabo con la inoculación de *M. pulcherrima* NS-EM-34 seguida de la inoculación de *S. cerevisiae* Viniferm Diana después del consumo de 15 g/L de azúcares. **D)** Fermentación secuencial llevada a cabo con la inoculación de *M. pulcherrima* NS-EM-34 seguida de la inoculación de *S. cerevisiae* Viniferm Revelación después del consumo de 15 g/L de azúcares. **E)** Fermentación secuencial llevada a cabo con la inoculación de *T. delbrueckii* Viniferm NS-TD seguida de la inoculación de *S. cerevisiae* Viniferm Diana después del consumo de 15 g/L de azúcares. **F)** Fermentación secuencial llevada a cabo con la inoculación de *T. delbrueckii* Viniferm NS-TD seguida de la inoculación de *S. cerevisiae* Viniferm Revelación después del consumo de 15 g/L de azúcares.

4.3.2 Análisis de metabolitos de interés enológico en el vino

La Tabla 4 muestra la concentración final de diferentes metabolitos representativos de los parámetros enológicos básicos en el vino. Respecto a los azúcares residuales no se observaron diferencias respecto a las fermentaciones individuales y las fermentaciones secuenciales con las dos cepas no-*Saccharomyces*, siendo en todos los ensayos

CAPÍTULO 2 – Resultados

concentraciones inferiores a 4g/L, por lo que se puede considerar que en todos los ensayos se finalizó completamente la fermentación alcohólica. A pesar de ello, sí que se observó un menor contenido en etanol en las fermentaciones secuenciales en las que participaron las cepas no-*Saccharomyces* ($p < 0,05$), con disminuciones promedio de 0,61% (v/v) y de 0,52 % (v/v) en los ensayos con *M. pulcherrima* y con *T. delbrueckii*, respectivamente. Adicionalmente, estas fermentaciones mixtas mostraron concentraciones finales de glicerol mayores que las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae* ($p < 0,05$). Respecto al metabolismo de ácidos orgánicos, no se observó un patrón claro en las fermentaciones secuenciales en las que participaron las cepas no-*Saccharomyces* (tanto en la degradación de ácido málico como en la producción de ácido láctico). Como consecuencia, tampoco se vio afectado el pH final de los vinos.

Tabla 4. Resultados analíticos de los parámetros fermentativos al final de los diferentes ensayos realizados. Los valores para las concentraciones se expresan en g/L salvo indicación expresa.

Compuestos	ScD	ScR	MP...ScD	MP...ScR	TD...ScD	TD...ScR
Ácido L-láctico	0,10 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,03 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	0,16 ± 0,05 ^a	0,17 ± 0,06 ^a
Ácido L-málico	1,83 ± 0,06 ^d	1,60 ± 0,00 ^{ab}	1,62 ± 0,06 ^{ac}	1,51 ± 0,07 ^a	1,77 ± 0,06 ^{cd}	1,67 ± 0,06 ^{bc}
Ácido acético	0,39 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,01 ^{ab}	0,36 ± 0,03 ^{ab}	0,38 ± 0,04 ^{ab}	0,30 ± 0,04 ^a	0,30 ± 0,03 ^a
Glucosa+fructosa	3,27 ± 0,15 ^a	3,57 ± 0,35 ^a	3,45 ± 0,36 ^a	3,66 ± 0,41 ^a	3,70 ± 0,36 ^a	3,73 ± 0,00 ^a
Glicerol	4,76 ± 0,05 ^a	5,00 ± 0,07 ^a	5,48 ± 0,08 ^b	5,52 ± 0,09 ^{bc}	5,73 ± 0,09 ^{cd}	5,78 ± 0,13 ^d
pH	3,36 ± 0,03 ^a	3,33 ± 0,01 ^a	3,36 ± 0,02 ^a	3,35 ± 0,02 ^a	3,35 ± 0,01 ^a	3,38 ± 0,01 ^a
Acetaldehído (mg/L)	54,67 ± 5,13 ^c	47,69 ± 3,79 ^{bc}	39,00 ± 2,11 ^{ab}	37,42 ± 3,28 ^a	34,00 ± 2,00 ^a	32,67 ± 4,16 ^a
Ácido cítrico	0,24 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,03 ^a
Alcohol (% v/v)	13,00 ± 0,01 ^b	12,97 ± 0,06 ^b	12,38 ± 0,05 ^a	12,34 ± 0,04 ^a	12,53 ± 0,06 ^a	12,40 ± 0,00 ^a

Los resultados representan los valores medios de tres replicas junto con la desviación estándar. Las medias en la misma fila con la misma letra indica que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$). **ScD:** Fermentación individual con *S. cerevisiae* Diana (ScD); **ScR:** Fermentación individual con *S. cerevisiae* Revelación; **MP...ScR:** Fermentación secuencial con *M. pulcherrima* NS-EM-34 y *S. cerevisiae* Diana. **MP...ScD:** Fermentación secuencial con *M. pulcherrima* NS-EM-34 y *S. cerevisiae* Revelación. **TD...ScD:** Fermentación secuencial con *T. delbrueckii* NS-TD y *S. cerevisiae* Diana. **TD...ScR:** Fermentación secuencial con *T. delbrueckii* NS-TD y *S. cerevisiae* Revelación.

En el caso del ácido acético se observó una reducción su concentración final en las fermentaciones secuenciales con *T. delbrueckii*, siendo significativa solo en el caso de las fermentaciones con la cepa de *S. cerevisiae* Diana ($p < 0,05$), no así con las de *M. pulcherrima*, con respecto a las fermentaciones individuales con *S. cerevisiae*. La concentración final de acetaldehído en las fermentaciones secuenciales, tanto con *M. pulcherrima* como con *T. delbrueckii*, fue notablemente menor que en el respectivo control de las fermentaciones individuales con *S. cerevisiae*, con descensos respecto a los

respectivos controles ScD y ScR de 20 y 15mg/L en el caso de *T. delbrueckii*, y de 15 y 10 mg/L en el caso de *M. pulcherrima*.

4.3.3 Producción de tioles varietales volátiles

Las cepas de *S. cerevisiae*, en las fermentaciones individuales, produjeron concentraciones de 3SH muy por encima de su umbral de detección (aproximadamente: 60 ng/L). En el caso de su derivado acetilado (3SHA) se alcanzaron concentraciones moderadas, aunque en todo caso por encima de su umbral de detección sensorial (de alrededor de 4 ng/L), y siempre proporcionales a las concentraciones del tioL 3SH. Sin embargo, para el tiol 4MSP, la concentración final fue muy baja en el caso del ensayo ScR (cepa homocigota para el alelo *IRC7^F*) -apenas superando su umbral de detección (alrededor de 1 ng/L)- y no detectable en el ensayo ScD (cepa homocigota para el alelo *IRC7^S* delecionado).

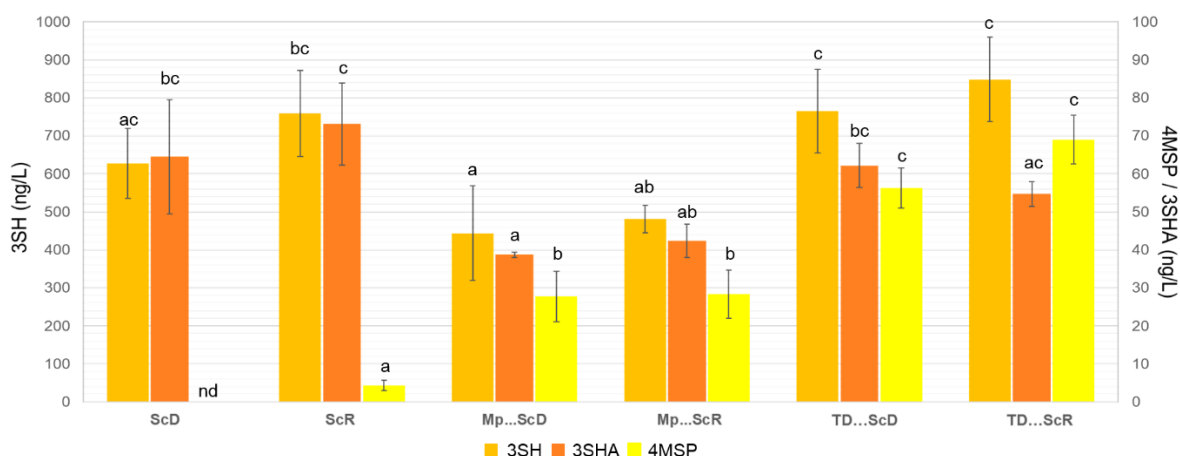


Figura 17: Producción de tioles varietales en los distintos ensayos de fermentación. 3SHA: 3-sulfanilhexil acetato. 3SH: 3-sulfanilhexan-1-ol. 4MPS: 4-sulfanilpentan-2-ona. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los ensayos para cada tiol analizado.

Respecto a las fermentaciones secuenciales, se observó un efecto destacado de ambas cepas no-*Saccharomyces* en la concentración de los distintos tioles aromáticos. En primer lugar, las fermentaciones en las que participó *M. pulcherrima* mostraron menores concentraciones finales de 3SH y 3SHA comparadas con las fermentaciones control de *S. cerevisiae* (Figura 17), aunque en todos los ensayos se superaron los umbrales de detección para estos compuestos. A pesar de ello, el mayor efecto de *M. pulcherrima* se observó en la concentración de 4MSP, alcanzándose concentraciones más de 6 veces superiores a la concentración de 4MSP producida en el ensayo ScR (puesto que en el

CAPÍTULO 2 – Resultados

ensayo ScD, como era esperable debido al genotipo *IRC7^S* de la cepa *S. cerevisiae* Diana, no se detectó 4MSP). En el caso de *T. delbrueckii* sí se observó un incremento significativo para el tiol 3SH (no así para su derivado acetilado, el 3SHA) con respecto a las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae*. Además, al igual que en el caso de *M. pulcherrima*, se observó un incremento para 4MSP en las fermentaciones secuenciales con *T. delbrueckii*, siendo en este caso un incremento de más de 15 veces respecto al ensayo ScR. Contrariamente a las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae*, las fermentaciones en las que participó *M. pulcherrima*, alcanzando una concentración de 4MSP media de 28 ng/L. Sin embargo, cabe destacar el incremento en las concentraciones de 4MSP en las fermentaciones secuenciales con la cepa *T. delbrueckii* NS-TD, en las que se alcanzaron concentraciones medias por encima de 60 ng/L.

4.3.4 Compuestos volátiles mayoritarios producidos durante la fermentación

La concentración final de las principales familias de compuestos volátiles en los diferentes ensayos de fermentación está representada en la Figura 18 (los valores detallados de cada uno de los compuestos volátiles están indicados en la Tabla 5). Aunque se observan algunas diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas de *S. cerevisiae* estudiadas, a nivel global cabe destacar la menor producción de alcoholes superiores observada en las fermentaciones secuenciales en las que participaron las dos especies no-*Saccharomyces* ($p < 0,05$); con disminuciones respecto a los respectivos controles ScD y ScR de 77 y 67 mg/L en el caso de *M. pulcherrima*, y de 66 y 58 mg/L en el caso de *T. delbrueckii*, respectivamente. Destacan especialmente las fermentaciones en las que participó *M. pulcherrima*, con un descenso en la concentración de todos los alcoholes superiores analizados, con la excepción del 2-feniletanol (que puede aportar al vino aromas a rosas) para el cual se observó un incremento significativo ($p < 0,05$). Destacan así los descensos en las concentraciones de 3-metil-2-butanol y hexan-1-ol con reducciones respecto a las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae*, siendo de 2 y 3 veces, respectivamente.

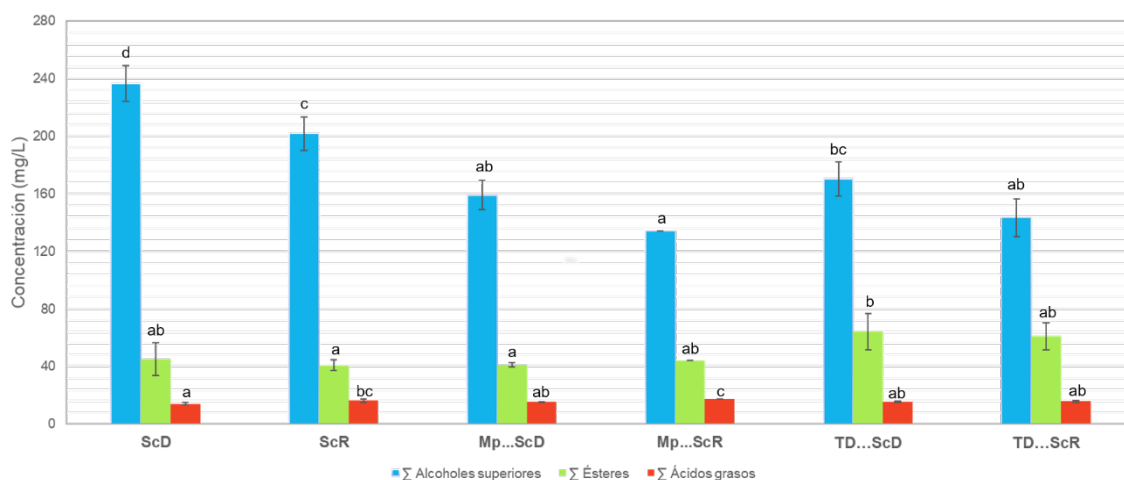


Figura 18: Grupos de compuestos aromáticos mayoritarios analizados al final de los distintos ensayos de fermentación. Las letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los ensayos para cada parámetro analizado.

En el caso de los ésteres, las fermentaciones secuenciales con *M. pulcherrima* mostraron concentraciones ligeramente menores de éstos, con la excepción del 2-feniletil acetato (en concordancia con las concentraciones descritas para el 2-fenil etanol). Por el contrario, *T. delbrueckii* sí mostró un incremento significativo en la concentración total de ésteres ($p < 0,05$) (Figura 18). Además del incremento en la concentración del acetato de etilo -en todos los casos por debajo de los 90 mg/L, concentración a partir de la cual puede tener un impacto aromático negativo- se observó un destacado incremento en la concentración de ésteres que pueden tener un impacto positivo, como el acetato de feniletilo (derivado de su precursor, el 2-feniletanol) relacionado con aromas a miel-rosas (Tabla 5).

Respecto a la concentración de ácidos grasos volátiles al final de las fermentaciones secuenciales, aunque se observa un ligero incremento en su concentración total en el caso de los ensayos de *M. pulcherrima*, no hubo diferencias significativas respecto a las fermentaciones individuales con *S. cerevisiae*. Sí se observaron ligeros incrementos en la concentración de algunos ácidos grasos en las fermentaciones secuenciales, como el ácido octanoico con *M. pulcherrima* y el ácido decanoico con *T. delbrueckii*, que pueden aportar aromas céreos no deseables en el vino.

CAPÍTULO 2 – Resultados

Tabla 5: Concentración de los principales compuestos volátiles (mg/L) detectados al final de los ensayos de fermentación.

Compuestos	ScD	ScR	MP...ScD	MP...ScR	TD...ScD	TD...ScR
i-Butanol	29,13±4,21 ^b	24,17±1,23 ^{ab}	22,21±1,16 ^a	20,61±0,00 ^a	22,31±1,71 ^a	19,68±1,49 ^a
3-Metil-2-butanol	163,85±5,20 ^c	142,19±8,66 ^d	96,45±5,34 ^{bc}	77,43±0,00 ^a	105,02±7,13 ^c	87,45±7,72 ^{ab}
2-Metil-1-butanol	23,80±0,48 ^c	19,69±1,21 ^{cd}	18,01±0,87 ^{bc}	14,57±0,00 ^a	21,21±1,74 ^{de}	16,55±1,28 ^{ab}
Hexan-1-ol	1,93±0,74 ^b	1,51±0,53 ^{ab}	0,60±0,03 ^a	0,61±0,00 ^a	0,64±0,03 ^a	0,60±0,01 ^a
2-Feniletanol	17,84±1,75 ^{ab}	14,24±0,09 ^a	21,92±0,09 ^b	21,02±0,00 ^b	21,34±1,50 ^b	19,17±2,63 ^b
∑ Alcoholes superiores	236,55±9,61^d	201,79±11,28^c	159,19±10,00^{ab}	134,24±0,00^a	170,52±11,84^{bc}	143,45±13,13^{ab}
Etanoato de etilo	41,71±11,14 ^a	36,71±3,41 ^a	37,64±1,36 ^a	40,35±0,00 ^a	58,28±12,94 ^a	55,24±9,34 ^a
Etil propanoato	0,08±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a	0,07±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,17±0,00 ^b	0,18±0,02 ^b
Metil butanoato	0,02±0,00 ^a	nq	nd	nd	0,04±0,00 ^b	0,03±0,00 ^b
Etil butanoato	0,15±0,03 ^a	0,19±0,01 ^a	0,18±0,01 ^a	0,20±0,00 ^a	0,29±0,03 ^b	0,33±0,02 ^b
3-metilbutil acetato	1,33±0,25 ^a	1,42±0,20 ^{ab}	1,15±0,00 ^a	1,13±0,00 ^a	2,28±0,15 ^c	1,86±0,06 ^b
2-metilbutil acetato	0,07±0,00 ^a	0,06±0,00 ^a	0,06±0,06 ^a	0,06±0,00 ^a	0,10±0,02 ^b	0,07±0,00 ^a
Hexanoato de etilo	0,53±0,01 ^a	0,67±0,03 ^{cd}	0,57±0,02 ^{ab}	0,66±0,00 ^{bcd}	0,60±0,02 ^{ac}	0,68±0,01 ^d
Acetato de 2-etilhexilo	0,11±0,03 ^{ab}	0,13±0,01 ^b	0,08±0,01 ^a	0,09±0,00 ^a	0,13±0,01 ^b	0,12±0,00 ^{ab}
Ácido octanoico - etil éster	0,84±0,03 ^a	1,07±0,03 ^c	0,90±0,03 ^{ab}	1,01±0,00 ^c	0,87±0,03 ^a	0,99±0,07 ^{bc}
Acetato de feniletilo	0,21±0,03 ^a	0,21±0,02 ^a	0,34±0,04 ^a	0,40±0,00 ^a	1,11±0,25 ^b	1,06±0,51 ^b
Ácido decanoico - etil éster	0,20±0,02 ^a	0,31±0,01 ^b	0,27±0,01 ^b	0,25±0,00 ^b	0,35±0,02 ^c	0,39±0,02 ^c
∑ Ésteres	45,28±11,44^{ab}	40,85±3,15^a	41,26±1,49^a	44,21±0,00^{ab}	64,21±12,64^b	60,94±9,40^{ab}
Ácido hexanoico	1,65±0,02 ^a	1,63±0,03 ^{ab}	1,52±0,00 ^a	1,49±0,00 ^b	1,49±0,02 ^{ab}	1,45±0,02 ^{ab}
Ácido pentanoico	7,0±0,18 ^c	7,7±0,47 ^c	7,09±0,12 ^b	8,05±0,00 ^{ab}	7,4±0,28 ^{ab}	7,5±0,20 ^a
Ácido octanoico	4,84±0,35 ^a	5,86±0,36 ^b	5,55±0,18 ^{ab}	6,83±0,00 ^c	5,15±0,04 ^{ab}	5,38±0,47 ^{ab}
Ácido decanoico	0,68±0,10 ^a	1,10±0,29 ^b	1,09±0,06 ^a	1,16±0,00 ^b	1,45±0,05 ^b	1,39±0,05 ^b
∑ Ácidos grasos	14,21±0,62^a	16,27±1,14^{bc}	15,26±0,36^{ab}	17,53±0,00^c	15,47±0,39^{ab}	15,74±0,69^{ab}
3SH	626,87±92,15 ^{ac}	758,73±113,56 ^{bc}	444,08±124,58 ^a	480,90±35,96 ^{ab}	764,69±110,61 ^c	848,58±110,40 ^c
3SHA	64,50±14,99 ^{bc}	73,16±10,80 ^c	38,71±0,68 ^a	42,39±4,35 ^{ab}	62,19±5,83 ^{bc}	54,68±3,25 ^{ac}
4MPS	nd	4,36±1,37 ^a	27,76±6,62 ^b	28,32±6,30 ^b	56,26±5,26 ^c	68,97±6,39 ^c
∑ Tioles	691,37±107,14^{ac}	836,25±125,73^{bc}	510,55±131,88^a	551,61±46,61^{ab}	883,14±121,70^c	972,23±120,04^c

Los resultados representan los valores medios de tres replicados junto con la desviación estándar. Las medias en la misma fila con la misma letra indica que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$). nc: cantidades traza no cuantificables. nd: cantidades no detectadas.

4.3.5 Análisis sensorial

Los vinos resultantes de las fermentaciones secuenciales con ambas cepas no-*Saccharomyces* fueron mejor valorados a nivel sensorial por el panel de expertos, con respecto a los vinos obtenidos de las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae* (Figura 19). En los vinos en los que participó *T. delbrueckii*, el panel de cata percibió una mayor calidad e intensidad aromática y un carácter afrutado. Este efecto puede relacionarse con el gran incremento en la concentración de tioles varietales en estos ensayos, junto con un incremento en la concentración de 2-fenil acetato (aroma a miel-rosas).

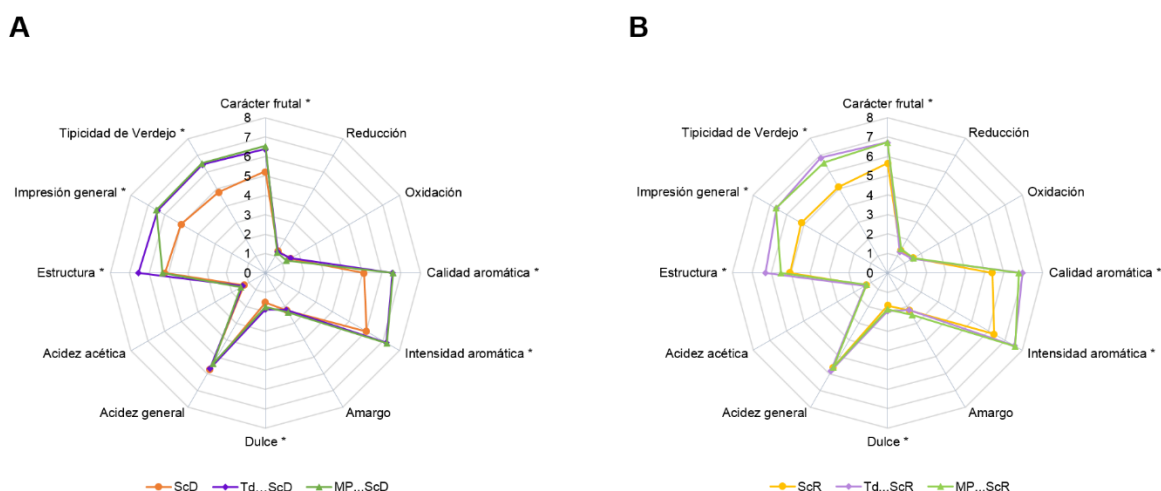


Figura 19: Puntuación de los atributos de sabor y aroma en los vinos procedentes de los ensayos de fermentación. **A)** Fermentaciones individuales y secuenciales con las dos cepas no-*Saccharomyces* con la cepas de *S. cerevisiae* Viniform Diana (ScD). **B)** Fermentaciones individuales y secuenciales con las dos cepas no-*Saccharomyces* con la cepas de *S. cerevisiae* Viniform Revelación (ScR). Los asteriscos indican aquellos atributos de los ensayos de fermentación secuencial que muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a los valores de las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae*.

Por su parte, los vinos en los que participó *M. pulcherrima* también mostraron un mayor carácter afrutado, y por tanto un efecto en la tipicidad de la variedad Verdejo. Aunque, en este caso, el incremento en la concentración de tioles fue moderado (solo destacable para 4MSP), la menor concentración de alcoholes superiores puede influir de forma notable en la mayor percepción del aroma varietal en este tipo de vinos.

4.3.6 Genotipo IRC7 en las cepas no-*Saccharomyces*

Como aproximación preliminar para entender las bases genéticas de la contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas en la producción de tioles, se buscaron las secuencias homólogas del gen *IRC7* en los genomas de *T. delbrueckii* y *M. pulcherrima* disponibles en la base de datos GenBank de NCBI. Aunque no se encontraron secuencias

ITdR), se observó que el alelo *IRC7^F*, al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, es el único alelo presente en esta especie (Figura 21), confirmando la hipótesis sugerida en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral respecto al origen del alelo *IRC7^S* asociado a la domesticación de cepas de *S. cerevisiae*.

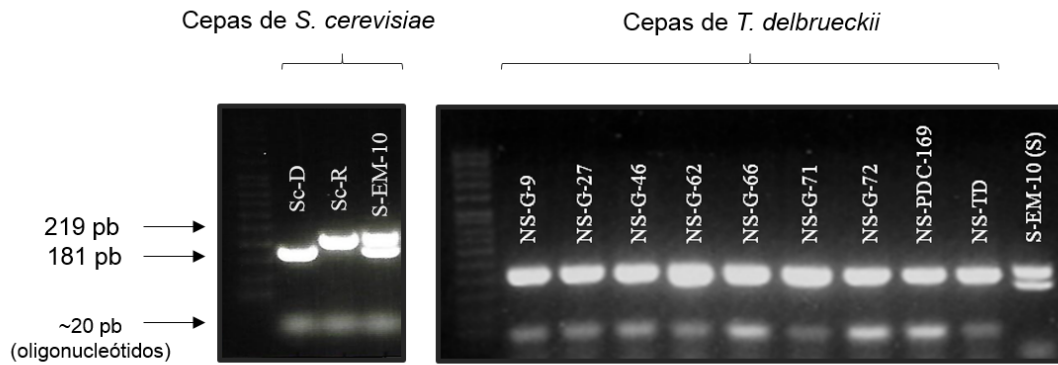


Figura 21: Productos de la amplificación por PCR de la región polimórfica del gen *IRC7* en las cepas de *S. cerevisiae* (izquierda). La cepa Diana (Sc-D) aparece como homocigota para el alelo *IRC7^S*, la cepa Revelación (Sc-R) aparece como homocigota para el alelo *IRC7^F* y la cepa S-EM-10(S) aparece como heterocigota para ambos alelos. En la derecha aparecen los productos de amplificación por PCR de la región polimórfica del gen ortólogo a *IRC7* en 9 cepas de *T. delbrueckii*, utilizando la cepa de *S. cerevisiae* S-EM-10(S) como control heterocigoto.

5 CAPÍTULO 3:

Efecto de la interacción interespecífica entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii* bajo dos condiciones de nutrición nitrogenada en fermentación vínica

5.1 Planteamiento

Durante la fermentación alcohólica, la adición de fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables por las levaduras, como las sales de amonio, permite asegurar una cinética de fermentación adecuada. Sin embargo, esta práctica tiene un notable efecto en la producción de compuestos aromáticos, ya que el amonio reprime ciertas rutas metabólicas relacionadas con la asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno, como aminoácidos o péptidos pequeños. Por ello, es importante el estudio del efecto del uso de nutrientes nitrogenados en las levaduras, y como afecta a la calidad organoléptica del vino. Sin embargo, este efecto no debe ser considerado exclusivamente en el contexto del metabolismo de una sola especie, ya que, en las fermentaciones vínicas, incluso en aquellas inoculadas con cepas seleccionadas, existe una gran diversidad de levaduras que contribuyen al perfil sensorial de los vinos resultantes. De hecho, como ya se ha explorado en el capítulo 2 de esta Tesis doctoral, la co-inoculación de *S. cerevisiae* con cepas seleccionadas de especies no-*Saccharomyces*, es una estrategia válida para la mejora de la calidad de los vinos, en concreto, a través de la modulación en la producción de ciertos compuestos aromáticos. En este contexto, el estudio recogido en este capítulo 3 pretende comprender la respuesta (fenotípica y transcripcional) de *S. cerevisiae* a elevadas concentraciones de amonio durante la fermentación vínica, y cómo esta respuesta puede verse modulada por la interacción con *T. delbrueckii*. Para ello, se realizaron fermentaciones individuales y mixtas en mosto sintético de uva bajo dos condiciones extremas de nitrógeno (67 mg N/L y 670 mg N/L), y se analizó el impacto del amonio a nivel fenotípico (incluyendo el estudio de la composición química del vino) y transcripcional.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Cepas de levadura y medios de cultivo

La cepa de *S. cerevisiae* Viniferm AG023 y la cepa de *T. delbrueckii* Viniferm NS-TD fueron cedidas por Agrovin S.A. (España). Para el mantenimiento rutinario de las cepas se empleó el medio *Sabouraud-Cloranfenicol* (Oxoid, Reino Unido).

5.2.2 Fermentaciones a escala de laboratorio

Los ensayos de fermentaciones se llevaron a cabo en mosto de uva sintético, siguiendo el protocolo de preparación descrito por Henschke y Jiranek (1993), con algunas modificaciones en referencia contenido en nitrógeno (fuente y concentración), y la adición de un conjunto de precursores varietales (en una concentración total de 1,2 mg/L). Se prepararon dos tipos de medio mosto sintético, estableciendo dos condiciones respecto al contenido en nitrógeno usando $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como única fuente de nitrógeno a concentración final en el mosto de 670 mg N/L (alta concentración -HN-) y 67 mg N/L (baja concentración -LN-). El mosto se esterilizó por filtración, usando filtros de nitrocelulosa de 0,45 μm .

Los precultivos se llevaron a cabo en 150 mL de Medio Sintético (*Yeast Nitrogen Base* 0.17% (Difco) y glucosa 2%) en botellas de 250 mL. Tras un precultivo de 24h, a 28°C y en agitación orbital (120 rpm), se ajustaron por densidad óptica ($\lambda_{600\text{nm}}$) los correspondientes inóculos de ambas especies para alcanzar una concentración final de $2 \cdot 10^6$ células/mL. Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado en botellas de 250 mL conteniendo 225 mL de mosto sintético. Las botellas fueron provistas de sistemas *air-lock* para permitir, manteniendo las condiciones de esterilidad, la salida del CO_2 producido y la toma de muestras. Las fermentaciones se realizaron a 20°C con agitación orbital a 120 rpm. Antes de cada muestreo se usó agitación magnética, durante un minuto, para homogenizar la muestra. Para el recuento de levaduras se tomaron muestras de 100 μL cada 24h. Para el análisis de secuenciación de ARN (RNA-seq) se tomó una muestra de 2 mL de cultivo a las 36h de la inoculación de levaduras.

Se ensayaron fermentaciones individuales de la cepa de *S. cerevisiae* Viniferm Revelación (Sc) y fermentaciones mixtas con la cepa de *T. delbrueckii* Viniferm NS-TD (ScTd) en una proporción de 1:1, para asegurar la interacción de ambas levaduras desde las primeras etapas de la fermentación. También se llevaron a cabo fermentaciones

individuales con la cepa de *T. delbrueckii* NS-TD (Td) como control de la influencia directa de dicha especie en la fermentación mixta. Los ensayos se llevaron a cabo en las dos condiciones de nitrógeno previamente mencionadas (HN y LN). Así, se realizaron seis ensayos diferentes: Sc-HN, Sc-LN, ScTd-HN, ScTd-LN, Td-HN y Td-LN. Las concentraciones celulares de las poblaciones fueron monitorizadas mediante la siembra de 50 μ L de la dilución apropiada en placas del medio *Sabouraud-Cloranfenicol* (Oxoid, UK) incubadas a 28°C para el recuento total de células viables (*S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*) y, en paralelo a 37 °C para el recuento específico de células de *S. cerevisiae*, ya que esta temperatura es restrictiva para el crecimiento de *T. delbrueckii* (Tronchoni *et al.*, 2017). Las cinéticas de fermentación fueron monitorizadas mediante la medida de la pérdida de peso a lo largo del tiempo. Se estimó el final de las fermentaciones cuando la caída de peso fue inferior a 0,01g al día. Una vez finalizadas las fermentaciones, los cultivos fueron centrifugados a 7.000 rpm durante 10 min. Después, los sobrenadantes (vinos resultantes) fueron tratados con 0,1 g/L de metabisulfito sódico y almacenados en botellas de cristal opacas a -20 °C hasta su posterior análisis. Para evitar la oxidación de los vinos, el aire del espacio de cabeza fue remplazado con CO₂ antes de su congelación.

5.2.3 Determinación analítica de compuestos no volátiles

Para la monitorización y el análisis final de la concentración de ácidos orgánicos, etanol y azúcares residuales se tomaron muestras (2 mL) a distintos tiempos durante la fermentación (0h, 24h, 100h y tiempo final), y se centrifugaron a 7.000 rpm durante 10 min para eliminar la biomasa. Los sobrenadantes fueron congelados a -20°C hasta su análisis. Estas valoraciones se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) siguiendo el protocolo descrito por Schneider *et al.* (1987), con las modificaciones descritas por Dutraive *et al.* (2019). Se empleó el sistema 1100 Series (Agilent Technologies, EE. UU.) equipado con una columna Allure para ácidos orgánicos (250 mm \times 4,6 mm I.D., tamaño de fibra de 5 μ m, y tamaño de poro de 60 Å) (Restek GmbH, Alemania), precedido por una pre-columna de 4 mm x 3,0 I.D. Security Guard C18™ (Phenomenex, Alemania). Se usaron como sistema de detección un detector de índice refractivo (RID) y un detector de longitud de onda múltiple (MWD). El contenido en amonio se valoró a partir de las muestras 0h, 24h, 48h, 76h, 170h y tiempo final, usando el *Ammonia Assay Kit* (Megazyme International, Irlanda), siguiendo las especificaciones del fabricante y usando un espectrofotómetro UV-visible Evolution 200 (Thermo

CAPÍTULO 3 – Material y Métodos

Scientific, EE. UU.). Las tasas de consumo de amonio fueron calculadas usando la mayor pendiente de la curva de consumo de amonio.

5.2.4 Determinación analítica de compuestos volátiles

Se determinó la concentración final de los principales aromas fermentativos producidos por las levaduras durante la fermentación mediante cromatografía de gases - espectrometría de masas (GS-MS), siguiendo el método descrito por Rapp *et al.* (1994), con las modificaciones descritas por Belda *et al.* (2017c). Para la extracción, a 10 mL de la muestra de vino se les añadieron 2 g de cloruro sódico, 10 μ L de la solución del estándar interno y 160 μ L de 1,1,2-tricloro-trifluoroetano. Después de 20 min de agitación, se centrifugó la mezcla durante 8 min a 3.000 rpm. Después, se eliminó la fase orgánica y se secó la muestra usando sulfato sódico anhidro. Se inyectaron 2 μ L del extracto en una columna capilar VF-5MS de 60 m x 0,32 mm x 1.0 μ m (Varian, Alemania) montada en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II, equipado con un sistema de inyección en frío CIS 3 (Gerstel, Alemania), en modo *splitless* (30 °C a 230 °C (12 °C/s), mantenido durante 4 min). Se usó helio como gas portador (a un flujo de 1,0 mL/min). La temperatura del cromatógrafo de gases se programó desde 40 °C (5 min) a 125 °C (3 °/min), y después, hasta 200°C (6 °C/min), manteniéndose durante 14,2 min. Para la detección, se usó un detector selectivo de masa Hewlett Packard 5972 (temperatura del espectrómetro de masas de 180°C), en modo de escaneo (de 35 a 250 escaneos; 3,43 escaneos/s).

5.2.5 Extracción y secuenciación de ARN

Las muestras de células para el análisis RNA-seq se tomaron a las 36h en las fermentaciones Sc y ScTd. Tras homogeneizar el contenido en las fermentaciones, se tomaron muestras de 2 mL que fueron centrifugadas a 7.000 rpm durante 5 min a 20°C. Se descartó el sobrenadante y la biomasa se congeló rápidamente usando nitrógeno líquido, y fue mantenida a -80 °C hasta la extracción del ARN. Se extrajo el ARN total usando el kit comercial NZT Total RNA Isolation (NZYTech, Portugal). El equipo Fragment Analyzer (AATI, EE.UU.) se usó para determinar la calidad del ARN extraído y el equipo Qubit (ThermoFisher, EE.UU.) se usó para calcular su concentración. El número de integridad de ARN (RIN) fue superior a 6,5 en todas las muestras.

La preparación y la secuenciación de las librerías de ARN se llevó a cabo en la Plataforma de Genómica y Bioinformática, Centro de Investigación Biomédica de La

Rioja (CIBIR). La secuenciación de las librerías se preparó siguiendo el kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina, EE.UU.) a partir de 1 µg de ARN de cada muestra (tres réplicas de cada condición experimental). Los fragmentos *paired-end* se secuenciaron en la plataforma de secuenciación Illumina HiSeq2500 (2x100 pb) (Illumina, EE.UU.). Los datos sin procesar (*raw reads*) de la secuenciación de ARN se depositaron en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (BioProject PRJNA642092). Después de la secuenciación del ARN, la calidad de las lecturas se analizó usando el programa FastQC (Andrews, 2010). Estas lecturas sin procesar se filtraron eliminando aquellas con un índice de calidad de Phred mayor o igual a 25. Los adaptadores se eliminaron con el software TrimGalore (Kreuger, 2012). Después de este proceso las muestras de RNA-seq contenían entre 17 y 20 millones de lecturas totales. Estas lecturas se alinearon frente a los genomas de referencia (*S. cerevisiae* S288C, número de acceso de GenBank: GCA_000146045.2 y *T. delbrueckii* CBS1146, número de acceso de GenBank: GCF_000243375.1) usando el programa HISAT2 (Kim *et al.*, 2015) con los parámetros establecidos por defecto. Se analizó la calidad de los alineamientos resultantes con el programa Qualimap2 (Okonechnikov *et al.*, 2016). Las lecturas del ensayo Sc no alineadas al genoma de referencia de S288c fueron menos del 4% del total. Las lecturas del ensayo ScTd no alineadas frente a los genomas de referencia (S288c y CBS1446) fueron también menos del 4% del total. Después del alineamiento, se realizó el recuento de lecturas por cada gen con el programa FeatureCounts (Liao *et al.*, 2014), eliminando los recuentos de menos de 2 lecturas asignadas por gen. Después, se normalizaron las muestras fueron normalizadas siguiendo el protocolo DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Los valores de expresión fueron normalizados mediante la transformación regularizada log₂ (rlog).

Los análisis de expresión diferencial se realizaron estableciendo las siguientes comparativas: Sc-HN vs Sc-LN; ScTd-HN vs ScTd-LN; ScTd-HN vs Sc-HN y ScTd-LN vs Sc-LN. Para controlar la tasa de descubrimientos falso (FDR), los p-valores fueron ajustados mediante el método propuesto por Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995). Aquellos genes con una ratio de expresión log₂ mayor de 1 y menos que -1, y con un p-valor ajustado menor que 0,05, fueron considerados como genes diferencialmente expresados (DEGs). Los DEGs se agruparon en categorías génicas usando las bases de datos de *Gene Ontology* (GO) y de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Para ello, se emplearon las herramientas *clusterProfiler/enrichGO*

CAPÍTULO 3 – Material y Métodos

(Yu *et al.*, 2012) y *clusterProfiler/enrichKEGG* (Yu *et al.*, 2012), respectivamente (corte de 0,05 de q-valor, para ambas).

5.2.6 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete *stats* del programa R, versión 3.6.3 (R Development Core Team, 2013). El Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test *post-hoc* de Tukey fueron aplicados para comparar las medias de los parámetros de los distintos ensayos. El Análisis de Componentes Principales (PCA) se realizó con los datos de producción de metabolitos y los datos de expresión génica normalizados del RNA-seq, para ver la agrupación de las muestras en cada condición experimental. Los DEGs comunes y diferentes entre las comparativas fueron representados mediante diagramas de Venn. Se utilizó el método de distancias euclidianas para calcular las distancias entre los grupos experimentales en el PCA.

5.3 Resultados

5.3.1 Dinámicas poblacionales y cinéticas de fermentación

La Figura 22 muestra las dinámicas de las poblaciones de levaduras y las cinéticas de fermentación de los diferentes ensayos realizados. En los ensayos LN se observó el agotamiento del amonio en las primeras etapas de la fermentación (antes de las 36 primeras horas), mientras que los ensayos HN mantuvieron altas concentraciones de amonio hasta el final de la fermentación. De esta forma se pudo comparar las condiciones de agotamiento de nitrógeno (en los ensayos LN) y las condiciones de alta concentración de amonio (HN), representando dos condiciones extremas de disponibilidad de nitrógeno. Observando las cinéticas fermentativas en los ensayos HN, el amonio disponible permitió llevar a término la fermentación en ambas especies, hasta el consumo completo de los azúcares del mosto. Por otro lado, el rápido agotamiento del amonio en las fermentaciones LN afectó notablemente el crecimiento de las levaduras y el rendimiento de las fermentaciones a partir de las 36 horas hasta el final del proceso. Respecto a las diferencias entre las distintas estrategias de inoculación, en los ensayos ScTd, aunque las cinéticas de pérdida de peso fueron similares a los ensayos Sc, tanto las poblaciones de *T. delbrueckii* como de *S. cerevisiae* mostraron valores máximos de densidad celular menores, comparados con los respectivos cultivos puros. Cabe destacar las cinéticas fermentativas de *T. delbrueckii*, en las que se observó un mayor crecimiento poblacional y una mayor tasa de pérdida de peso.

Las cinéticas de consumo de amonio en las fermentaciones HN muestran que *S. cerevisiae* (Sc) consumió 235 mg/L de amonio, mientras que en la fermentación de *T. delbrueckii* (Td) el consumo total de amonio fue de 350 mg/L de amonio (Tabla 6), relacionado con una mayor tasa de caída de peso (Figura 22F). Este destacado consumo de amonio por parte de *T. delbrueckii* no supuso un efecto significativo en el consumo de amonio en los cultivos mixtos (Figure 22C), tanto a las 36 horas como a tiempo final (mostrando un contenido de amonio similar al cultivo individual de *S. cerevisiae*).

Por último, la co-inoculación de levaduras pareció tener un efecto en el impacto de la condición de nitrógeno, tanto en las dinámicas poblacionales como en las cinéticas fermentativas. En los ensayos individuales Sc y Td, la densidad celular máxima fue 1,80 y 1,69 veces menor en la condición LN comparada con la condición HN, respectivamente. Sin embargo, esta diferencia fue 1,23 veces en el caso de *S. cerevisiae* (1,96 en el caso de *T. delbrueckii*) en los cultivos mixtos. Fijándonos en las tasas de pérdida de peso, como

CAPÍTULO 3 – Resultados

medida de la cinética fermentativa, las diferencias entre las condiciones HN y LN fueron también menores en las fermentaciones mixtas ScTd (1,25 veces) que en las fermentaciones individuales Sc (1,56 veces) y Td (1,86 veces) (Figura 22).

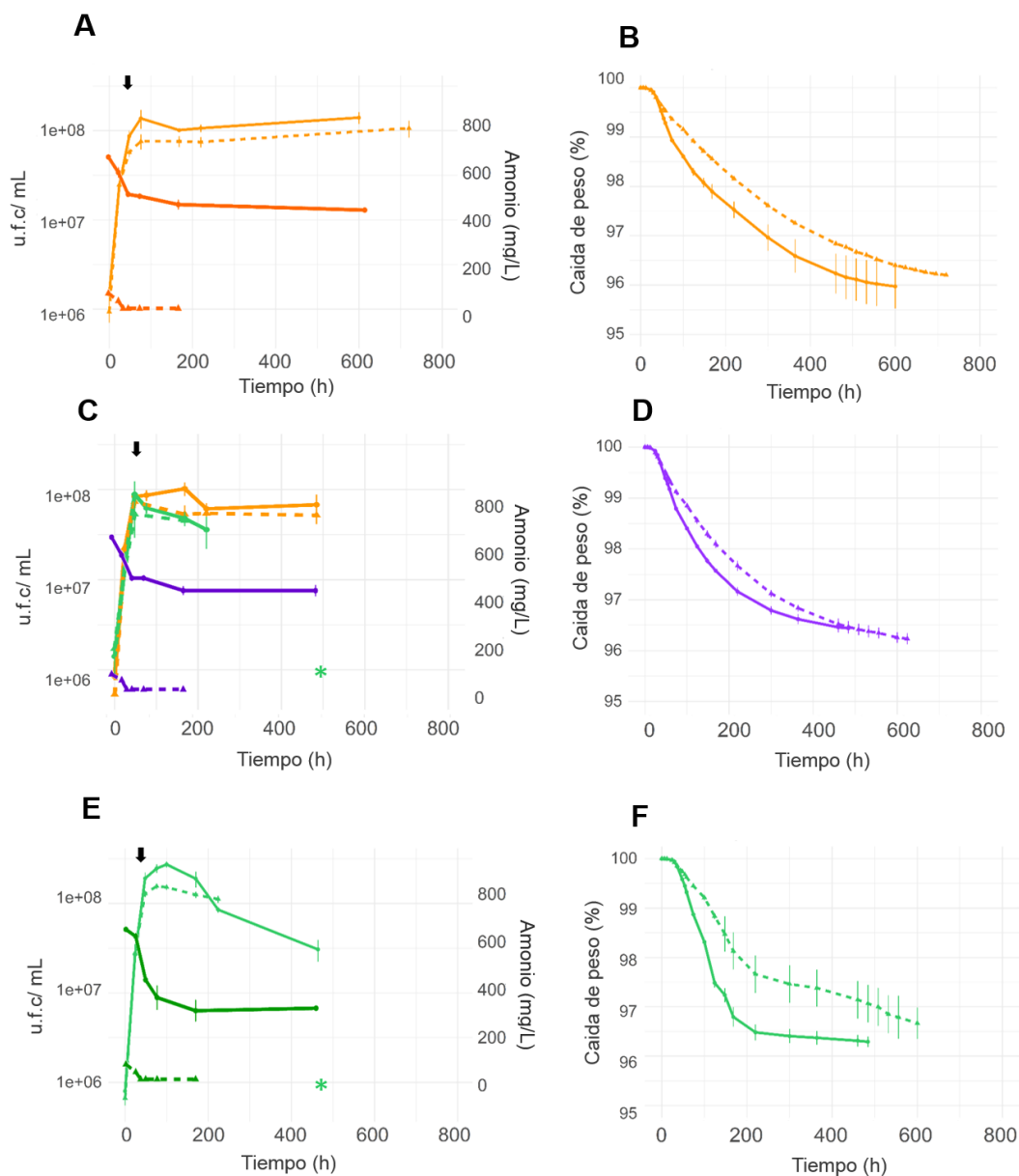


Figura 22: Monitorización de las fermentaciones de los ensayos Sc (naranja), ScTd (morado) y Td (verde), bajo las dos condiciones de nutrición nitrogenada, alto nitrógeno (HN, línea continua) y bajo nitrógeno (LN, línea discontinua). **A)** Dinámicas poblacionales de los ensayos Sc (naranja claro) y consumo de amonio (naranja oscuro). **B)** Caída de peso del ensayo Sc. **C)** Dinámicas poblacionales de los ensayos ScTd (naranja claro para el total de levaduras y verde para las levaduras de *T. delbrueckii*) y consumo de amonio (morado). **D)** Caída de peso del ensayo ScTd. **E)** Dinámicas poblacionales de los ensayos Td (verde claro) y consumo de amonio (verde oscuro). **F)** Caída de peso del ensayo Td. El asterisco en las figuras C y E indica que el recuento de levaduras fue menor de $1 \cdot 10^4$.

5.3.2 Cuantificación de metabolitos (no volátiles y volátiles) de interés enológico en los vinos

Los compuestos más relevantes desde el punto de vista enológico se cuantificaron al final de cada ensayo fermentativo (Tablas 7 y 8). En primer lugar, los datos fueron representados mediante un análisis de ordenación (PCA) para estudiar los patrones de producción de metabolitos en los ensayos Sc, Td y ScTd (Figura 23A). Se pudo observar que el impacto de la dosis de amonio (HN vs LN, establecido por el Componente Principal 1, que explica un 41% de la varianza) fue mayor que el impacto de la condición de inoculación (Sc vs ScTd y Td vs ScTd). También se pudo estudiar la contribución de cada parámetro a la ordenación de los datos de metabolitos. Las concentraciones de alcoholes superiores (principalmente de 3-metil-butanol y 2-metil-butanol), ácido cítrico y ácido acético fueron los principales determinantes de la diferenciación entre las condiciones HN y LN. La concentración de ésteres es el principal determinante de las diferencias observadas entre las condiciones de inoculación (Sc y ScTd), en condiciones LN.

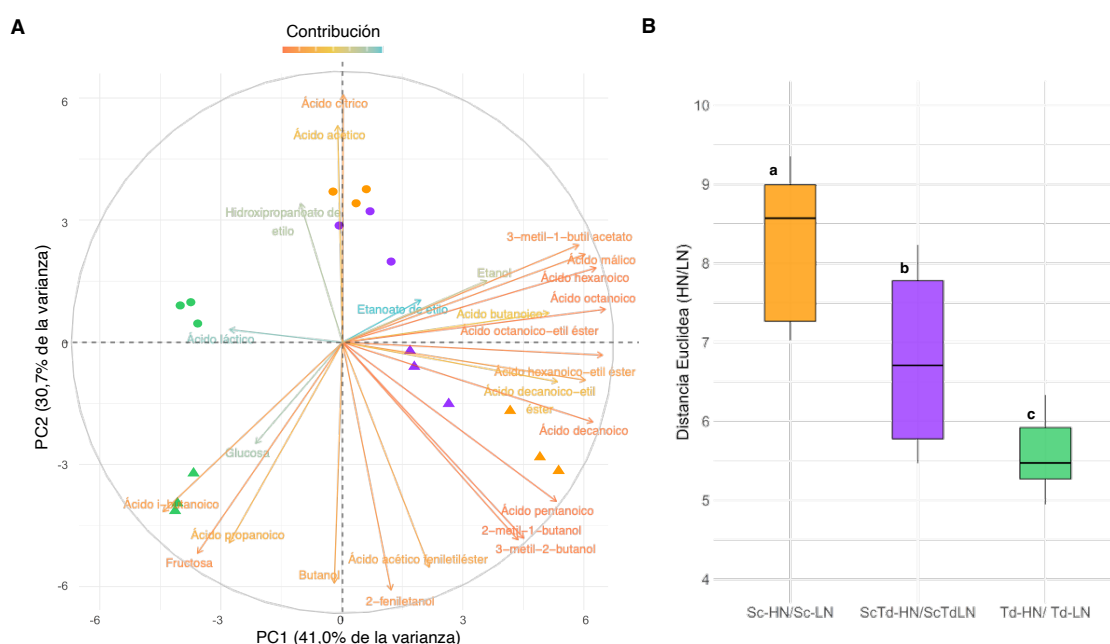


Figura 23: **A)** Análisis de Componentes Principales (PCA) de la concentración de metabolitos volátiles y no volátiles al final de los diferentes ensayos de fermentación. Se representan los datos de los ensayos Sc (naranja), Td (verde) y ScTd (morado), bajo las dos concentraciones de amonio: alto nitrógeno (HN) (●) y bajo nitrógeno (LN) (▲). La longitud de los vectores indica la contribución de cada parámetro a la ordenación de los datos. **B)** Distancias euclidianas calculadas a partir de los datos de ordenación del PCA (A) entre las condiciones HN y LN en los ensayos Sc (naranja), Td (verde) y ScTd (morado). Las letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticas entre las comparativas ($p < 0,05$).

El cálculo de las distancias euclidianas entre los grupos identificados en el análisis de ordenación (Figura 23B) permitió diferenciar el impacto que tuvo la alta concentración

CAPÍTULO 3 – Resultados

de amonio sobre el perfil de metabolitos de los vinos producidos según las distintas estrategias de inoculación (Sc y ScTd). Así, las distancias euclidianas entre los grupos Sc-HN y Sc-LN (condición de inoculación individual de *S. cerevisiae*) fueron mayores que las distancias entre los ensayos ScTd-HN y ScTd-LN (condición de inoculación mixta de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*) ($p < 0,01$). Además, analizando las distancias euclidianas entre los grupos HN y LN de los ensayos Td, se observó incluso un menor impacto de las condiciones de amonio en *T. delbrueckii*, comparado con los ensayos individuales de *S. cerevisiae* (Sc) y mixtos de ambas especies (ScTd).

Tabla 6: Producción de compuestos de interés al final de los ensayos fermentativos.

Compuesto	Sc HN	Sc LN	Sc+Td HN	Sc+Td LN	Td HN	Td LN
Glucosa (g/L)	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,36 ± 0,80 ^a
Fructosa (g/L)	1,31 ± 0,00 ^a	3,63 ± 0,54 ^b	1,4 ± 0,38 ^a	2,78 ± 0,31 ^b	3,84 ± 1,19 ^a	12,91 ± 1,07 ^b
Amonio (mg/L)	435,17 ^b ± 12,39	0,00 ± 0,00 ^a	416,79 ± 25,83 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	317,78 ± 11,18 ^b	0,00 ± 0,00 ^a
Etanol (% v/v)	9,13 ± 0,35 ^{ab}	9,86 ± 0,05 ^b	9,34 ± 0,22 ^{ab}	9,06 ± 0,41 ^a	9,49 ± 0,12 ^b	8,42 ± 0,22 ^a
Ácido málico (g/L)	2,46 ± 0,04 ^b	2,64 ± 0,05 ^c	2,33 ± 0,02 ^{ab}	2,31 ± 0,08 ^a	2,02 ± 0,15 ^a	1,77 ± 0,06 ^a
Ácido láctico (g/L)	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,18 ± 0,00 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	0,12 ± 0,00 ^a
Ácido acético (g/L)	0,63 ± 0,07 ^b	0,27 ± 0,08 ^a	0,66 ± 0,06 ^b	0,21 ± 0,04 ^a	0,33 ± 0,10 ^a	0,28 ± 0,07 ^a

Los datos expresan el valor medio de las tres réplicas junto con la desviación estándar. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticas entre las comparativas ($p < 0,05$).

La Tabla 6 muestra en detalle los datos de concentración final de metabolitos no volátiles en los vinos resultantes de los distintos ensayos. No se observó ningún efecto claro dependiente de nitrógeno en ningún compuesto, con la excepción de la concentración de ácido acético. Todas las fermentaciones mostraron cierta concentración de azúcares residuales, relacionado con una baja producción de etanol en todos los ensayos. Sí se observa una ligera disminución de la concentración de etanol en condiciones LN en las fermentaciones en las que participó *T. delbrueckii*. Los ensayos de co-inoculación ScTd mostraron un incremento significativo en la producción de ácido láctico y un ligero incremento en el consumo de ácido málico, comparados con las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae*, Sc. Estas variaciones pueden ser explicadas por un efecto directo de *T. delbrueckii* en las fermentaciones mixtas, como observamos en la producción de dichos compuestos en los ensayos Td individuales (Tabla 6). La Figura 24 muestra las cinéticas de consumo/producción de los compuestos no-volátiles analizados durante los ensayos de fermentación.

La concentración final de metabolitos volátiles también apareció condicionada por la dosis de nitrógeno y la estrategia de inoculación de levaduras (Tabla 7). Cabe mencionar

CAPÍTULO 3 – Resultados

la notable disminución de alcoholes superiores bajo condiciones de alta concentración de amonio. Entre ellos, destacan el 3-metil-butanol y el 2-metil-butanol (que imparte aromas descritos como whisky afrutado o plátano) cuya concentración se reduce entre dos y tres veces en condiciones HN. De la misma forma, la concentración de ácidos grasos fue también menor en condiciones de alto nitrógeno.

Tabla 7: Producción de metabolitos volátiles al final de los ensayos fermentativos. Datos expresados en mg/L.

Compuesto	Sc-HN	Sc-LN	ScTd-HN	ScTd-LN	Td-HN	Td-LN
Butan-1-ol	15,63 ± 1,77 ^a	38,31 ± 10,83 ^b	16,1 ± 6,73 ^a	20,79 ± 6,67 ^{ab}	20,63 ± 0,51 ^a	44,81 ± 4,07 ^b
3-Metil-2-butanol	52,48 ± 4,57 ^a	170,61 ± 26,29 ^c	86,17 ± 16,61 ^{ab}	123,34 ± 22,57 ^{bc}	58,98 ± 2,79 ^a	107,53 ± 4,34 ^b
2-Metil-1-butanol	12,56 ± 0,94 ^a	41,44 ± 4,62 ^c	17,57 ± 3,86 ^{ab}	28,57 ± 7,02 ^b	9,81 ± 0,22 ^a	25,33 ± 0,52 ^b
2-feniletanol	5,59 ± 0,18 ^a	28,93 ± 2,21 ^c	11,76 ± 0,60 ^b	31,22 ± 1,24 ^c	13,62 ± 1,13 ^a	31,63 ± 0,47 ^b
∑ Alcoholes superiores	86,27 ± 6,45^a	279,28 ± 42,89^c	131,60 ± 27,41^{ab}	203,95 ± 35,38^{bc}	103,05 ± 3,23^a	209,29 ± 8,71^b
Etanoato de etilo	23,14 ± 6,49 ^{ab}	20,27 ± 4,92 ^{ab}	38,78 ± 14,65 ^b	14,26 ± 11,6 ^a	nc	20,33 ± 7,71
Etil propanoato	0,16 ± 0,00 ^a	0,44 ± 0,08 ^b	0,23 ± 0,03 ^{ab}	0,23 ± 0,15 ^{ab}	0,48 ± 0,07 ^a	0,58 ± 0,08 ^a
Metil butanoato	0,03 ± 0,00 ^{ab}	0,05 ± 0,00 ^b	0,037 ± 0,01 ^{ab}	0,02 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	0,15 ± 0,02 ^b
Etil butanoato	0,12 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,09 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,04 ± 0,03 ^a
2-Hidroxipropanoato de etilo	13,95 ± 0,05 ^a	13,72 ± 0,10 ^a	14,88 ± 0,17 ^b	13,98 ± 0,26 ^a	14,19 ± 0,16 ^a	13,88 ± 0,49 ^a
3-metil-1-butil acetato	0,23 ± 0,06 ^a	0,26 ± 0,02 ^a	0,26 ± 0,06 ^a	0,19 ± 0,03 ^a	nc	nc
Ácido hexanoico - etil éster	0,14 ± 0,11 ^a	0,33 ± 0,04 ^b	0,07 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,02 ^{ab}	nc	nc
Ácido octanoico – etil éster	0,16 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,07 ^b	0,15 ± 0,03 ^a	0,31 ± 0,03 ^b	nc	nc
Ácido acético fenil etil éster	nc	0,08 ± 0,01 ^c	0,03 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,00 ^b	0,03 ± 0,03 ^a	0,06 ± 0,00 ^a
Ácido decanoico – etil éster	0,06 ± 0,01 ^a	0,55 ± 0,14 ^b	0,31 ± 0,334 ^{ab}	0,27 ± 0,03 ^{ab}	nc	nc
∑ Ésteres	38,00 ± 6,51^{ab}	36,17 ± 5,02^{ab}	54,85 ± 14,48^b	24,86 ± 11,7^a	14,8 ± 0,2^a	35,04 ± 8,17^b
Ácido hexanoico	5,64 ± 0,02 ^a	7,01 ± 0,23 ^c	5,81 ± 0,09 ^a	6,3 ± 0,13 ^b	nc	nc
Ácido pentanoico	1,66 ± 0,01 ^a	2,44 ± 0,13 ^c	1,76 ± 0,03 ^a	2,09 ± 0,05 ^b	1,51 ± 0,01 ^a	1,84 ± 0,04 ^b
Ácido octanoico	2,13 ± 0,01 ^a	3,41 ± 0,29 ^b	2,37 ± 0,28 ^a	3,13 ± 0,22 ^b	nc	nc
Ácido decanoico	0,62 ± 0,02 ^a	3,00 ± 0,20 ^b	0,72 ± 0,27 ^a	1,38 ± 0,58 ^a	nc	nc
∑ Ácidos grasos	10,05 ± 0,02^a	15,86 ± 0,68^c	10,66 ± 0,62^a	12,9 ± 0,89^b	1,51 ± 0,01^a	1,84 ± 0,04^b

Los datos expresan el valor medio de las tres réplicas junto con la desviación estándar. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticas entre las comparativas ($p < 0,05$). nc: cantidades traza no cuantificables.

CAPÍTULO 3 – Resultados

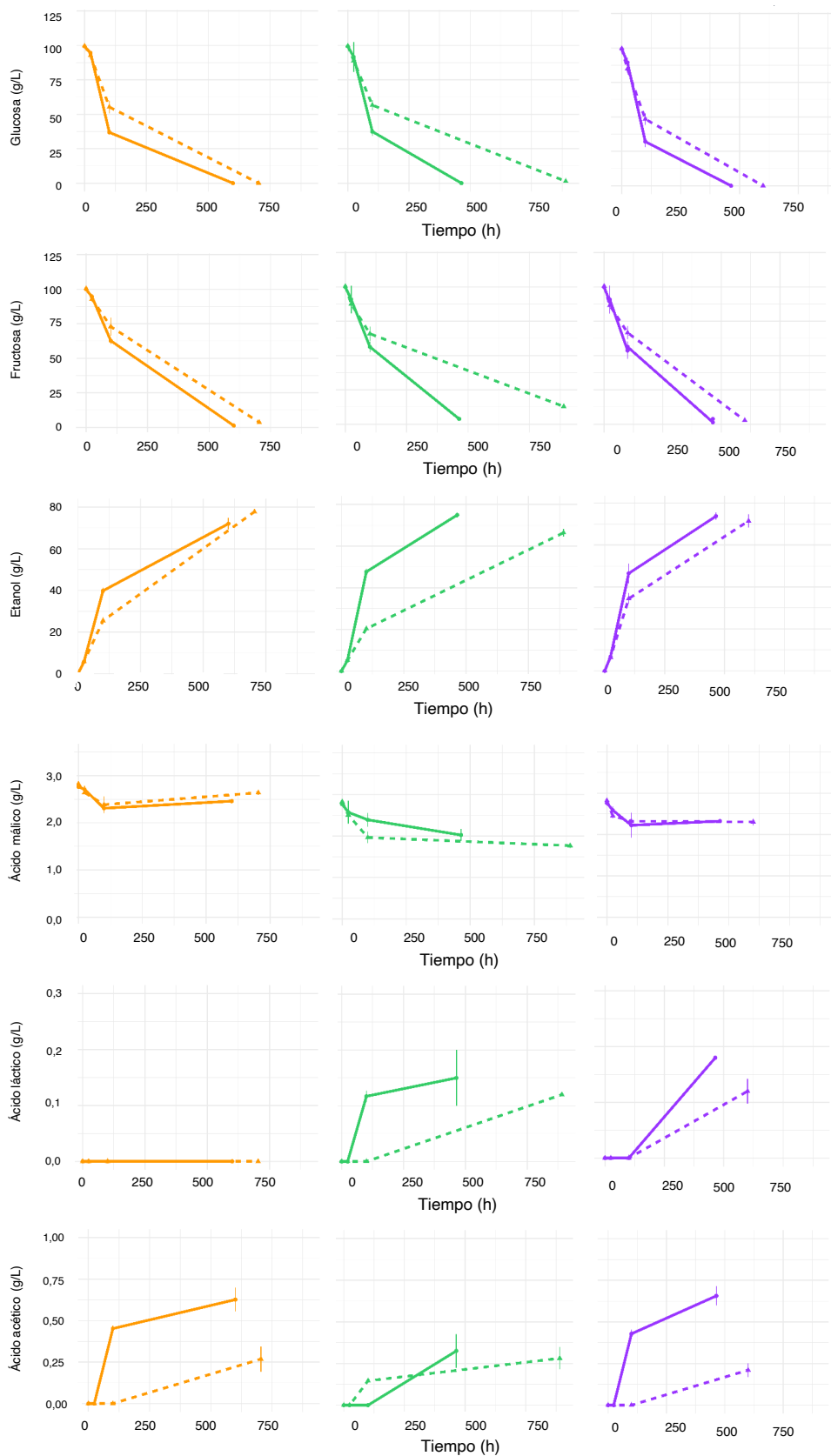


Figura 24: Monitorización de la producción de compuestos químicos en los cultivos puros de *S. cerevisiae* (naranja) y *T. delbrueckii* (verde) y en los cultivos mixtos de ambas especies (morado) bajo dos concentraciones de amonio: alto nitrógeno (HN) y bajo nitrógeno (LN) representados mediante una línea sólida y una línea punteada, respectivamente. Se representan la media de las tres replicas y la desviación estándar.

Comparando los ensayos Sc y ScTd, se pudo observar que la estrategia de inoculación mixta de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* también tuvo un efecto en la composición aromática de los vinos. En el caso de alcoholes superiores, el efecto de la co-inoculación en su producción fue dependiente de la condición de nitrógeno. En los ensayos ScTd-LN, se observó una reducción de la concentración de estos compuestos con respecto al ensayo Sc-LN. Sin embargo, en los ensayos ScTd-HN, donde la concentración de nitrógeno se mantuvo alta durante toda la fermentación, se observó un incremento en la producción de alcoholes superiores, comparado con los ensayos individuales Sc. Además, los ensayos de co-inoculación mostraron un incremento en la producción de ésteres, comparado con los ensayos Sc, destacando las producciones de etanoato de etilo y 2-hidroxipropanoato de etilo (ácido láctico etil éster), los cuales aportan aromas afrutados en los vinos. Respecto a los ácidos grasos, no se encontraron diferencias entre los ensayos Sc y ScTd (Tabla 7).

5.3.3 Respuesta transcripcional global de *S. cerevisiae* al amonio y a la co-inoculación con *T. delbrueckii*

En este trabajo se llevó a cabo un análisis de secuenciación del ARNm total (RNA-seq) de *S. cerevisiae* en los ensayos Sc y ScTd (HN vs LN), así como de los correspondientes transcritos de *T. delbrueckii* en el ensayo mixto ScTd. Las muestras fueron tomadas 36 horas después de la inoculación conjunta de las levaduras en los ensayos de fermentación. Este tiempo de muestreo se eligió para asegurar que todos los ensayos (HN y LN), así como ambas especies en el cultivo mixto, se encontraban en una fase de crecimiento equivalente, evitando las diferencias de expresión génica causadas por el cambio de fase exponencial a fase estacionaria, y asegurando suficiente tiempo de interacción metabólica entre las dos especies de levaduras en los ensayos de co-inoculación (Figura 22). Además, a las 36h, en los ensayos LN las levaduras agotaron completamente el amonio, mientras que en las fermentaciones HN todavía se mantenía una alta concentración de amonio. Así, en este tiempo se aseguró que los ensayos HN y LN estuvieran en condiciones claramente distintas en cuanto a su contenido en amonio.

La Figura 25A muestra la ordenación de las diferentes muestras de los ensayos Sc y ScTd a partir de los valores de expresión de genes de *S. cerevisiae* normalizados y transformados de todas las réplicas, confirmando que los perfiles transcriptómicos de las muestras se agrupan, en primer lugar, dependiendo de la condición de nitrógeno (HN vs LN) y, en segundo lugar, en función de la condición de inoculación (Sc vs ScTd). Como

CAPÍTULO 3 – Resultados

se observaba en el caso de los perfiles de metabolitos (Figura 23A), la respuesta transcripcional a la dosis de amonio fue mayor que la respuesta a la co-inoculación de levaduras. El efecto del nitrógeno en el transcriptoma de *S. cerevisiae* aparece definido por la Componente Principal 1 del análisis de ordenación, que explica el 81% de la varianza observada, mientras que, el efecto de la estrategia de inoculación se establece en el Componente Principal 2, que solo explica el 11% de la varianza. Además, el cálculo de las distancias euclidianas permitió observar que el impacto transcripcional de la condición de nitrógeno fue menor en la condición de co-inoculación (ScTd) (Figura 25B).

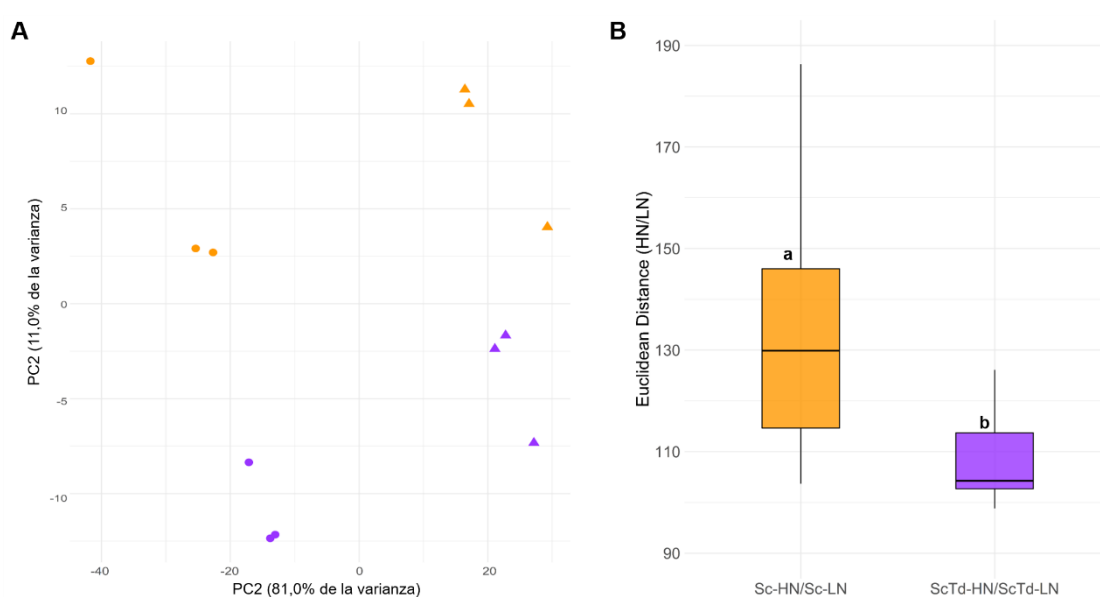


Figura 25: **A)** Análisis de Componentes Principales (PCA) de los datos de expresión génica normalizados de todos los RNAm de *S. cerevisiae* (análisis RNA-seq) en los ensayos Sc (naranja) y ScTd (morado) bajo las dos concentraciones de amonio: HN (●) y LN (▲). **B)** Distancias euclidianas calculadas a partir de los datos de ordenación del PCA (**A**) entre las condiciones HN y LN en los ensayos Sc (naranja) y ScTd (morado). Las letras diferentes indican la existencia de diferencias estadísticas entre las comparativas ($p < 0,05$).

El análisis de Genes Diferencialmente Expresados (GDEs) de *S. cerevisiae* se llevó a cabo estableciendo las siguientes comparativas: Sc-HN vs Sc-LN (impacto del nitrógeno en condiciones de inoculación individual de *S. cerevisiae*), ScTd-HN vs ScTd-LN (impacto del nitrógeno en condiciones de co-inoculación de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*), ScTd LN-vs Sc-LN (impacto de la co-inoculación con *T. delbrueckii* en condiciones de bajo nitrógeno), ScTd-HN vs Sc-HN (impacto de la co-inoculación con *T. delbrueckii* en condiciones de alto nitrógeno). La Figura 26 muestra la descripción

cuantitativa de la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* a las diferentes condiciones de amonio ensayadas en fermentaciones individuales (Sc) y co-inoculadas (ScTd).

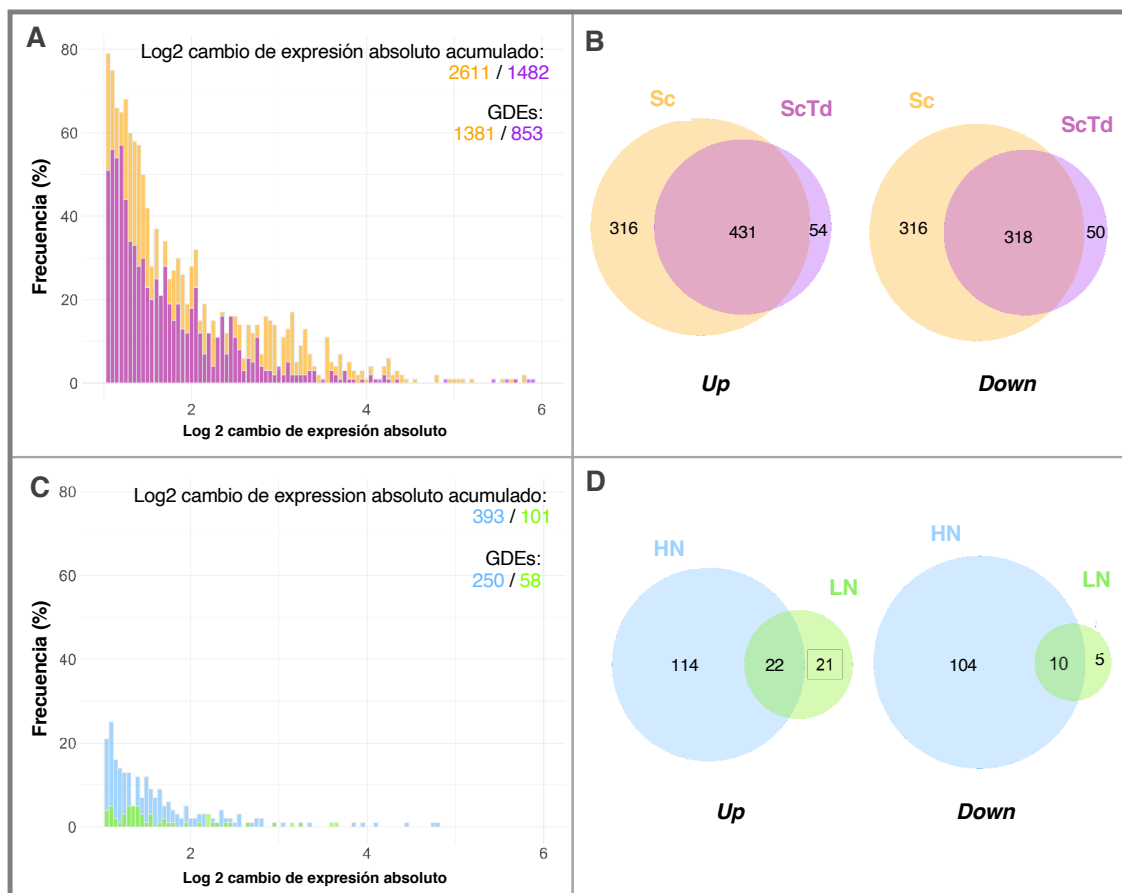


Figura 26: Resumen de la respuesta transcripcional global de *S. cerevisiae* en los ensayos individuales de *S. cerevisiae* (Sc) y mixtos de *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii* (ScTd) bajo las condiciones HN y LN. **A)** Frecuencia del cambio de expresión (log2) absoluto en condiciones Sc (naranja) y ScTd (morado) bajo HN vs LN. **B)** Diagrama de Venn mostrando el número de GDEs sobreexpresados (*Up*) y reprimidos (*Down*) por la alta concentración de amonio en condiciones Sc (naranja) y ScTd (morado). **C)** Frecuencia del cambio de expresión (log2) absoluto en condiciones HN (azul) y LN (verde) bajo condiciones Sc vs ScTd. **D)** Diagrama de Venn mostrando el número de GDEs sobreexpresados (*Up*) y reprimidos (*Down*) por la co-inoculación de *T. delbrueckii* en condiciones HN (azul) y LN (verde).

De esta forma se puede estudiar el efecto de la dosis de amonio (HN vs LN) bajo condiciones de inoculación individual (Sc) y mixta (ScTd) (Figura 26A-B) y el efecto de la condición de inoculación (ScTd vs Sc) bajo condiciones de alto (HN) y bajo (LN) nitrógeno (Figura 26 C-D). El efecto transcripcional de la nutrición con amonio en *S. cerevisiae* fue mayor que el efecto de la co-inoculación con *T. delbrueckii*, en términos de valor absoluto de cambio de expresión (2611-1482 frente a 393-101) y de número de GDEs (1381-853 frente a 250-58). Por otro lado, el efecto de la alta dosis de amonio en el transcriptoma de *S. cerevisiae* fue menor en los ensayos mixtos (ScTd) comparado con los ensayos individuales (Sc), en términos de valor absoluto de cambio de expresión

CAPÍTULO 3 – Resultados

(2611 frente a 1482) y de número de GDEs (1381 frente a 853) (Figura 26A). Este efecto de la co-inoculación con *T. delbrueckii* en la regulación transcripcional global de *S. cerevisiae* en condiciones extremas de nutrición nitrogenada fue corroborado determinando las distancias euclidianas entre los correspondientes grupos en el análisis de ordenación PCA, donde la distancia entre los grupos HN y LN fue mayor en los ensayos Sc que en los ensayos ScTd ($p < 0,01$) (Figura 25B). A pesar de que solo se analizó el perfil transcripcional en un tiempo de muestreo (36h), estas observaciones refuerzan nuestra hipótesis sobre la disminución de la respuesta de *S. cerevisiae* a las condiciones de amonio cuando es co-inoculada con *T. delbrueckii*, como se observó previamente en las cinéticas fermentativas (Figura 22) y en los perfiles de metabolitos producidos en cada uno de los ensayos (Figura 23). Por último, resulta importante indicar que la respuesta transcripcional de la co-inoculación con *T. delbrueckii* en *S. cerevisiae* fue mayor en condiciones HN que en condiciones LN, en términos de valor absoluto de cambio de expresión (393 frente a 101) y de número de GDEs (250 frente a 58) (Figura 26C).

5.3.4 Genes diferencialmente expresados en *S. cerevisiae*

En base al análisis de los GDEs y las categorías de enriquecimiento (en términos KEGG y GO) se estudió cualitativamente cómo *S. cerevisiae* cambia su perfil de expresión transcripcional en las condiciones extremas de disponibilidad de nitrógeno ensayadas (datos de GDE, KEGG y GO depositados en el repositorio: https://github.com/Javier-R-Ruiz/Thesis-Javier-Ruiz_Supplementary-Material/issues). De esta manera, en los ensayos Sc-HN, los genes relacionados con el consumo de fuentes alternativas de nitrógeno -por ejemplo, prolina, urea, ácido γ -aminobutírico o alantoína- (*CARI*, *DAL1*, *DAL4*, *DAL7*, *DUR3* y *PUT1*) aparecen altamente reprimidos en comparación con el ensayo Sc-LN. *S. cerevisiae* respondió también a la alta concentración de amonio mediante la represión del metabolismo energético oxidativo (incluyendo la fosforilación oxidativa, el metabolismo del piruvato y el ciclo de los ácidos tricarbónicos). Entre los procesos cuya expresión se indujo bajo condiciones HN encontramos la biosíntesis de proteínas, a través de la sobreexpresión de componentes ribosomales (genes de las familias *RPL* y *RPS*) y la biosíntesis de aminoácidos (genes de las familias *LYS* y *ARO*). Genes relacionados con la resistencia al estrés, como el gen *GEX1*, y componentes de la pared celular (*TIR1* y *TIR2*) fueron también sobreexpresados en los ensayos con altas concentraciones de amonio.

Mediante la comparación de la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* en las fermentaciones individuales (Sc) y co-inoculadas (ScTd), se estudió el efecto de *T. delbrueckii* en el perfil de expresión de *S. cerevisiae*. Como se ha descrito en la sección anterior, el impacto de *T. delbrueckii* en el transcriptoma de *S. cerevisiae* fue diferente dependiendo de la condición de nitrógeno, con un mayor número de GDEs en la condición HN. Por tanto, en cada condición de concentración de amonio distintos genes se expresaron diferencialmente. Sin embargo, se pudo determinar que algunos genes se sobreexpresaron y se reprimieron en ambas condiciones HN y LN. Estos GDEs, con un patrón de regulación transcripcional conservado en las dos condiciones de nitrógeno HN y LN, permiten entender la respuesta transcripcional central de *S. cerevisiae* a la co-inoculación con *T. delbrueckii* (genes solapados en el diagrama de Venn) (Figura 26D). En presencia de *T. delbrueckii* (ensayos ScTd), y con independencia de la dosis de nitrógeno, *S. cerevisiae* sobreexpresó genes relacionados con la internalización de aminoácidos (*VBA3* y *VBA5*) y el transporte de hexosas (*HXT3*, *HXT4*, *HXT5*, *HXT6* y *HXT7*). La co-inoculación de *T. delbrueckii* también indujo la expresión de genes relacionados con la homeostasis de iones metálicos, incluyendo genes del transporte de hierro y cobre (*ARN1*, *ARN2*, *CTR1* and *CTR3*), genes codificantes para reductasas de hierro (*FRE1* y *FRE4*) y otros genes relacionados con la respuesta al agotamiento de metales (*LSO1* y *TIS11*). Finalmente, la co-inoculación de *T. delbrueckii* indujo la sobreexpresión de genes relacionados con el transporte de glutatión (*GEX1* y *GEX2*), genes de respuesta a estrés (*HSP32*, *GRE1* *HSP32*, *GRE1* y *AQY1*) y genes codificantes para componentes de la pared celular (*FIT2* y *FIT3*).

Por el contrario, algunos genes fueron reprimidos en condiciones de co-inoculación. Entre ellos, cabe destacar los genes relacionados con la biosíntesis de los aminoácidos leucina y lisina (*LUE1* y *LYS4*), genes implicados en el procesamiento post-transcripcional de proteínas (*FES1* y *CURI*), y otros genes relacionados con el ciclo celular, la meiosis y la replicación/replicación del ADN.

Por último, se estudió el posible impacto de las condiciones de nitrógeno y de la co-inoculación de levaduras en la producción de ciertos aromas fermentativos desde un punto de vista transcripcional, analizando los patrones de regulación transcripcional de genes directamente relacionados con el metabolismo de alcoholes superiores, ésteres y ácidos grasos volátiles. Se observó nuevamente una mayor respuesta transcripcional ante la condición de nitrógeno que ante la condición de co-inoculación, de los genes relacionados con la producción de aromas en *S. cerevisiae*.

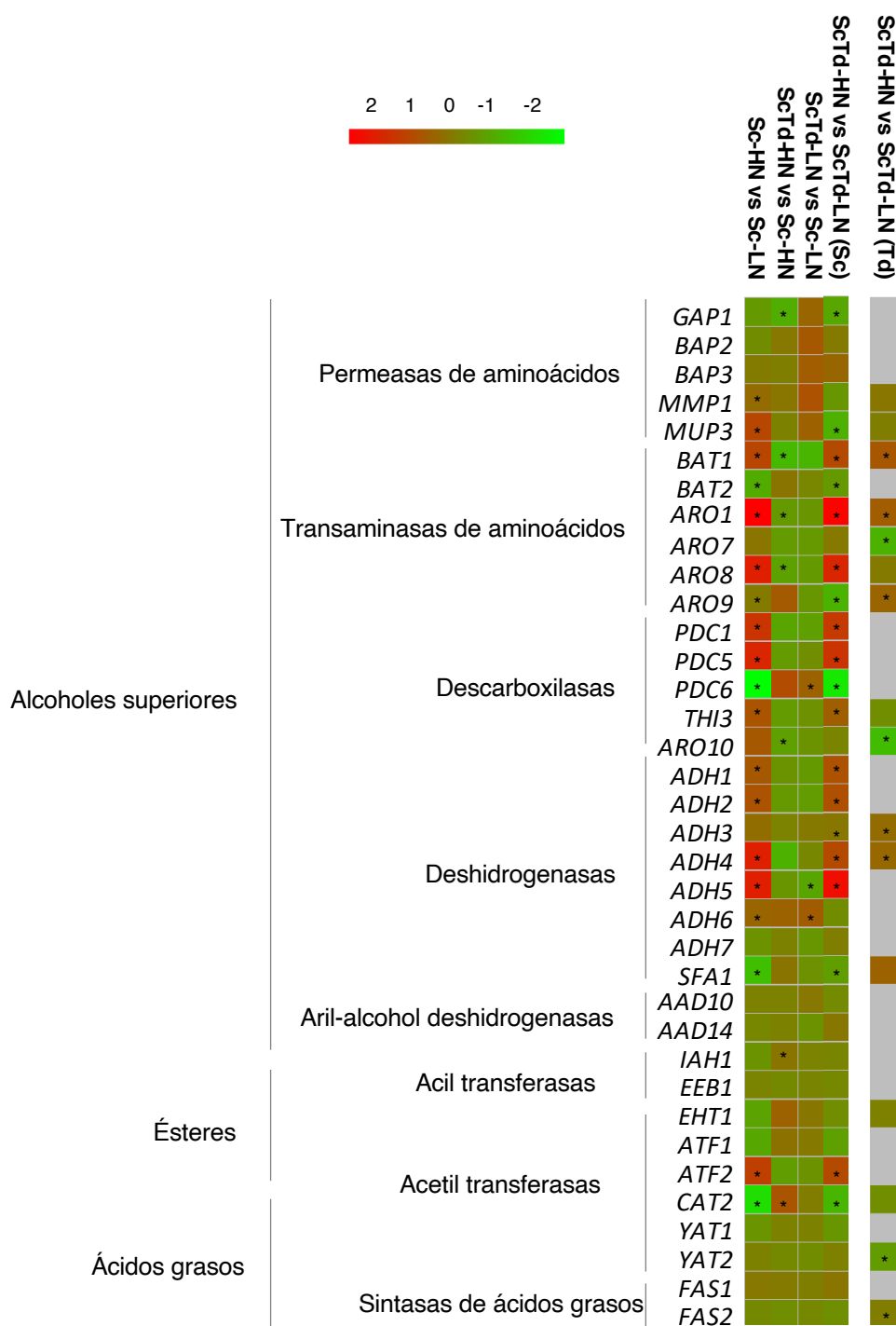


Figura 27: Representación de la expresión (log2 cambio de expresión) de los genes relacionados con la producción de compuestos aromáticos en obtenido en cada comparativa (* $p < 0,05$).

La Figura 27 muestra que algunos de los genes relacionados con la producción de compuestos aromáticos están igualmente expresados en ambas condiciones de nitrógeno, independientemente de la presencia de *T. delbrueckii*. Los patrones de expresión de alguno de estos genes están relacionados con la concentración de compuestos volátiles

observada al final de los ensayos fermentativos (Tabla 7), como se detallará posteriormente en la sección 6.3 de discusión general.

5.3.5 Respuesta transcripcional a la nutrición nitrogenada en *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* bajo condiciones de co-inoculación

El análisis RNA-seq además, permitió estudiar la respuesta transcripcional frente al nitrógeno de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* de forma separada en los ensayos de fermentación mixta, mediante la identificación de los GDEs exclusivos de cada especie. La Figura 28 muestra una respuesta transcripcional global a la nutrición nitrogenada similar en ambas especies (teniendo en cuenta el número de GDEs y el cambio de expresión acumulado), siendo el impacto del nitrógeno sutilmente inferior en *T. delbrueckii*. Además, para comparar cualitativamente la respuesta transcripcional de las dos especies, se identificaron, entre los GDEs, los correspondientes genes ortólogos de *S. cerevisiae* en *T. delbrueckii*. A pesar de que la mayoría de los GDEs fueron diferentes en cada especie (diagrama de Venn en Figura 28), se pueden identificar un total de 90 genes ortólogos inducidos y 41 reprimidos en condiciones HN, de forma equivalente en ambas especies. Entre los genes inducidos se encuentran genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos (*ARG3*, *ARO4*, *HOM3* y *LYS12*) y componentes ribosomales (*ASC1*, *RPS2*, *RPS5*, *RPS12* y *RPS20*). Por otro lado, los genes sensibles a NCR (*CAR2*, *DAL1*, *DAL2*, *DAL4*, *DUR80*, *OPT1*, *PUT1*, *PUT2* y *PUT4*) fueron el principal grupo de genes reprimidos en condiciones HN en las dos especies (datos de GDE depositados en el repositorio: https://github.com/Javier-R-Ruiz/Thesis-Javier-Ruiz_Supplementary-Material/issues).

En la Figura 28C se puede observar que los genes sobreexpresados en condiciones de alto nitrógeno presentan niveles de cambios de expresión similares en ambas especies. Sin embargo, el gen *THI4* (involucrado en la síntesis de tiamina) destacó por su gran diferencia de expresión entre las dos especies estudiadas (1,6 veces de cambio de expresión (log2) en *S. cerevisiae* frente a 4.8 de cambio de expresión (log2) en *T. delbrueckii*). Cabe destacar que los genes sensibles a NCR de *T. delbrueckii* mostraron niveles de represión inferiores por nitrógeno que los correspondientes genes ortólogos en *S. cerevisiae*. Por último, considerando solo los genes ortólogos de ambas especies, se pudo identificar las categorías de genes (GO y KEGG) diferencialmente reguladas bajo condiciones HN. A pesar de que la mayoría de las categorías son compartidas por las dos especies, se puede destacar que, a diferencia de *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* sobreexpresó

CAPÍTULO 3 – Resultados

genes pertenecientes a las categorías de transporte de ARN, metabolismo de purina y pirimidina, biosíntesis de esteroides y metabolismo de azufre, y reprimió genes pertenecientes a las categorías del metabolismo de lípidos y ácidos grasos (todas ellas categorías no encontradas entre las diferencialmente reguladas en *S. cerevisiae*). En el caso de *S. cerevisiae*, la condición HN reprimió procesos de comunicación celular, de autofagia y biosíntesis de esteroides entre otros (categorías no encontradas como reprimidas por el nitrógeno en *T. delbrueckii*) (datos de enriquecimiento KEGG y GO depositados en el repositorio: https://github.com/Javier-R-Ruiz/Thesis-Javier-Ruiz_Supplementary-Material/issues).

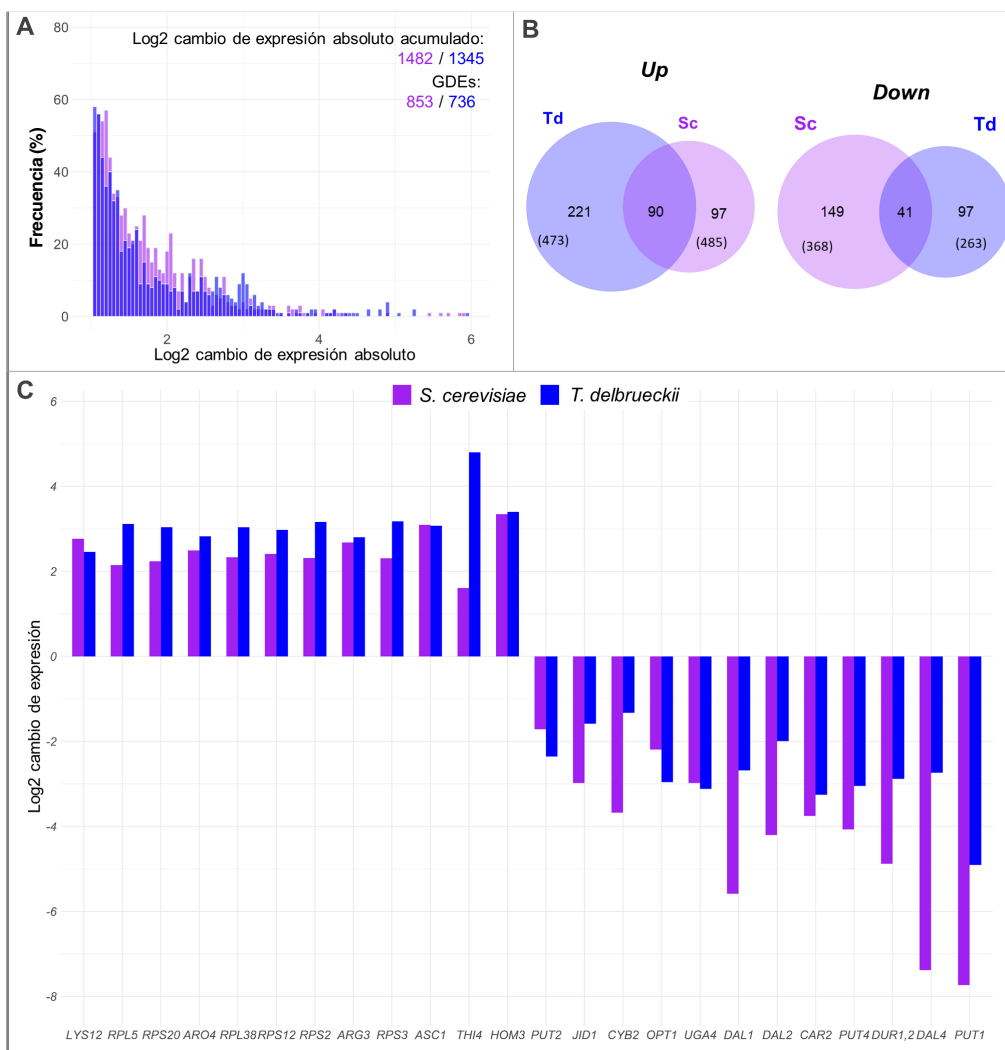


Figura 28: Resumen de los análisis de la respuesta transcripcional global a la alta concentración de amonio de *S. cerevisiae* (morado) y de *T. delbrueckii* (azul) en los ensayos mixtos de *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii* (ScTd) **A**) Frecuencia del cambio de expresión (log₂) absoluto de *S. cerevisiae* (morado) y de *T. delbrueckii* (azul). **B**) Diagrama de Venn mostrando el número de GDEs expresados (*Up*) y reprimidos (*Down*) por la alta concentración de amonio en *S. cerevisiae* (morado) y de *T. delbrueckii* (azul), solo considerando los genes ortólogos identificados en ambas especies (entre paréntesis los genes totales de las dos especies) **C**) Cambio de expresión de los genes comúnmente regulados por la alta concentración de amonio (HN) en *S. cerevisiae* (morado) y en *T. delbrueckii* (azul).

DISCUSIÓN GENERAL

6 DISCUSIÓN GENERAL

Durante milenios las levaduras vínicas han estado expuestas a las exigentes condiciones fisicoquímicas y biológicas del mosto de uva y del proceso de fermentación alcohólica (Mc Govern *et al.*, 2004; 2017). Como consecuencia, en las levaduras se han seleccionado de una serie de mecanismos de adaptación que permiten, no solo sobrevivir a dichas condiciones (García-Ríos y Guillamón, 2019), sino también llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica eficientemente y, además, producir una serie de metabolitos que contribuyen de manera determinante a la compleja matriz química - aromática y gustativa- del vino (Lambrechts y Pretorius, 2000). Desde los comienzos de la práctica de la vinificación, los enólogos han seleccionado las características de las levaduras que las hacen óptimas para su proliferación en el mosto y que, además, presentan propiedades enológicas óptimas (originalmente a partir de las lías resultantes de fermentaciones exitosas) consiguiendo controlar y optimizar las propiedades sensoriales del vino que dependen de su metabolismo (Swiegers y Pretorius, 2007). Entre estas características destaca la capacidad de las levaduras para proliferar a bajos valores de pH y altas concentraciones de azúcares, resistiendo elevados niveles de etanol, o también, para consumir ciertos micronutrientes presentes en el mosto de uva (García-Ríos y Guillamón, 2019).

El metabolismo del nitrógeno y el azufre de las levaduras permite la eficiente utilización de las fuentes de nutrientes nitrogenados y azufrados durante la fermentación del vino. Debido a la naturaleza química de ciertos precursores aromáticos del mosto, en los que los compuestos aromáticos se encuentran conjugados con aminoácidos azufrados, estos mecanismos nutricionales de las levaduras pueden estar implicados también en la liberación de aromas en el vino. Los compuestos aromáticos determinan en gran medida el perfil sensorial del vino, considerado como el rasgo más definitorio de la calidad final del mismo (Polaskova *et al.*, 2008). Además, el perfil aromático del vino es principal carácter que se expresa como consecuencia de la combinación de los factores físicos, químicos y biológicos del viñedo, contribuyendo así al concepto de *Terroir* (Belda *et al.*, 2016a). Entre los compuestos aromáticos del vino, los tioles varietales (destacando el 4MSP, el 3MH y el 3MHA) son compuestos volátiles que, a pesar de su baja concentración, tienen un gran impacto sensorial en ciertas variedades de vinos blancos debido a su bajo umbral de detección (Ruiz *et al.*, 2019a). En el mosto de uva estos compuestos se encuentran conjugados con aminoácidos como cisteína y glicina o

pequeños péptidos como glutatión, en forma de precursores no volátiles y, por tanto, no odorantes (Tominaga *et al.*, 1995). Las levaduras son capaces de internalizar los precursores tiólicos a través de permeasas generales de aminoácidos y oligopéptidos y posteriormente escindirlos gracias a enzimas β -liasa (Irc7p, principalmente), obteniendo amonio como fuente de nitrógeno, y liberando los tioles libres, que tienen un gran impacto aromático. A pesar de su baja concentración en el mosto de uva, la baja especificidad de las permeasas y enzimas β -liasa permite a las levaduras consumir y escindir los precursores tiólicos y, eventualmente, aprovechar el amonio producido en este proceso de liberación de la fracción tiólica volátil. Así, a través de este mecanismo indirecto, las levaduras pueden contribuir a las propiedades sensoriales de los vinos.

Las estrategias centradas en el incremento de la concentración de tioles en el vino, aun siendo moderado, pueden tener una influencia muy alta en la composición aromática del vino por el elevado nivel de percepción que poseemos y que nos permite detectar cantidades en el entorno de los ng/L para este tipo de compuestos. En este contexto, la selección de levaduras con una alta capacidad de liberar tioles a partir de sus precursores conjugados resulta de gran interés en la mejora del perfil sensorial de los vinos. Así, esta Tesis Doctoral está centrada en la comprensión de las bases genéticas y metabólicas de la producción de tioles en *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando el gen *IRC7* como eje central (Ruiz *et al.*, 2020b), y en el estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* como herramientas microbiológicas para la mejora del perfil tiólico en los vinos (Belda *et al.*, 2017c; Ruiz *et al.*, 2018). Además, debido a las limitaciones de las levaduras no-*Saccharomyces* para completar la fermentación alcohólica, consumiendo todos los azúcares del mosto y, en consecuencia, a que su uso en vinificación se restringe a condiciones de co-inoculación junto con *S. cerevisiae*, en esta Tesis se estudió también el efecto a nivel transcripcional de la co-inoculación de levaduras y en la producción de metabolitos de interés enológico (Ruiz *et al.*, 2020a).

6.1 Papel de *S. cerevisiae* en la producción de tioles: el paradójico caso del gen *IRC7*

A pesar de que *S. cerevisiae* ejerce un papel dominante en la fermentación alcohólica y de su gran contribución a las propiedades sensoriales del vino, se ha demostrado que la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* tienen una capacidad limitada para la liberación de tioles en condiciones de vinificación, en las que solamente entre el 5 y el 10% de precursores tiólicos son transformados en tioles libres (Murat *et al.*, 2001; Coetzee y du

Toit, 2012, Swiegers y Pretorius, 2007). Un estudio previo de nuestro grupo de investigación, en el que se exploró la distribución de actividades enzimáticas de interés enológico en una numerosa colección de levaduras (Belda *et al.*, 2016a), demostró que la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* presentan una escasa actividad β -liasa (directamente relacionada con la liberación de tioles). Además, la alta especialización de las cepas de *S. cerevisiae* al ambiente vínico implica un robusto mecanismo de NCR, que les permite consumir eficientemente las fuentes de nitrógeno disponibles en el mosto, sin embargo, supone una represión de los genes relacionados con la liberación de tioles - aquellos que codifican los transportadores de precursores tiólicos (Subileau *et al.*, 2008) y las enzimas β -liasa implicadas en su escisión (Thibon *et al.*, 2008), cuando en el medio se encuentran fuentes preferenciales de nitrógeno, como el amonio.

Por otro lado, otro estudio de nuestro grupo de investigación demostró que el genotipo del gen *IRC7* -codificante para una enzima cistationina- β -liasa capaz de romper el enlace carbono-azufre de los precursores tiólicos (principalmente del precursor cisteinilado del 4MSP; Figura 3)- es determinante en la capacidad de las levaduras para producir tioles (Belda *et al.*, 2016b). Para este gen se han descrito dos alelos en *S. cerevisiae*: un alelo completo (*IRC7^F*) y un alelo delecionado (*IRC7^S*) que codifica un enzima con menor actividad (Roncoroni *et al.*, 2011), encontrando así tres genotipos *IRC7*: HS (*IRC7^S* en homocigosis), HT (heterocigosis) y HF (*IRC7^F* en homocigosis). Además, se confirmó que la gran mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son homocigotas para alelo *IRC7^S* (HS), es decir, que presentan una enzima β -liasa menos eficaz para la liberación de tioles (Belda *et al.*, 2016b). En este contexto, el objetivo inicial del estudio recogido en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral fue la exploración de las singularidades fenotípicas y genómicas de las cepas de *S. cerevisiae* portadoras del alelo *IRC7^S* y, por tanto, con menor capacidad de producir de tioles varietales, con el objetivo de explicar esta paradójica distribución de alelos en la población de cepas vínicas.

6.2 Distribución de alelos *IRC7* en las poblaciones de cepas de *S. cerevisiae*

El genotipado de los alelos *IRC7* en una gran colección de genomas de *S. cerevisiae* -representando diferentes regiones geográficas y linajes filogenéticos (Figura 8)- permitió confirmar los resultados previos de Roncoroni *et al.* (2011), Belda *et al.* (2016c) y Cordente *et al.* (2019), observándose una gran prevalencia del alelo *IRC7^S* dentro de la población de cepas vínicas (85%). Además, por primera vez, se demostró que este alelo

DISCUSIÓN GENERAL

aparece también, aunque con una prevalencia menor, en otros linajes domesticados como *Wine-PDM* y *Beer2*, ambos definidos como grupos intermedios entre las cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* (Dunn *et al.*, 2012; Gallone *et al.*, 2016). Sin embargo, el alelo *IRC7^S* se mostró completamente ausente en el resto de los linajes domesticados (*Beer1* y *Sake*) -más alejados filogenéticamente del linaje *Wine-* y en todos los linajes salvajes estudiados (*Philippines*, *North America and Japan*, *West Africa* y *Malaysia*). Estas evidencias sugieren que la gran prevalencia del alelo *IRC7^S*, especialmente alta entre las cepas vínicas, pudo haber sido favorecida durante el proceso de domesticación de *S. cerevisiae*. Esta hipótesis sobre el origen del alelo *IRC7^S* se ve reforzada por los resultados mostrados en el capítulo 2 de esta Tesis, en los que no se observó el alelo *IRC7^S* del correspondiente gen ortólogo en ninguna de las cepas vínicas analizadas de *T. delbrueckii* (Belda *et al.*, 2017c). Aunque es una especie con relativa cercanía filogenética a *S. cerevisiae*, la diversificación entre ambas especies se produjo antes incluso del evento de WGD (Dashko *et al.*, 2014), millones de años antes del inicio del proceso de domesticación de *S. cerevisiae*. Durante este proceso, se produjo la selección artificial de cepas altamente adaptadas al nicho antrópico que es el vino, lo que permite, su explotación a nivel industrial (Steensels *et al.*, 2019). A lo largo de la domesticación, se produce, además, la aparición de variantes alélicas en determinados genes que, como consecuencia de sus implicaciones fenotípicas, mejoraron la adaptación y el desarrollo industrial de las cepas, pudiendo identificarse como marcadores genómicos de domesticación (Marsit y Dequin, 2015). En este sentido, la distribución de alelos de *IRC7* en las poblaciones vínicas de *S. cerevisiae* parece ser contraintuitiva con el resultado esperable de un proceso de selección artificial, donde las cepas que homocigotas para el alelo *IRC7^F* (HF), codificante para una enzima altamente relacionada con la producción de aromas agradables en fermentaciones de vinos blancos, podrían haber sido favorecidas. Sin embargo, como se dijo anteriormente, las cepas homocigotas para el alelo delecionado *IRC7^S* (HS), menos eficaces para la producción de dichos aromas, son mayoritarias en las poblaciones vínicas. Para entender esta situación, se realizó un estudio fenotípico en busca de patrones de crecimiento dependientes del genotipo *IRC7*, más allá de la actividad β -liasa de la enzima *Irc7p*, que expliquen la alta prevalencia de las cepas HS en el ambiente vínico.

6.2.1 Implicaciones fenotípicas del genotipo *IRC7* en las cepas de *S. cerevisiae*

El fenotipado de las cepas vínicas de *S. cerevisiae*, en representación de cada uno de los 3 genotipos de *IRC7*, reveló una clara ventaja fenotípica de las cepas HS (portadoras del alelo *IRC7^S* en homocigosis) a nivel de *fitness* general (fases de latencia más cortas y mayores tasas de crecimiento en la mayoría de las condiciones ensayadas) (Figura 9) y de capacidad competitiva Figuras 11, asociada a una mayor resistencia a toxinas *killer* (Figura 12) y capacidad de crecimiento pseudofilamentoso (Figura 13), además de un patrón específico de producción de metabolitos al final de la fermentación vínica (Figura 10A). Una menor duración de la fase de latencia y una mayor velocidad de crecimiento (asociada a una mayor tasa de proliferación), a pesar de no mostrar una mayor eficiencia, implican una clara ventaja en las cepas HS para dominar la sucesión microbiana que ocurre durante la fermentación del vino (Schmidt *et al.*, 2020). Así, esta ventaja fenotípica de las cepas HS -portadoras del alelo *IRC7^S*- además podría explicar la mayor prevalencia del alelo *IRC7^S* en las poblaciones vínicas de *S. cerevisiae*.

Sin embargo, la razón por la cual las cepas HS no dominan, de una forma tan estricta, en otras poblaciones domesticadas como las pertenecientes a los linajes *Wine-PDM*, *Beer* o *Bread*, aún es un interrogante. Una posible explicación es que estas poblaciones, comparadas con la población vínica, se desarrollan en procesos fermentativos (fermentaciones secundarias de vino, cerveza o pan) que parten de sustratos o materias primas con menor diversidad microbiana –incluso a veces pasteurizados- donde las cepas no están tan expuestas a una alta presión competitiva como ocurre en el mosto de uva (Conacher *et al.*, 2019). Además, apoyando esta hipótesis se puede destacar el hecho de que al pH del mosto de cerveza (en torno a 5), las toxinas *killer* no están activas (Marquina *et al.*, 2002), por lo que el fenotipo de las cepas HS, relacionado con una posible mayor resistencia a toxinas *killer* (Figura 12), no supondría una ventaja tan clara.

Con el objetivo de ayudar a entender las bases de la ventaja fenotípica observada en las cepas HS, asumiendo que la función de la enzima *Irc7p* no es suficiente para explicar el amplio espectro de condiciones donde las cepas HS presentan un fenotipo ventajoso, se llevó a cabo un estudio genómico para identificar variantes de secuencia conservadas en el genoma de las cepas de este genotipo, y ausentes en el genoma de las cepas HF (Tabla 2), identificando aquellas variantes de secuencia que presentaban tasas de co-ocurrencia significativas con el alelo *IRC7^S* en el genoma de *S. cerevisiae* (Tabla 3). Entre ellas, como es lógico, se encuentra la delección de 38 pb del gen *IRC7*. La enzima

DISCUSIÓN GENERAL

codificada por este gen puede tener implicaciones en el crecimiento de *S. cerevisiae* en algunas condiciones específicas, debido a su papel en el metabolismo de la cisteína y la metionina. Santiago y Gardner (2015b) propusieron un posible papel de la enzima codificada por el alelo *IRC7^F* en la homeostasis de la cisteína, demostrando su actividad cisteína-desulfurasa. Así, una enzima Irc7p completamente funcional -codificada por el alelo *IRC7^F*- podría comprometer la disponibilidad intracelular de cisteína. Debido a la importancia de la cisteína en la producción de glutatión, *IRC7* puede tener un rol relevante en la protección frente al estrés oxidativo en los ambientes fermentativos (García-Ríos y Guillamón, 2019).

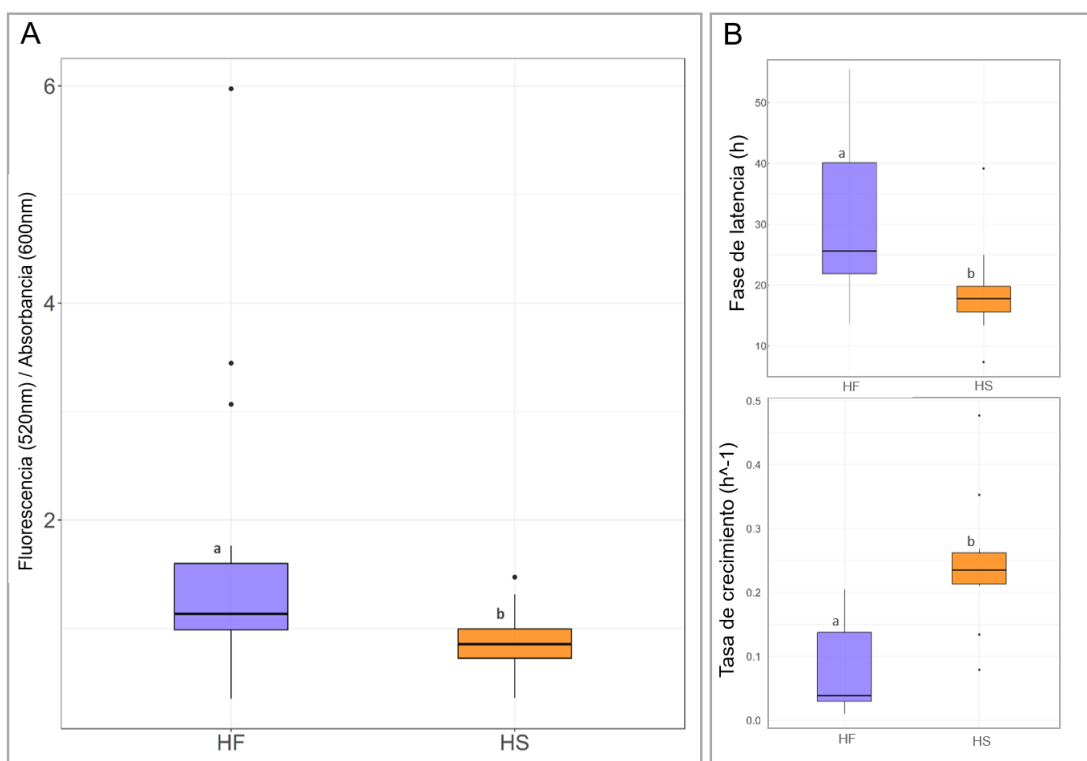


Figura 29: **A)** Producción media de especies reactivas del oxígeno (ROS) evaluada en las cepas tras un tratamiento con 2mM de menadiona usando dihidrorodamina123 como indicador de estrés oxidativo. Los gráficos representan los niveles de estrés oxidativo medios en todas las cepas de cada grupo genotípico *IRC7*. **B)** Parámetros de crecimiento evaluados bajo la presencia de 375 μM de CuCl₂. Los gráficos representan la media de los valores de cada parámetro en cada grupo genotípico *IRC7*. Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas para cada parámetro ($p < 0,05$).

Para comprobar esta hipótesis se realizó un ensayo en el que se sometió a las cepas de estudio a un agente causante de estrés oxidativo. Bajo estas condiciones experimentales, y considerando los niveles medios de estrés oxidativo en las levaduras de los diferentes grupos genotípicos para *IRC7*, las cepas HS presentaron un daño oxidativo algo menor que las cepas HF (Figura 29A). Además, cabe remarcar la existencia de una variante de secuencia detectada en el gen *MAP1*, que co-ocurre significativamente con el alelo *IRC7^S*,

debido a que, al igual que *IRC7*, participa en el metabolismo de la metionina. Este aminoácido tiene una gran importancia tanto en las cinéticas fermentativas de las levaduras como en el aroma del vino (Gutiérrez *et al.*, 2013).

Por otro lado, se postula que *IRC7*, cuya expresión, además de por represión catabólica por nitrógeno, se encuentra regulada por la disponibilidad de cobre, también podría tener un papel en la tolerancia a este metal (Cordente *et al.*, 2019). Los compuestos a base de cobre son comúnmente usados como agentes fitosanitarios en los viñedos, así como, en ciertas ocasiones, para contrarrestar ciertas desviaciones sensoriales asociadas a la reducción de los vinos durante su elaboración (Swiegers y Pretorius, 2007). Cordente *et al.* (2019) propusieron que una enzima *Irc7p* con una habilidad reducida para degradar cisteína (*Irc7p^S*) podría asegurar una mayor concentración intracelular de este aminoácido, esencial para la síntesis de metalotioneínas ricas en cisteína, como *Cup1p*. Así, el efecto de la alta concentración de cobre en la capacidad de crecimiento de las cepas fue estudiado. La Figura 29B representa los parámetros de crecimiento de los grupos genotípicos HS y HF en un medio suplementado con 375 μM de CuCl_2 . Las cepas HS muestran un mejor crecimiento general en este medio suplementado con Cu, con fases de latencia más cortas y mayores tasas de crecimiento, de media, comparadas con las cepas HF. Estas diferencias medias entre las cepas HF y HS fueron significativamente mayores que en el medio control de crecimiento en glucosa (Glu 2%) ($p < 0,05$). Las cepas HS crecen de promedio con una tasa 60% mayor y una fase de latencia 78% menor que las cepas HF en el medio suplementado con cobre. Sin embargo, en el medio control de glucosa (2%) las cepas HS muestran una tasa un 32,2% mayor y una fase de latencia 18% menor que las cepas HF.

6.2.2 Variantes de secuencia de otros genes asociadas al alelo *IRC7^S* y sus potenciales implicaciones fenotípicas

El análisis genómico de las cepas con diferente genotipo *IRC7* permitió identificar una serie de variantes de secuencia que co-ocurren significativamente con el alelo *IRC7^S*, y que podrían tener una implicación fenotípica, diferente a las actividades metabólicas de *Irc7p*, que pueden ayudar a explicar el fenotipo definitorio encontrado en las cepas HS (Figura 14 y Tablas 3 y 4). Entre las variantes de secuencia podemos destacar las que afectan al gen *SDHI*. Este gen está involucrado en el metabolismo respiratorio de las levaduras ya que codifica la subunidad flavoproteica de la de la succinato deshidrogenasa (SDH), que oxida el succinato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Durante la

DISCUSIÓN GENERAL

fermentación, aunque el ciclo TCA es interrumpido al nivel del complejo SDH, el succinato sigue produciéndose por la rama oxidativa del ciclo (Camarasa *et al.*, 2003). La transición a un metabolismo respiratorio y el mantenimiento de un determinado nivel respiratorio durante la fermentación tiene un impacto directo en la capacidad de producir etanol y, por tanto, en la capacidad de competición durante la fermentación del vino (Gasmi *et al.*, 2014). Aunque se necesitan más estudios para entender el papel de *SDHI* en el metabolismo del succinato, la mutación descrita en este estudio podría tener importancia en el metabolismo del succinato el mantenimiento de la actividad respiratoria durante la fermentación. Además, las variantes de secuencias encontradas en los genes *VHS1* y *APC4*, también deben ser estudiadas en detalle por su potencial contribución al *fitness* ventajoso en las cepas HS. Brevemente, *VHS1* codifica para una proteína quinasa activada por la disponibilidad de glucosa, y ha sido descrito como un miembro del *fermentoma* -que incluye genes requeridos para llevar a cabo la fermentación vínica en *S. cerevisiae*- (Walker *et al.*, 2014), y *ACP4* es codificante para una enzima ubiquitina ligasa involucrada en la degradación de inhibidores de la anafase, y la reducción de su actividad puede estar asociada con un incremento en el *fitness* competitivo (Breslow *et al.*, 2008).

La ventaja competitiva de las cepas HS puede explicarse también mediante su mayor resistencia a toxinas *killer* comparada con las cepas HF, demostrada en el estudio fenotípico (Figura 12). En este sentido, Serviené *et al.* (2012) demostraron que *VPS10* – uno de los genes en los que identificó una serie de mutaciones con una tasa de co-ocurrencia significativa con el alelo *IRC7^S*- puede jugar un papel en la sensibilidad a la toxina *killer* K2, asociada a un defecto en la osmorregulación celular. Por ello, estas variantes de secuencia de *VPS10* pueden estar jugando un papel importante en los patrones de resistencia a toxinas *killer* encontrados en la mayoría de las cepas HS. Además, las variantes de secuencia detectadas en el gen *PAU6* también parecen estar asociadas al fenotipo *killer* observado en las cepas HS. El gen *PAU6* es miembro de la familia génica *PAU*, que parece tener un papel específico en la adaptación de las levaduras al estrés ambiental, y en su *fitness* durante la fermentación alcohólica (Luo y Van Vuuren, 2009). En el caso de *PAU5*, se ha demostrado un papel directo en la resistencia frente a toxinas *killer* (Rivero *et al.*, 2015). Aunque la función de *PAU6* aún es desconocida, el alto porcentaje de identidad entre las proteínas Pau6p y Pau5p, permite hipotetizar que la variante de secuencia encontrada en *PAU6* también puede estar involucrada en la resistencia a toxinas *killer*.

RSF1, otro gen en el que se identificaron variantes de secuencia con tasas de co-ocurrencia significativas con el alelo *IRC7^S*, codifica para un factor transcripcional involucrado en la transición hacia el metabolismo respiratorio. Es, además, necesario para el uso de etanol y glicerol como fuentes de carbono (Lu *et al.*, 2003) y está involucrado en el proceso de esporulación. De hecho, Gerke *et al.* (2009) demostraron que la variante genética identificada para *RSF1* en este trabajo, (D181G) está ausente en las cepas salvajes de *S. cerevisiae*, que muestran una mayor eficiencia en la esporulación, pero se encuentra en la mayoría de las cepas aisladas en viñedos. Los resultados de este estudio refuerzan esta observación, ya que muestran que la mutación de *RSF1*, solo fue encontrada en las cepas vínicas de *S. cerevisiae*, estando completamente ausente en cualquier otro linaje domesticado. En las cepas salvajes de *S. cerevisiae*, el ciclo de vida sexual -y por tanto la reproducción por esporulación- está favorecido, a diferencia de las cepas domesticadas con un ciclo de vida predominantemente asexual (Liti, 2015). Así, aunque aún son necesarios más estudios para demostrar la ventaja de las cepas con la mutación en *RSF1* de sobrevivir en ambientes vínicos, estos resultados sugieren que esta variante de secuencia ha sido seleccionada en el proceso de domesticación de las cepas vínicas de *S. cerevisiae*.

Ya que la esporulación y la pseudofilamentación son comportamientos excluyentes (Cullen *et al.*, 2012), dando este último una ventaja en la búsqueda de alimento en ambientes limitantes en nutrientes, como lo es la fermentación del vino (Carstens *et al.*, 1998), resulta interesante que el crecimiento pseudofilamentoso fue observado en todas las cepas HS en condiciones de limitación de nutrientes nitrogenados, pero solo en el 30% de cepas HF. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la variante de secuencia encontrada en *RSF1* reduce la eficiencia de esporulación en las cepas vínicas, con un impacto indirecto en el incremento de la habilidad de crecimiento pseudofilamentoso en la mayoría de las cepas HS. Por ello, el estudio de la capacidad de crecimiento pseudofilamentoso puede permitir asociar el fenotipo de las cepas con la variante alélica *RSF1* y, en consecuencia, con el genotipo *IRC7*. Este resultado apoya la posible asociación entre la variante alélica de *RSF1* y la habilidad de crecimiento pseudofilamentoso de las levaduras, principalmente observado en las cepas HS. Debido a que el crecimiento pseudofilamentoso puede tener implicación, esta habilidad en las cepas HS puede ayudar a explicar la mayor prevalencia y mejor *fitness* demostrados en este tipo de ambientes.

DISCUSIÓN GENERAL

A modo de conclusión, el efecto individual de todas estas variantes genéticas podría explicar alguna de las observaciones fenotípicas observadas en este estudio. Sin embargo, debido a su alta tasa de co-ocurrencia con el alelo *IRC7^S*, se puede hipotetizar que es el conjunto de estas variantes genéticas el que podría definir el contexto genético que explica las inesperadas características fenotípicas encontradas en las cepas HS. Aunque se necesitan estudios complementarios para entender las implicaciones fenotípicas de estas mutaciones identificadas, los resultados obtenidos en este estudio contribuyen a explicar la marcada distribución de los alelos *IRC7* en los linajes de *S. cerevisiae*. El gen *IRC7* ha sido ampliamente estudiado debido a que es uno de los genes más importantes en la producción de tioles varietales que caracterizan el aroma de ciertas variedades de vinos blancos. Sin embargo, su paradójica distribución entre las cepas de *S. cerevisiae*, con una gran prevalencia del alelo menos funcional de este gen, apenas había sido comprendida hasta ahora, y solo se habían propuesto hipótesis sin demostrar. En este trabajo, el extensivo estudio genotípico permitió entender la distribución global de los alelos de *IRC7* entre los distintos linajes filogenéticos de *S. cerevisiae*, identificando aquellas cepas con un mayor potencial en la liberación de tioles. Además, el estudio fenotípico permitió asociar el genotipo HS de las cepas vnicas con un *fitness* ventajoso, que podría explicar su mayor prevalencia en las poblaciones vnicas. Por último, se logró la identificación de las mutaciones acompañantes del alelo *IRC7^S*, candidatas a explicar la mayor prevalencia de las cepas HS de *S. cerevisiae* y su ventaja fenotípica.

Estos resultados confirman que la gran mayoría de las cepas vnicas de *S. cerevisiae* tienen una capacidad limitada de producir tioles aromáticos, como consecuencia de que la presencia del alelo *IRC7^S*, codificante para una enzima menos funcional (*IRC7^S*), está asociada a una ventaja fenotípica que implica una mayor prevalencia en la población de cepas vnicas. Esto no parece ser así en otras especies de no-*Saccharomyces*, donde la actividad β -liasa se encuentra más extendida entre las cepas (Belda *et al.*, 2016a). En este contexto, ante las limitaciones de *S. cerevisiae*, la búsqueda y aplicación de levaduras no convencionales supone una interesante estrategia para incrementar el contenido de aromas tiólicos en los vinos. Así, el estudio mostrado en el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral permitió explorar el papel que tienen dos especies no-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii* y *M. pulcherrima*) como herramientas biológicas para la mejora de las propiedades sensoriales del vino a través del incremento en la producción de aromas tiólicos varietales.

6.3 Levaduras no-*Saccharomyces* como herramienta en la mejora del perfil sensorial de los vinos

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio sobre la aplicación de las levaduras no-*Saccharomyces* para la producción de vinos, debido a su gran potencial enzimático, suponen un prometedor campo de estudio para la mejora de su perfil sensorial. Un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, a través del desarrollo de un medio de cultivo que utiliza, como única fuente de nitrógeno, un análogo del precursor tiólico Cys-4MPS (S-metil-L-cisteína), permitió la selección de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* con una alta actividad β -liasa, relacionada directamente con la producción de tioles (Belda *et al.*, 2016b). Entre ellas, destacó la cepa de *T. delbrueckii* Viniferm NS-TD, por lo que se decidió estudiar su incidencia en la producción de tioles varietales en condiciones de vinificación. Además, se seleccionó la cepa de *M. pulcherrima* NS-EM-34 para este estudio. A pesar de que las cepas de *M. pulcherrima* muestran una moderada actividad β -liasa (Belda *et al.*, 2016a), la aplicación de esta cepa en fermentaciones semi-industriales en vino tinto demostró una contribución positiva en ciertas propiedades tecnológicas del vino (Belda *et al.*, 2016c), por lo que se decidió ampliar la caracterización enológica de esta cepa en referencia a su contribución al perfil tiólico de vinos blancos. De esta forma, se estudió la incidencia de ambas cepas no-*Saccharomyces* en la mejora del perfil sensorial en fermentaciones de mosto Verdejo - variedad rica en precursores tiólicos- en inoculaciones secuenciales junto con dos cepas de *S. cerevisiae* (Viniferm Diana y Viniferm Revelación), cada una de las cuales representa un genotipo *IRC7* diferente (HS y HF, respectivamente) y, por tanto, diferente actividad β -liasa.

6.3.1 Impacto de las levaduras no-*Saccharomyces* en los parámetros enológicos básicos

La inoculación secuencial en las fermentaciones mixtas permitió el desarrollo de las poblaciones no-*Saccharomyces* durante los primeros cuatro días, necesario para poder poner de manifiesto los efectos de estas especies en la fermentación, ya que el mayor vigor fermentativo de *S. cerevisiae* puede impedir el suficiente desarrollo de las poblaciones de la especie no-*Saccharomyces*. En fermentaciones mixtas en las que se inoculó conjuntamente *S. cerevisiae* y *M. pulcherrima* (Varela *et al.*, 2017) o *T. delbrueckii* (Belda *et al.*, 2015) al inicio de la fermentación, se ha observado una limitada influencia de las especies no-*Saccharomyces* en las propiedades del vino. Las cinéticas

DISCUSIÓN GENERAL

poblacionales en las fermentaciones secuenciales mostraron diferencias respecto a las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae*. En primer lugar, la inoculación con la cepa de *S. cerevisiae* supuso un rápido desplazamiento de las poblaciones no-*Saccharomyces* ensayadas, aunque con diferencias entre las dos especies. Mientras que la población de *M. pulcherrima* mostró un rápido descenso desde el momento de la inoculación de *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* aún pudo crecer hasta aproximadamente el día siete de fermentación, compitiendo con *S. cerevisiae* hasta este momento (Figura 16). Este hecho se explica por la mayor capacidad fermentativa y tolerancia al etanol de *T. delbrueckii* comparada con *M. pulcherrima* (Ramírez y Velázquez, 2018). Además, las fermentaciones secuenciales mostraron cinéticas poblacionales y fermentativas más lentas, en comparación con las fermentaciones individuales. También se observó un retraso en la finalización de la fermentación -también observado usando la misma cepa de *T. delbrueckii* en vino tinto (Belda *et al.*, 2015) y en otras cepas de *T. delbrueckii* (Velázquez *et al.*, 2015). Además, en las fermentaciones secuenciales con ambas cepas no-*Saccharomyces*, *S. cerevisiae* alcanzó una menor concentración celular máxima y una menor tasa máxima de consumo de azúcares. Aunque estos efectos negativos se pueden explicar por la menor disponibilidad de nutrientes provocada por la co-inoculación de las cepas no-*Saccharomyces* (Lleixà *et al.*, 2016), se han descrito diferentes fenómenos de interacción intraespecífica entre levaduras en fermentaciones mixtas que pueden explicar este efecto. Se han descrito varias cepas de *T. delbrueckii* como productoras de toxinas *killer* que pueden tener un efecto frente a *S. cerevisiae* (Ramírez *et al.*, 2015; Villalba *et al.*, 2016). También se ha observado la producción de vesículas extracelulares en *T. delbrueckii*, que pueden tener un efecto inhibitorio contra *S. cerevisiae* y otras levaduras (Mencher *et al.*, 2020). Aunque se ha descrito la capacidad de *M. pulcherrima* de inhibir el crecimiento de ciertas especies de levadura a través de la producción de ácido pulcherrimínico, *S. cerevisiae* parece no ser sensible a este compuesto (Kántor *et al.*, 2019). Sin embargo, este compuesto, por su capacidad como quelante de hierro, sí que podría tener un efecto en la disponibilidad de este metal, esencial para ciertos procesos celulares (Oro *et al.*, 2014). De hecho, la inoculación secuencial con la cepa de *M. pulcherrima* provocó un descenso mayor en la tasa máxima de consumo de azúcares en la fermentación, pudiendo suponer un mayor efecto negativo de la presencia de esta especie en la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae*, comparado con la presencia de *T. delbrueckii* (Figura 16).

A pesar del efecto negativo en las cinéticas fermentativas de *S. cerevisiae*, la co-inoculación de levaduras no-*Saccharomyces* también mostró un impacto positivo en ciertos parámetros de interés enológico, comparado con las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae* (Tabla 4). Este efecto puede ser debido a la contribución directa del metabolismo de las levaduras no-*Saccharomyces* (Jolly *et al.*, 2014) y al impacto que tienen sobre el metabolismo de *S. cerevisiae*, como consecuencia de las respuestas fisiológicas que tiene la presencia de una especie competidora (Curiel *et al.*, 2017). En primer lugar, el menor vigor fermentativo que tienen las levaduras no-*Saccharomyces* en comparación de las cepas de *S. cerevisiae* -más adaptadas a competir y dominar en ambientes ricos en azúcares gracias a la estrategia de “producir-acumular-consumir”- puede contribuir de forma directa a que las fermentaciones secuenciales alcanzasen un menor contenido en etanol (Dashko *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta la variabilidad entre cepas y las distintas condiciones de fermentación (variedad de mosto, temperatura, contenido en azúcares, etc.) otros estudios han confirmado este efecto en *M. pulcherrima* (Comitini *et al.*, 2011; Varela *et al.*, 2017) y en *T. delbrueckii* (Benito *et al.*, 2015; Belda *et al.*, 2015; Ciani *et al.*, 2016b). Además del interés comercial en la obtención de vinos con menor grado alcohólico, la menor concentración final de etanol puede relacionarse con un impacto positivo en el perfil sensorial de los vinos, aumentando la complejidad aromática de los vinos, ya que puede evitar el efecto enmascarador de componentes aromáticos minoritarios (Frost *et al.*, 2015). Una baja producción de etanol suele estar relacionada con una mayor producción de glicerol. Así, se observó un incremento en el contenido en glicerol en las fermentaciones secuenciales en las que participaron ambos no-*Saccharomyces*. Este efecto se puede explicar por la sobreexpresión de *GDPI* en *S. cerevisiae* (involucrado en la síntesis de glicerol-3-fosfato, intermediario en la síntesis de glicerol), demostrado en co-fermentaciones de *S. cerevisiae* y *M. pulcherrima* (Sadoudi *et al.*, 2017). El incremento en el contenido de glicerol se relaciona, además, con un efecto positivo en la calidad de los vinos, al aportar propiedades de redondez y untuosidad en boca (Gawel *et al.*, 2007).

También se estudió el efecto de las levaduras no-*Saccharomyces* en la concentración final de compuestos con un impacto negativo en la calidad sensorial de los vinos. Aunque una elevada producción de la acidez volátil de los vinos (principalmente determinada por la concentración de ácido acético) fue en un principio asociada a las levaduras no-*Saccharomyces* (Padilla *et al.*, 2016), varios estudios han confirmado que ciertas cepas de especies no-*Saccharomyces* son poco productoras de ácido acético (Gobbi *et al.*,

DISCUSIÓN GENERAL

2013). Comitini *et al.* (2011) observaron una menor producción de ácido acético en *M. pulcherrima* comparada con *S. cerevisiae*. Sin embargo, la concentración final de ácido acético no se vio afectada por la participación de *M. pulcherrima* en la fermentación en este trabajo, resultado también observado en otros estudios (Benito *et al.*, 2015; González-Royo *et al.*, 2015). En el caso de los ensayos con *T. delbrueckii*, aunque no hubo diferencias significativas, sí se observó una ligera disminución en ácido acético comparada con las fermentaciones individuales de ambas cepas de *S. cerevisiae*. Este efecto también fue observado por Azzolini *et al.* (2015) y Belda *et al.* (2015). Por último, analizando la concentración final de acetaldehído (asociado a aromas de oxidación) en los vinos, se observó una reducción significativa en las fermentaciones secuenciales con ambas especies no-*Saccharomyces* comparadas con las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae*. Reducciones similares, en torno a 20 mg/L, también fueron descritas en fermentaciones en las que participada *T. delbrueckii* (Benito *et al.* 2015).

6.3.2 Contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* en la producción de tioles aromáticos

En los últimos años, un apreciable número de estudios ha determinado la contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* en la composición de aromas varietales del vino. A diferencia de los aromas fermentativos, especialmente dependientes del metabolismo de *S. cerevisiae*, las levaduras no-*Saccharomyces*, gracias a su diversidad enzimática, suponen una importante herramienta en la revelación de los aromas varietales en ciertas variedades de uva (Belda *et al.*, 2016a). Como era de esperar, la mayor contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* al perfil aromático observada en los ensayos fermentativos estuvo relacionada con la producción de tioles varietales (Figura 17). En primer lugar, cabe destacar la diferente producción de tioles entre las cepas de *S. cerevisiae* en base a su genotipo *IRC7*. El tiol 4MPS no fue detectado en la fermentación individual con *S. cerevisiae* Viniferm Diana y solo en pequeñas concentraciones en la fermentación con *S. cerevisiae* Viniferm Revelación (resultados explicados por la expresión de los alelos *IRC7* delecionado y completo de las cepas de *S. cerevisiae*, respectivamente). A pesar de que no se ha demostrado una relación directa entre la expresión del gen *IRC7* y la producción del tiol 3SH (Roncoroni *et al.*, 2011), parece que el genotipo *IRC7* de las cepas podría explicar, aunque parcialmente, la producción del tiol 3SH y, en consecuencia, también del tiol 3SHA (derivado por acetilación del 3SH). La complejidad del metabolismo de tioles en *S. cerevisiae* (Figura 3) hace que la producción

de tioles no pueda explicarse enteramente por el genotipo *IRC7* de las cepas, sino que la expresión genética de *IRC7* (Tofalo *et al.*, 2020) u otros genes codificantes de permeasas (Gap1p, Opt1p, Yct1p) y enzimas β -liasas (Str3p), podrían ayudar a explicar estas diferencias encontradas.

Respecto a la influencia de las levaduras no-*Saccharomyces*, en este trabajo se observó el efecto de *M. pulcherrima* en la disminución de la concentración de los tioles 3SH y 3SHA, pero también en el notable incremento en la concentración de 4MSP, con un gran impacto sensorial debido a su extremadamente bajo umbral de percepción (Swiegers *et al.*, 2005). Sadoudi *et al.* (2012) también observaron un efecto similar en las concentraciones de 3SH y 3SHA usando otra cepa de *M. pulcherrima*, aunque con una disminución en la concentración de 4MSP. Esta diferencia puede explicarse por el hecho de que la cepa de *M. pulcherrima* NS-EM-34 fue seleccionada previamente por mostrar, aunque de forma moderada, actividad β -liasa (Belda *et al.*, 2016b). En el caso de *T. delbrueckii*, aunque también se demostró previamente su capacidad de incrementar la concentración de los tioles 3SH y 3SHA en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae* (Zott *et al.*, 2011), se ha observado una pobre producción de 4MSP (Murat *et al.*, 2001; Coetzee y du Toit, 2012). Este hecho fue observado también con otra cepa industrial de *T. delbrueckii*, demostrándose un efecto sinérgico entre *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en la fermentación, con un incremento en la producción de 3SH, explicado por una gran habilidad de la asimilación de precursores glutationilados en *T. delbrueckii* (Renault *et al.*, 2016). Los resultados presentados en dicho trabajo describen un comportamiento opuesto con el de la cepa industrial de *T. delbrueckii* Viniferm NS-TD utilizada, la cual no solo incrementó la concentración de 3SH en las fermentaciones secuenciales, sino que también mostró un gran incremento en la concentración de 4MSP. La producción de este tiol, a partir de la ruptura de su precursor cisteinilado, ha sido directamente relacionada con la expresión del gen *IRC7* (Thibon *et al.*, 2008) y con el genotipo *IRC7* de las cepas (Roncoroni *et al.*, 2011). Como se ha expuesto en el capítulo 1, la mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son homocigotas para el alelo delecionado, y menos funcional, de *IRC7*. Para entender la diferencia en la producción de 4MSP en ambas especies se procedió a la identificación y caracterización del gen ortólogo de *IRC7* en *T. delbrueckii*. Se encontró homología, tanto a nivel transcripcional como proteico, entre ambos genes en los genomas de referencia de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Además, se observó que, al contrario que ocurre entre las cepas vínicas de *S. cerevisiae*, el alelo completo del gen ortólogo de *IRC7* se identificó en todas las cepas vínicas de *T. delbrueckii* analizadas.

DISCUSIÓN GENERAL

Teniendo en cuenta este resultado, se puede suponer una mayor actividad β -liasa global dentro de las cepas de esta especie, comparada con las cepas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, la relación filogenética entre ambos genes de las dos especies, a pesar de tener homología, parece ser notablemente distante. Este hecho hace que sean necesarios estudios sobre como las diferencias en la estructura y en la regulación transcripcional de ambas proteínas pueden explicar la gran capacidad de algunas cepas de *T. delbrueckii* en la liberación de aromas tiólicos en condiciones de fermentación. En el caso de *M. pulcherrima*, no se identificó el gen ortólogo de *IRC7*. El incremento en la producción de tioles por parte de esta especie lleva a especular sobre el posible papel que tendrían otros genes, tanto transportadores de cisteína (*AGP1*, *BAP2* y *GNP1*) o glutatión (*OPT1* y *FOT1*) como enzimas con actividad β -liasa (*STR3* y *CYS3*), en la liberación de tioles volátiles (Santiago y Gardner, 2015a). Por tanto, serán necesarios estudios adicionales sobre la identificación de estos genes en *M. pulcherrima* y otras especies no-*Saccharomyces*, así como estudios a nivel transcripcional, que puedan mostrar los diferentes niveles de expresión que expliquen la mayor producción de tioles por parte de estas levaduras.

Finalmente, cabe destacar que, a pesar de estos resultados sobre el papel de las levaduras no-*Saccharomyces* en la mejora del perfil tiólico de los vinos, aún permanecen sin resolver ciertas incógnitas sobre el proceso de producción de tioles varietales. Estudios previos en los que se emplearon mostos naturales de uva, mostraron una baja correlación entre la concentración de los precursores cisteinilados y glutationilados y la concentración final de tioles en la fermentación (Pinu *et al.*, 2012). Además, se han encontrado altas concentraciones de precursores tiólicos residuales en los vinos al finalizar la fermentación, a pesar de las altas concentraciones de tioles libres en el vino (Capone *et al.*, 2011). Algunos estudios han propuesto que ciertos compuestos carbonilos insaturados pueden actuar como precursores alternativos en el mosto. Por ejemplo, debido a la similitud en la estructura química con la molécula de 3SH, el *E*-2-hexenal se ha propuesto como precursor alternativo, mientras que el óxido de mesitilo lo ha sido para el tiol 4MSP. Schneider *et al.* (2006) propusieron que los tioles 4MSP y 3SH podrían producirse por la combinación del H_2S -subproducto del metabolismo de las levaduras durante la fermentación- y el *E*-2-hexenal o el óxido de mesitilo, respectivamente, que se encuentra en algunas variedades de uva a concentraciones de partes por billón. De forma similar, Duhamel *et al.* (2015) describieron una reacción por la cual determinados ácidos sulfónicos (el ácido 1-hidroxihexan-3-sulfónico o el ácido 2-metil-4-oxopentan-2-

sulfónico) podrían formarse por la reacción del sulfito y carbonilos insaturados (*E*-2-hexenal y óxido de mesitilo, respectivamente). La reducción de estos ácidos resultantes llevaría a la formación de los correspondientes tioles, 3SH y 4MSP (Revisado por Ruiz *et al.*, 2019a).

En este contexto, los resultados preliminares de un trabajo complementario a esta Tesis Doctoral sugieren o aportan evidencias adicionales sobre la posible importancia de esa ruta biogénica en la producción de tioles. En este trabajo, se analizó la capacidad liberación de tioles de una cepa de *L. thermotolerans* (NS-G-32) en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae*, bajo las mismas condiciones que los estudios detallados en el capítulo 2. Como se ve en la Figura 30A, se observó una producción de tioles extremadamente alta, tanto de 4MSP como 3SH, muy por encima incluso de la observada en las fermentaciones secuenciales de *T. delbrueckii*. Estos resultados apoyan la posibilidad de que otros procesos metabólicos pueden estar implicados en la liberación de tioles, e incluso otros precursores tiólicos.

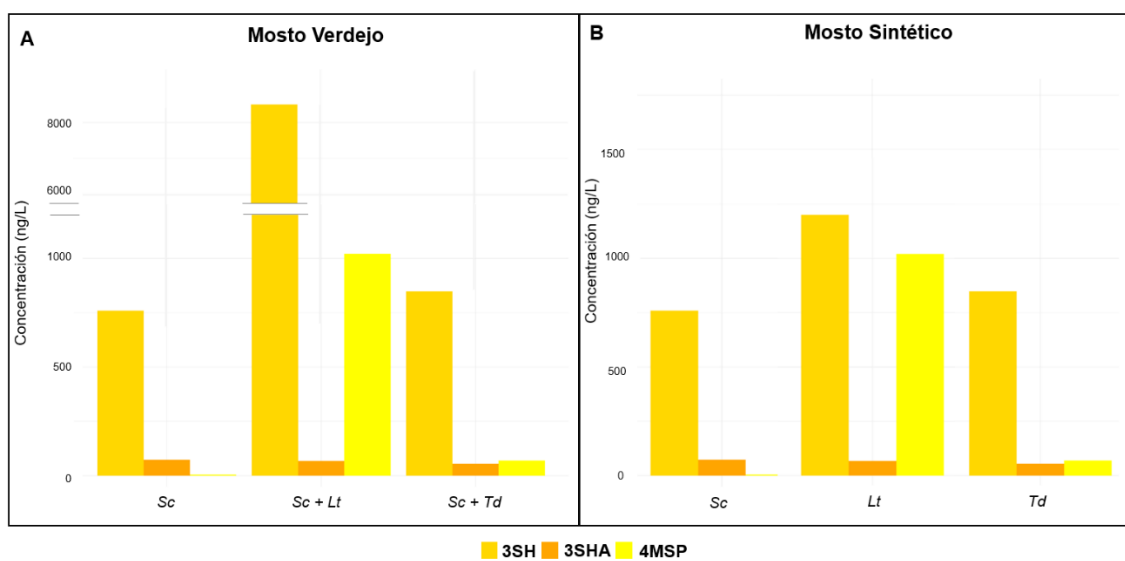


Figura 30: Producción de tioles varietales (3SH, 3SHA, 4MSP) en los distintos ensayos fermentativos con *S. cerevisiae* (Sc), *L. thermotolerans* (Lt) y *T. delbrueckii* (Td) en fermentaciones individuales y secuenciales (Sc+Lt y Sc+Td). **A)** Fermentaciones realizadas en mosto natural de uva (var. Verdejo). **B)** Fermentaciones realizadas en mosto sintético de uva, suplementado con los precursores tiólicos (Cys-4MSP, Cys-3SH, Cys-Gly-4MSP, Cys-Gly-3SH, GSH-4MSP y GSH-3SH).

Para explorar esta posibilidad se realizaron fermentaciones en mosto sintético sin aminoácidos, en el que se añadieron, además de los precursores habituales -conjugados con cisteína o glutatión- los precursores intermedios CysGly-3SH y CysGly-4MSP, también encontrados en el mosto de uva. Se llevaron a cabo las fermentaciones individuales de ambas especies no-*Saccharomyces*, con el objetivo de estudiar el papel

DISCUSIÓN GENERAL

directo de estas levaduras en la producción de tioles. Se confirmó la elevada capacidad de producción de tioles de las dos especies no-*Saccharomyces*, especialmente de *L. thermotolerans* (Figura 30B). Estos resultados hacen de *L. thermotolerans* un interesante modelo para estudiar nuevas rutas de biogénesis de tioles, no relacionadas con la actividad β -liasa de las levaduras, y el papel de precursores tiólicos alternativos en este proceso.

6.3.3 Impacto de las levaduras no-*Saccharomyces* en el perfil sensorial de los vinos

Además del efecto de las levaduras no-*Saccharomyces* en la concentración de tioles en el vino, también se estudió la contribución de estas levaduras el perfil químico general del vino tomando en conjunto las concentraciones finales de metabolitos (volátiles y no volátiles) producidos durante la fermentación (Figura 31).

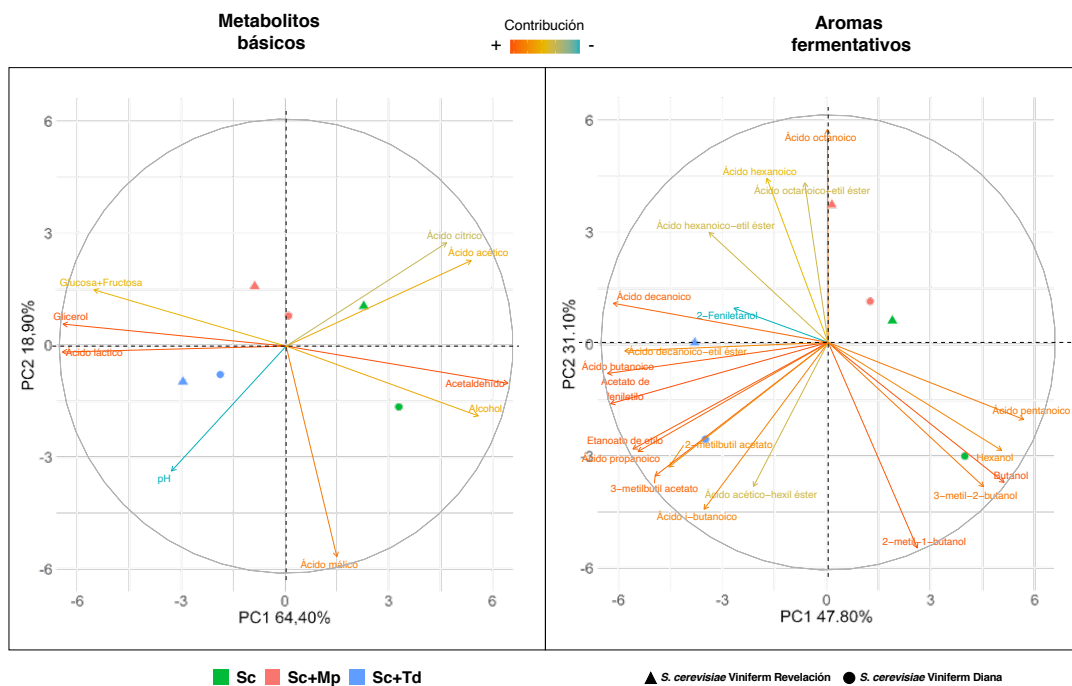


Figura 31: Ordenación de datos (PCA) de concentración de los metabolitos (no volátiles y volátiles) producidos al final de las fermentaciones del estudio presentado en el capítulo 2. Los vectores representan la contribución de cada metabolito cuantificado a la ordenación de datos.

A pesar del menor impacto de *T. delbrueckii* observado en las cinéticas fermentativas y poblacionales de *S. cerevisiae* (Figura 16), se pudo determinar que la contribución de *T. delbrueckii* a la diferenciación del perfil de metabolitos de los vinos con respecto a las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae*, fue mayor que la contribución de *M. pulcherrima*. La mayor capacidad fermentativa de *T. delbrueckii*, comparada con otras especies no-*Saccharomyces* como *M. pulcherrima*, llevó a un mayor tiempo de

coexistencia en fermentación con *S. cerevisiae*, lo que puede explicar su mayor contribución al perfil químico del vino. La concentración final de glicerol, ácido cítrico y acetaldehído fueron los parámetros que más contribuyeron a la diferenciación entre las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae* y las fermentaciones secuenciales con las levaduras no-*Saccharomyces*, en el caso de los metabolitos no volátiles. En el caso de los compuestos volátiles, la producción de ésteres fue el principal factor que contribuyó a la diferenciación entre las fermentaciones de *S. cerevisiae* y las fermentaciones secuenciales con *T. delbrueckii*, y la producción de ciertos alcoholes superiores, como el 2-metil-1-butanol, en el caso de las fermentaciones secuenciales con *M. pulcherrima*.

Aunque *S. cerevisiae*, al llevar a cabo la mayor parte del proceso fermentativo, es la principal levadura responsable de la síntesis de ésteres, las levaduras no-*Saccharomyces* también pueden tener un impacto importante en la liberación de aromas fermentativos. Así, cabe destacar que el uso de ambas levaduras no-*Saccharomyces* en co-fermentación con *S. cerevisiae* contribuyó a la reducción de la concentración de alcoholes superiores en los vinos (Figura 18). Este efecto puede ayudar a reducir un excesivo grado alcohólico del vino y su efecto enmascarador de otros aromas (Rapp y Mandery 1986). Esta disminución también fue demostrada en otros estudios de co-inoculación de *S. cerevisiae* con *T. delbrueckii* (Benito *et al.*, 2015) y *M. pulcherrima* (Varela *et al.*, 2016). Sin embargo, también se han observado incrementos en la concentración de alcoholes superiores en ambas especies no-*Saccharomyces* bajo condiciones similares (Azzolini *et al.*, 2015; Sadoudi *et al.*, 2012). La complejidad de la regulación de la ruta de Ehrlich, responsable de la producción de este tipo de compuestos, puede suponer una gran diversidad entre cepas, tanto *S. cerevisiae* como no-*Saccharomyces*, que pueden explicar estas diferencias (Gamero *et al.*, 2016).

También se observó un efecto de las levaduras no-*Saccharomyces* en la concentración de ésteres en los vinos. En la bibliografía se ha descrito que la inoculación de *M. pulcherrima* tiende a mejorar el perfil final de ésteres (Sadoudi *et al.*, 2012; Contreras *et al.*, 2014; Dutraive *et al.*, 2019), especialmente en la concentración de etil octanoato, relacionado con aromas a pera (Lambrechts y Pretorius, 2000). Sin embargo, en los ensayos de co-inoculación con *M. pulcherrima* de este estudio, no se observó un incremento claro en la concentración final de ésteres, aunque cabe mencionar que, en las primeras etapas de la fermentación, coincidiendo con los días iniciales en los que *M. pulcherrima* se encontraba como inóculo puro, se percibió un fuerte aroma relacionado con pera, que se perdió con el avance de la fermentación alcohólica. La concentración

DISCUSIÓN GENERAL

final de ésteres también depende de la existencia de enzimas esterazas extracelulares, que pueden contribuir a la pérdida de este tipo de aromas durante la fermentación (Ubeda-Iranzo *et al.*, 1998). En el caso de la co-inoculación con *T. delbrueckii* si se observó un incremento más notable en la concentración de ésteres, aumentando el impacto positivo de compuestos como el 2-fenil-acetato o el 2-fenil-etanol, alcanzándose valores por encima de su umbral de percepción (Swiegers *et al.*, 2005). También hay que tener en cuenta que la co-inoculación con *T. delbrueckii* incrementó la concentración de ésteres, como el acetato de etilo, que pueden tener un impacto negativo en el aroma del vino si se alcanzan concentraciones excesivas. Sin embargo, este incremento no se tradujo en un defecto en el análisis sensorial de los vinos, como se detallará más adelante.

Por último, el impacto que supone la inoculación secuencial de ambas cepas no-*Saccharomyces* en la concentración de compuestos volátiles se tradujo en un efecto directo en el perfil sensorial de los vinos (Figura 19). De forma general, se observó una contribución positiva de ambas cepas no-*Saccharomyces* a la calidad sensorial de los vinos, también observada en otras cepas de *T. delbrueckii* (Azzolini *et al.*, 2015) y *M. pulcherrima* (Rodríguez *et al.*, 2010). Esta percepción está directamente relacionada con el incremento de la concentración de los tioles 4MSP, 3SH y 3SHA, especialmente alta en el caso de *T. delbrueckii*. Estos tioles contribuyen de forma determinante a la tipicidad de Verdejo en los vino, aportando aromas relacionados con boj (el 4MSP) y la fruta de la pasión, maracuyá o grosella (el 3SH y 3SHA), principales contribuyentes del aroma afrutado y tropical de los vinos. Este efecto fue potenciado por la disminución de la concentración de alcoholes superiores mostrada en las fermentaciones secuenciales, la cual pudo mejorar la percepción de los aromas varietales. Frost *et al.* (2015) demostraron que el mayor contenido alcohólico de los vinos contribuye a una menor percepción de la complejidad sensorial de los vinos, ya que los compuestos alcohólicos dominantes tienden a eclipsar los aromas minoritarios. Así, las ligeras disminuciones en la graduación alcohólica de los vinos pueden mejorar el umbral de percepción del aroma general expresado en los vinos. Otros estudios demostraron que la reducción de la concentración de alcoholes superiores durante la fermentación vínica mejora la percepción sensorial de aromas varietales (Belda *et al.* 2015). Además, en el caso de *T. delbrueckii* esta mejora en la intensidad aromática puede estar directamente relacionado con el notable incremento que provoca *T. delbrueckii* en la concentración de acetato de feniletilo en el vino, asociado a aromas de miel y florales. Aunque la actividad de algunas enzimas relacionadas con la producción de tioles puede estar asociada a la producción de H₂S, no

se apreciaron aromas de reducción en los vinos en los que se observó un aumento de la concentración de tioles varietales. Por último, si bien no se encontraron diferencias respecto a los aromas a reducción, oxidación y acidez entre las fermentaciones individuales y las secuenciales con las cepas no-*Saccharomyces*, si se observó una mejora en la estructura de los vinos en los que participó *T. delbrueckii*. Aunque en este estudio no se analizó la producción de manoproteínas en la fermentación, otros trabajos han demostrado un incremento en la concentración de estos compuestos derivados de la pared celular de las levaduras en fermentaciones con *T. delbreuckii* (Belda *et al.*, 2015; Belda *et al.*, 2016d).

A modo de conclusión, la co-inoculación secuencial de las dos cepas de no-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii* Viniferm NSTD y *M. pulcherrima* NS-EM-34) con *S. cerevisiae* se presenta como una estrategia interesante para la mejora de la calidad sensorial de ciertas variedades de vinos blancos como Verdejo, *Sauvignon blanc* o *Chardonnay*, donde el perfil varietal constituye un carácter distintivo y apreciado por los consumidores. La contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* en el incremento en la concentración de tioles varietales, como consecuencia de una mayor actividad en el consumo y ruptura de los sus precursores conjugados, así como la obtención de concentraciones de compuestos alcohólicos moderada, lleva a la mejora de la percepción sensorial del carácter afrutado y tropical de estos vinos.

6.4 Estudio del efecto de *T. delbrueckii* en co-inoculación con *S. cerevisiae* bajo distintas condiciones de nutrición nitrogenada

Como ya se ha mencionado, los resultados mostrados en el capítulo 2 demuestran el papel positivo que tienen ciertas levaduras no-*Saccharomyces* en la mejora del perfil aromático de los vinos. La contribución de dichas levaduras en la obtención de vinos con mejores propiedades, tanto tecnológicas como sensoriales, ha sido profundamente estudiada (revisada por Belda *et al.*, 2017b; Ruiz *et al.*, 2019a; Benito *et al.*, 2019). Sin embargo, debido al menor vigor fermentativo y a la menor tolerancia al etanol de las levaduras no-*Saccharomyces*, la aplicación de estas levaduras en la industria enológica se realiza en co-inoculación secuencial, con una cepa de *S. cerevisiae* para asegurar la correcta finalización de la fermentación alcohólica. En este contexto, entender cómo afecta la interacción de otras levaduras con *S. cerevisiae* en la fermentación vínica resulta imprescindible para llevar a cabo las fermentaciones vínicas en la industria de forma controlada y segura desde un punto de vista enológico y microbiológico.

DISCUSIÓN GENERAL

Entre los factores que afectan a la naturaleza de las interacciones entre levaduras destaca la nutrición nitrogenada por su papel tanto en las dinámicas poblacionales de las levaduras como por su influencia directa en la producción de metabolitos con alto impacto en el perfil aromático de los vinos. Así, el objetivo del trabajo presentado en el capítulo 3 fue estudiar el efecto de combinado de la co-inoculación con una cepa vínica de *T. delbrueckii* -interacciones interespecíficas- y la nutrición nitrogenada (bajo dos condiciones extremas de amonio, HN y LN) en *S. cerevisiae*, desde un punto de vista fenotípico y transcripcional. A pesar de que en el capítulo 2 de esta Tesis se demostró la contribución positiva de ambas especies no-*Saccharomyces* estudiadas a las propiedades sensoriales del vino, *T. delbrueckii* mostró un mejor impacto sensorial, no solo en la producción de tioles aromáticos, sino también en el perfil químico general de las fermentaciones secuenciales de *S. cerevisiae* (Figura 31). Este hecho, junto con una menor influencia en las cinéticas fermentativas y poblacionales, comparada con *M. pulcherrima*, llevó a estudiar la cepa de *T. delbrueckii* Viniferm NSTD y su impacto sobre *S. cerevisiae* Viniferm Revelación en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral.

6.4.1 Impacto fenotípico de la co-inoculación de levaduras y la nutrición nitrogenada

Evaluando las dinámicas poblacionales de levaduras y las cinéticas de fermentación de los diferentes ensayos realizados (Figura 22), se observó que el amonio permite el consumo completo de los azúcares del mosto, siendo una fuente de nitrógeno de fácil asimilación tanto en *S. cerevisiae* como en *T. delbrueckii* (Kemsawasd *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2020). Como era de esperar, su agotamiento afectó notablemente al crecimiento de las levaduras y al rendimiento de las fermentaciones. A pesar de ello, la cepa de *S. cerevisiae* Viniferm Revelación utilizada mostró bajos niveles de producción de biomasa y tasas de pérdida de peso (como indicador de seguimiento del proceso de fermentación) comparadas con otras cepas de *S. cerevisiae* en las mismas condiciones (Barbosa *et al.*, 2014). Esto puede estar relacionado con la posible mayor sensibilidad de esta cepa al amonio, el cual, en altas concentraciones, puede ser tóxico para las levaduras (Santos *et al.*, 2012). El destacado consumo de amonio por parte de *T. delbrueckii* -también descrito para otras cepas de esta especie (Roca-Mesa *et al.*, 2020)- no tuvo un efecto en el consumo de nitrógeno en el cultivo mixto HN, en el que se observaron unas concentraciones de amonio similares con el cultivo individual de *S. cerevisiae* (Sc), tanto a las 36 horas, como al final de la fermentación (Figura 22). De forma interesante, el efecto causado por el

nitrógeno en las dinámicas poblacionales y fermentativas pareció reducirse con la co-inoculación de levaduras, comparadas con las fermentaciones individuales. En las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae* y de *T. delbrueckii*, las diferencias entre las fermentaciones HN y LN fue mayor que en las fermentaciones mixtas de ambas especies, tanto a nivel de densidad celular máxima alcanzada como de las tasas de pérdida de peso.

Analizando los perfiles de metabolitos al finalizar la fermentación se observó, además, que el impacto de la dosis de amonio fue mayor que el impacto de la propia co-inoculación (Figura 23). También se observó que, al igual que ocurrió con las cinéticas fermentativas, la composición química de los vinos resultantes de las fermentaciones mixtas se mostró menos afectada por las dosis de amonio que las fermentaciones individuales. Así, la co-inoculación con *T. delbrueckii* parece jugar un papel en cómo *S. cerevisiae* responde a la nutrición con nitrógeno. Varios estudios han demostrado la influencia positiva de *T. delbrueckii* en el perfil sensorial del vino, cuando se usa en co-inoculación con *S. cerevisiae* (Contreras *et al.*, 2014; Renault *et al.*, 2016; Belda *et al.*, 2017b). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se centraron en la contribución directa de *T. delbrueckii* en el aroma y sabor del vino, sin considerar el efecto indirecto de esta especie en el metabolismo de *S. cerevisiae* y cómo este efecto influye en las características del vino. Este trabajo demuestra el potencial efecto de *T. delbrueckii* sobre la influencia que las altas dosis de nitrógeno inorgánico generan en la producción de metabolitos por *S. cerevisiae*. El análisis de los metabolitos producidos al final de la fermentación permitió también observar que el efecto de la dosis de amonio fue menor en las fermentaciones de *T. delbrueckii*. De acuerdo con esto, algunos estudios han descrito que ciertas cepas de *T. delbrueckii* muestran diferencias con *S. cerevisiae* en las tasas de consumo y en su preferencia por distintas fuentes de nitrógeno (Roca-Mesa *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2020).

Por último, la concentración final de compuestos aromáticos también se mostró condicionada con la dosis de nitrógeno y la estrategia de inoculación de levaduras. Estos compuestos están principalmente producidos por enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos (Bisson y Karpel, 2010). La producción de alcoholes superiores, que en concentraciones moderadas pueden tener un impacto positivo en la complejidad aromática de los vinos, disminuyó notablemente en condiciones de alta concentración de amonio. Carrau *et al.* (2008) también observaron un comportamiento dependiente del nitrógeno en la producción de alcoholes superiores, mostrando una correlación negativa con concentraciones de NFA por encima de los 100

DISCUSIÓN GENERAL

mg N/L. Estos autores propusieron que la producción de alcoholes superiores, como subproducto del metabolismo del carbono, está regulada por el balance metabólico de carbono/nitrógeno. Así, el incremento en la producción de alcoholes superiores bajo condiciones de agotamiento de nitrógeno puede ser explicado por un desequilibrio hacia el metabolismo del carbono, favoreciendo la producción de este tipo de subproductos. Este hecho se confirmó al observar un aumento de la expresión de los genes relacionados con el metabolismo del carbono en condiciones de bajo nitrógeno, como se explicará más adelante. Además, debe ser también considerado que el consumo de las fuentes pobres de nitrógeno puede llevar a las levaduras a una sobreproducción de cetoácidos, que, debido a su toxicidad, son descarboxilados, reducidos a su correspondiente alcohol superior, y excretados por la célula (Ough y Bell, 1980). La estrategia de inoculación mixta de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* también mostró un efecto sobre la composición aromática de los vinos, como ha sido demostrado previamente en varios trabajos (Azzolini *et al.*, 2015; Renault *et al.*, 2016).

Estos resultados, en conjunto, demostraron que la dosis de amonio afectó de forma importante a las cinéticas fermentativas y a la composición del vino, y este efecto se mostró claramente condicionado por la estrategia de co-inoculación de levaduras llevada a cabo. Con el objetivo de entender las bases biológicas del remarcable efecto de la concentración de amonio en la fermentación de *S. cerevisiae*, y explorar cómo esta respuesta puede ser modificada por la presencia de *T. delbrueckii* en cultivos mixtos, se llevó a cabo un estudio transcriptómico.

6.4.2 Impacto transcripcional de la co-inoculación de levaduras y la nutrición nitrogenada

Analizando, mediante un análisis *RNA-seq*, los valores de expresión diferencial de todos los ARNm de *S. cerevisiae* (datos de GDE depositados en el repositorio: https://github.com/Javier-R-Ruiz/Thesis-Javier-Ruiz_Supplementary-Material/issues), se observó que la respuesta transcripcional a la dosis de amonio fue significativamente mayor que la respuesta observada debida a la co-inoculación con *T. delbrueckii* al igual que, como ya se ha indicado, se pudo observar en los perfiles de metabolitos del vino obtenido en cada condición. Igualmente, Tronchoni *et al.* (2017) describieron una leve respuesta transcripcional en *S. cerevisiae* frente a la presencia de *T. delbrueckii*, que puede explicarse por el hecho de que los numerosos factores abióticos estresantes en la fermentación vínica desencadenan respuestas generales de estrés que podrían enmascarar

el estrés causado por factores de origen biótico (interacción intraespecífica de levaduras). También se observó que el efecto de altas dosis de amonio en el transcriptoma de *S. cerevisiae* fue menor en los ensayos mixtos, comparado con los ensayos individuales, en términos de valor absoluto de cambio de expresión y el número total de genes diferencialmente expresados (GDE). Este efecto de la co-inoculación de *T. delbrueckii* también se pone de manifiesto al observar el cambio de expresión de todos los genes de *S. cerevisiae* expresados diferencialmente por la condición de nitrógeno en cada condición de inoculación (Sc y ScTd) (Figura 32), donde el cambio de expresión de la mayoría de los genes de *S. cerevisiae* regulados por la alta concentración de amonio fue menor bajo condiciones de co-inoculación con *T. delbrueckii*.

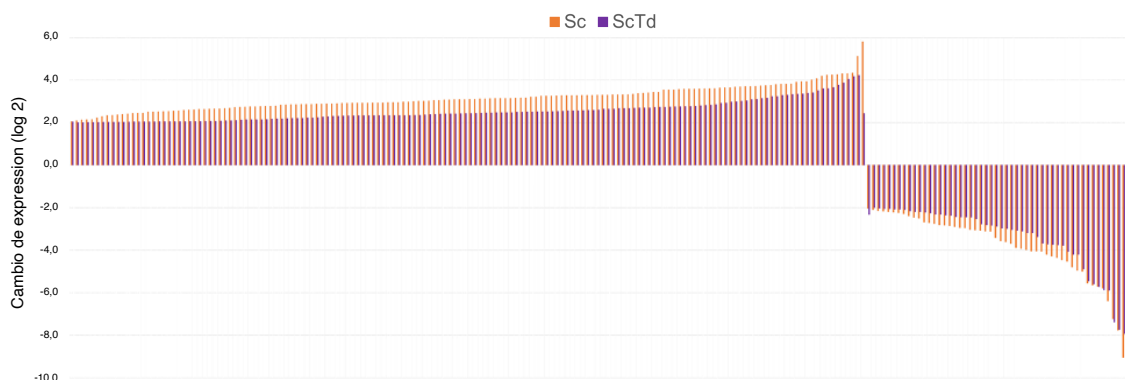


Figura 32: Cambio (inducción / represión) de la expresión (log₂) de genes de *S. cerevisiae* en condiciones de alta concentración de amonio (HN) bajo condiciones de inoculación individual (Sc, naranja) y de co-inoculación con *T. delbrueckii* (ScTd, morado). Los datos de GDEs están recogido en el repositorio: https://github.com/Javier-R-Ruiz/Thesis-Javier-Ruiz_Supplementary-Material/issues; tabla (Sc-HN vs Sc-LN y ScTd-HN vs ScTd-LN).

A pesar de que solo se analizó un tiempo de muestreo, estas observaciones refuerzan la hipótesis del efecto mitigador de la co-inoculación con *T. delbrueckii* sobre el impacto de la alta concentración de amonio en *S. cerevisiae*, también observado en las cinéticas fermentativas y en el perfil de metabolitos producido. Además de la contribución que tiene *T. delbrueckii* en el perfil tiológico de los vinos, demostrada en el capítulo 2, estos resultados indican también el papel positivo de la co-inoculación de *T. delbrueckii* en la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* a la nutrición nitrogenada durante la fermentación.

En la industria del vino se emplea comúnmente la nutrición con nitrógeno inorgánico (principalmente en forma de sales de amonio) para promover el crecimiento de las levaduras durante la fermentación. Sin embargo, esta práctica tiene un efecto negativo, ya que la producción de la mayoría de los compuestos aromáticos se redujo bajo

DISCUSIÓN GENERAL

concentraciones altas de nitrógeno inorgánico (Carrau *et al.*, 2020) como consecuencia de una represión por nitrógeno (NCR). *S. cerevisiae* podría detectar y responder a la presencia del estrés biótico que supone el co-cultivo con *T. delbrueckii* activando mecanismos de respuesta al estrés. Esta reacción podría preparar a *S. cerevisiae* para hacer frente a otros tipos de estrés abiótico, como la alta concentración de amonio, reduciendo así el impacto del mismo sobre la respuesta transcripcional y fenotípica y, en último término, sobre las propiedades sensoriales del vino. Así, cabe destacar, que los resultados presentados en este estudio tienen un gran valor ya que demuestran que, en los vinos producidos mediante la co-inoculación con *T. delbrueckii*, no solo hay un efecto directo de la levadura no-*Saccharomyces* en el perfil aromático del vino, sino que también hay un efecto indirecto derivado de los cambios inducidos por *T. delbrueckii* en la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae*, reduciendo el efecto negativo de la alta concentración de amonio sobre el perfil aromático del vino.

Por otro lado, también se observó que el efecto de la co-inoculación de *T. delbrueckii* en *S. cerevisiae* fue mayor en condiciones de alta concentración de nitrógeno. Esto puede explicarse por el hecho de que algunos mecanismos expresados diferencialmente en la respuesta transcripcional frente al agotamiento del nitrógeno son similares a la respuesta frente a la presencia de una especie competidora, principalmente aquellos relacionados con la respuesta al estrés (Tesnière *et al.*, 2015). De hecho, el agotamiento de las fuentes de nitrógeno, tanto en los cultivos individuales como mixtos, indujo la expresión de genes relacionados con mecanismos de respuesta a estrés, como los genes que codifican para proteínas de choque térmico (*HSP12*, *HSP31*, *HSP32*), y enzimas que participan en la síntesis de trehalosa (*TPS2*) y glucógeno (*GLG2*).

El análisis de los GDE permitió estudiar cómo *S. cerevisiae* responde a las diferentes concentraciones extremas de amonio. El amonio es una de las principales fuentes de nitrógeno que desencadenan los mecanismos de NCR en *S. cerevisiae* (Magasanik y Kaiser, 2002). Así, bajo condiciones de alta concentración de amonio, los genes relacionados con el consumo de fuentes alternativas de nitrógeno aparecieron altamente reprimidos. También, se observó una represión del metabolismo energético oxidativo. Estos resultados fueron también observados con otras cepas de *S. cerevisiae* bajo las mismas condiciones experimentales (Barbosa *et al.* 2015b). Estos análisis permitieron estudiar también el efecto de *T. delbrueckii* en el perfil de expresión de *S. cerevisiae*. Varios estudios han demostrado que la interacción entre especies de levaduras afecta al transcriptoma de estas, desencadenando mecanismos de respuesta competitivos

(Barbosa *et al.*, 2015a; Tronchoni *et al.*, 2017; Curiel *et al.*, 2017; Alonso-del-Real *et al.*, 2019, Shekhawat *et al.*, 2019). Así, se observó que en presencia de *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae* induce el consumo aminoácidos y azúcares. Este hecho también fue descrito por Tronchoni *et al.* (2017), como un mecanismo de competición en presencia de otras especies de levaduras habitando el mismo nicho. También, Curiel *et al.* (2017) observaron que la interacción interespecífica de levaduras desencadenaba los mecanismos de CCR y NCR, como estrategias para aumentar el consumo de nutrientes y competir eficientemente. Sin embargo, ninguna diferencia en la expresión de genes del mecanismo NCR o de genes sensibles a NCR fue encontrada en *S. cerevisiae*, como respuesta a la co-inoculación con *T. delbrueckii*. Esto puede explicarse por las concentraciones extremas de amonio utilizadas en este estudio, que pueden enmascarar el efecto de *T. delbrueckii* en el transcriptoma de *S. cerevisiae*.

Además de la sobreexpresión de genes relacionados con el consumo de nutrientes, la co-inoculación de *T. delbrueckii* también indujo genes relacionados con la homeostasis de iones metálicos. Estos iones metálicos pueden jugar un papel importante en la homeostasis celular y tienden a ser limitantes en el mosto de uva. Una mayor capacidad de asimilación de estos micronutrientes puede traducirse en una clara ventaja competitiva en condiciones de co-cultivo. Resultados similares sobre la expresión de estos genes también han sido descritos por Shekhawat *et al.* (2019), en un estudio sobre el impacto transcripcional de la co-inoculación con *L. thermotolerans* en *S. cerevisiae*.

El análisis de RNA-seq también permitió estudiar la expresión de genes relacionados con la producción de compuestos aromáticos (Figura 27). Al igual que se observó a nivel global, la condición de nitrógeno tuvo un mayor efecto transcripcional en estos genes, comparado con el efecto de la co-inoculación con *T. delbrueckii*. Sin embargo, la complejidad del metabolismo de aminoácidos y su relación con el aroma del vino hizo difícil relacionar directamente los niveles de expresión génica con el perfil aromático final del vino. Además, los datos transcripcionales correspondientes a las 36h desde el comienzo de la fermentación no pueden explicar completamente la concentración de aromas en el vino. A pesar de estas dificultades, sí que fue posible encontrar algunos patrones transcripcionales que explican, al menos parcialmente, el incremento en la concentración de ciertos compuestos aromáticos. El descenso de la concentración de alcoholes superiores bajo las condiciones de alta concentración de amonio parece estar relacionado con la represión de genes del metabolismo de aminoácidos, como las permeasas, transaminasas y descarboxilasas. Respecto a la producción de ésteres, el

DISCUSIÓN GENERAL

incremento en la concentración de etanoato de etilo se relaciona con la sobreexpresión de la acetil transferasa *CAT2*. El ligero incremento de la concentración de alcoholes superiores bajo la condición de co-inoculación con *T. delbrueckii* puede explicarse por la sobreexpresión de los genes *BAT1*, *BAT2* y *PDC6*. Un estudio previo demostró un efecto significativo de la co-inoculación junto con *S. cerevisiae* de *H. guilliermondii* en la expresión de genes relacionados con la producción de compuestos volátiles (Barbosa *et al.*, 2015a). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las extremas condiciones de nitrógeno utilizadas suponen un alto impacto transcripcional que pueden enmascarar el efecto del co-cultivo con *T. delbrueckii* en el transcriptoma de *S. cerevisiae*.

Por último, cabe mencionar que los análisis de RNA-seq permitieron además, determinar de forma separada los diferentes perfiles transcripcionales de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* en las fermentaciones mixtas bajo las dos condiciones de nitrógeno ensayadas (Figura 28). Teniendo en cuenta todos los GDEs y el cambio de expresión acumulado, se observó un efecto transcripcional frente la alta concentración de amonio similar en ambas especies, aunque ligeramente menor en *T. delbrueckii*. La hipótesis sobre una menor respuesta a la alta concentración en nitrógeno por parte de *T. delbrueckii* se ve reforzada al observar los datos de perfiles de metabolitos producidos por ambas especies. Además, los genes relacionados con la producción de aromas se vieron también menos afectados por la concentración de amonio en *T. delbrueckii* en condiciones de co-inoculación, comparados con *S. cerevisiae*. Analizando en detalle los genes reprimidos en condiciones de alto nitrógeno, *T. delbrueckii* mostró una menor represión de la mayoría de los genes sensibles a NCR comparado con *S. cerevisiae*. Esto podría indicar una relajación en la represión por nitrógeno en *T. delbrueckii*. Esta menor represión por nitrógeno, en ambientes limitantes en fuentes de nitrógeno, puede significar una ventaja significativa a la hora de consumir simultáneamente un mayor rango de fuentes alternativas de este nutriente. De hecho, el género *Torulaspota* ha sido descrito como donante de ciertos genes relacionados con el consumo de aminoácidos y péptidos en un evento de THG, encontrados en cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Marsit *et al.*, 2015). Aunque se necesitan más estudios sobre los mecanismos de NCR en *T. delbrueckii*, estos resultados sugieren una mejor adaptación de esta especie a los ambientes pobres en fuentes de nitrógeno.

Otros genes, comúnmente regulados en ambas especies, también mostraron diferencias cuantitativas a nivel de expresión que pueden explicar las diferencias encontradas a nivel fenotípico. Por ejemplo, el gen *THI4* (involucrado en la síntesis de

tiamina) destacó por su gran diferencia de expresión entre las dos especies estudiadas (expresado con mayores niveles en *T. delbrueckii*). La tiamina está relacionada con la actividad de la enzima piruvato descarboxilasa y, por tanto, con el metabolismo fermentativo. Se ha descrito que la sobreexpresión de este gen mejora el consumo de glucosa y la producción de etanol durante la fermentación alcohólica (Shi *et al.*, 2018). Este hecho puede explicar tanto el bajo rendimiento fermentativo de la cepa de *S. cerevisiae* empleada en el estudio, como el destacable rendimiento fermentativo de la cepa de *T. delbrueckii*.

Por otro lado, se observó que la mayoría de los genes diferencialmente expresados bajo la alta concentración de amonio fueron exclusivos de cada especie, lo que indica una repuesta transcripcional cualitativamente diferente. Un estudio reciente, utilizando otras cepas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, también demostró una respuesta transcripcional de adaptación al ambiente vínico diferente en ambas especies (Tondini *et al.*, 2020). A pesar de ello, se debe tener en cuenta el contexto genómico de ambas especies; a pesar de su cercanía filogenética, algunos eventos genómicos ligados al proceso de domesticación de *S. cerevisiae*, han modificado sustancialmente el genoma de esta especie (Belda *et al.*, 2019). Por ello, la existencia de varios genes de *S. cerevisiae* ausentes en *T. delbrueckii* puede parcialmente explicar las diferencias en los GDEs encontradas.

6.5 Perspectivas futuras

Los resultados de esta Tesis Doctoral contribuyen a la comprensión de las bases genéticas, transcripcionales y metabólicas de la aplicación de distintas levaduras, tanto *S. cerevisiae* como no-*Saccharomyces*, en la mejora de las propiedades del vino, a través de la mejora de su perfil aromático tiólico y fermentativo. En primer lugar, el estudio sobre la distribución poblacional y papel de los distintos alelos de *IRC7* -gen clave en la producción de aromas tiólicos- en el fenotipo de las levaduras, permitió demostrar que su alelo menos funcional (*IRC7^S*) ha sido favorecido a lo largo del proceso de domesticación de *S. cerevisiae* en el entorno vínico, justificando así el bajo potencial de la mayoría de cepas de *S. cerevisiae* en la producción de tioles varietales a partir de sus correspondientes precursores cisteinilados. Estos resultados confirman la utilidad del desarrollo de nuevas estrategias de vinificación, mediante el uso de levaduras no-*Saccharomyces* como herramienta en la revelación aromática del vino. En ese sentido, se realizaron estudios sobre la aplicación de las levaduras no-*Saccharomyces*, bajo condiciones que simulan el proceso de vinificación en la industria enológica, y bajo condiciones controladas de

DISCUSIÓN GENERAL

laboratorio, aislando las variables relacionadas con la nutrición nitrogenada y la interacción intraespecífica de levaduras.

Así, estos resultados basados en una aplicación directa de estas levaduras abren la puerta a la investigación sobre las bases genéticas, metabólicas y fisiológicas de las observaciones bajo condiciones de aplicación industrial. A modo de ejemplo, la destacada producción de tioles de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* (Figuras 17 y 30), promueven el estudio en detalle del proceso de internalización de los distintos precursores tiólicos que se pueden encontrar en el mosto de uva, explotando la posibilidad de rutas alternativas de la síntesis de tioles a partir de compuestos carbonilos. Por otro lado, los ensayos de vinificación bajo condiciones sintéticas concluyen un efecto importante del co-cultivo con *T. delbrueckii* en la regulación transcripcional de *S. cerevisiae*. Sin embargo, con el fin de simplificar el estudio, este trabajo se centró en estudiar dos concentraciones extremas de amonio (alejadas de las concentraciones reales encontradas en las fermentaciones de la industria enológica). Por ello, será necesario realizar nuevos estudios para entender de forma completa la naturaleza de esta interacción entre levaduras y su efecto en cómo estas especies hacen frente a otros tipos de estrés abiótico, mediante la inclusión en los estudios de distintas cepas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, concentraciones intermedias de nitrógeno y diferentes puntos de muestreo para la monitorización de la expresión transcripcional.

Por último, los resultados mostrados en el capítulo 1 permiten identificar una serie de genes que son potenciales candidatos para explicar la sorprendente distribución de alelos *IRC7* encontrada en las distintas poblaciones filogenéticas de *S. cerevisiae*. Por ello, son necesarios futuros estudios, basado en el uso de herramientas de manipulación genética de las levaduras, para comprender el papel de cada una de las mutaciones identificadas en estos genes en el fenotipo de las levaduras y su ventaja competitiva con el fin de seguir avanzando en el conocimiento de los marcadores genéticos asociados al proceso de domesticación de levaduras vínicas.

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

1. El genotipado de alelos del gen *IRC7* en una extensa colección de 283 genomas de *S. cerevisiae*, representando distintos linajes filogenéticos y orígenes de aislamiento, confirmó la alta prevalencia del alelo *IRC7^S* dentro del linaje vínico. Además, se confirmó que el alelo *IRC7^S* se encuentra también, aunque de forma minoritaria, en otros linajes domesticados cercanos al linaje vínico *Wine* (como *Beer 2* o *Wine-PDM*), pero está completamente ausente en los linajes domesticados más distantes (*Sake* y *Beer 1*) y en todos los linajes salvajes estudiados (*Philippines*, *North America and Japan*, *West Africa* y *Malaysia*). Todo ello nos permite argumentar que el alelo *IRC7^S* ha sido favorecido durante el proceso de domesticación de *S. cerevisiae*, con especial relevancia en las cepas vínicas.
2. La mayor prevalencia del alelo *IRC7^S* en cepas vínicas de *S. cerevisiae*, a pesar de estar relacionado con una menor capacidad de liberación de aromas tiólicos, parece estar asociada a un patrón fenotípico ventajoso observado en cepas homocigotas para dicho alelo (HS), tanto a nivel de parámetros de crecimiento (menor fase de latencia y mayor tasa de crecimiento) como a nivel de capacidad competitiva (resistencia a toxinas *killer* y capacidad de pseudofilamentación) en las cepas de *S. cerevisiae*.
3. El alelo *IRC7^S* podría contribuir de forma directa, aunque sólo parcialmente, al fenotipo ventajoso observado en las cepas HS, determinando una mayor protección frente al daño oxidativo y una mayor tolerancia al cobre; ambos fenotipos posiblemente favorecidos por una mayor disponibilidad de cisteína intracelular, derivado de la menor actividad cisteína-desulfurasa de la enzima codificada por este alelo delecionado.
4. La presencia de variantes de secuencia con patrones de co-ocurrencia significativos con el alelo *IRC7^S* en el genoma de *S. cerevisiae* sugiere que la prevalencia de cepas HS en ambientes vínicos puede estar determinada por la acción conjunta de diversos alelos en genes involucrados en rutas metabólicas muy dispares. Entre estos genes destacan *VPS10* y *RSF1*, implicados en la resistencia a toxinas *killer* y la capacidad de crecimiento pseudofilamentoso, respectivamente, y en los que el impacto funcional de las mutaciones identificadas, asociadas al alelo *IRC7^S*, debe ser explorado en futuros trabajos.

CONCLUSIONES

5. El uso de las cepas *T. delbrueckii* Viniferm NS-TD y *M. pulcherrima* NS-EM-34 en fermentaciones secuenciales de mosto Verdejo con *S. cerevisiae* permite mejorar la intensidad aromática de vinos blancos a través del incremento en la concentración de tioles, independientemente del genotipo *IRC7* de la cepa de *S. cerevisiae* empleada y con especial relevancia en el caso de *T. delbrueckii*.
6. Las levaduras no-*Saccharomyces* empleadas también contribuyeron a la mejora de otros parámetros enológicos de interés, destacando la menor producción de etanol, ácido acético y acetaldehído en las fermentaciones secuenciales. También cabe destacar que los vinos producidos mediante las fermentaciones secuenciales con las levaduras no-*Saccharomyces* obtuvieron una menor concentración de alcoholes superiores, especialmente en las fermentaciones en la que participó *M. pulcherrima*, lo que pudo incrementar la percepción de compuestos aromáticos minoritarios, como los tioles varietales, en la matriz aromática del vino.
7. Comparando el perfil global de metabolitos (tanto volátiles como no volátiles) producidos en las fermentaciones secuenciales con levaduras no-*Saccharomyces* con las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae*, se demostró una contribución más notable de *T. delbrueckii* comparada con *M. pulcherrima* en el perfil químico del vino. Este hecho, junto con una alteración menor en las cinéticas fermentativas y su gran contribución a la concentración de tioles en el vino, confirmó a la cepa *T. delbrueckii* Viniferm NS-TD como una levadura no-*Saccharomyces* con un gran potencial de aplicación para la mejora de las propiedades de vinos blancos, en condiciones de co-inoculación con *S. cerevisiae*.
8. El estudio del efecto de la co-inoculación con *T. delbrueckii* y la nutrición nitrogenada en *S. cerevisiae*, bajo condiciones de fermentación de mosto sintético, demostró un mayor impacto -tanto a nivel transcripcional como fenotípico- de la variable nutricional, comparada con el efecto de la interacción entre levaduras. El mayor impacto de la alta concentración de amonio en la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* está relacionado con la represión en el uso fuentes alternativas de nitrógeno y la inducción de la síntesis de proteínas. Por otro lado, la interacción con *T. delbrueckii* induce la activación de rutas generales de respuestas de estrés, de mecanismos de consumo de nutrientes y de expresión de procesos catabólicos.

9. El impacto de la dosis de amonio sobre *S. cerevisiae* se ve modulado por la condición de co-inoculación con *T. delbrueckii*. La coexistencia con una especie competidora parece reducir el efecto represor de la alta concentración de amonio, tanto a nivel transcripcional (número total de genes diferencialmente expresado y magnitud del cambio global en los niveles de expresión) como fenotípico (en las cinéticas fermentativas y en el perfil de metabolitos producido al final de la fermentación). Dado que el amonio es comúnmente usado como nutriente inorgánico en las fermentaciones vínicas para asegurar la finalización de las mismas, pero teniendo un impacto negativo en la producción de compuestos aromáticos de interés, la co-inoculación de *T. delbrueckii*, además de tener un impacto directo en la composición de compuestos aromáticos del vino, pueden reducir el efecto de las altas concentraciones de amonio sobre la producción de metabolitos de interés generados durante la fermentación.
10. El estudio de la regulación transcripcional de *T. delbrueckii* por altas concentraciones de amonio en condiciones de co-inoculación, reveló un patrón de respuesta transcripcional global similar al de *S. cerevisiae*. Sin embargo, los genes sensibles a la represión por nitrógeno aparecieron, por norma, menos reprimidos en *T. delbrueckii*. El menor impacto del amonio en *T. delbrueckii* también se manifestó en los perfiles de metabolitos producidos durante la fermentación que fueron más similares entre condiciones extremas de nitrógeno en las fermentaciones simples de *T. delbrueckii* que en las de *S. cerevisiae*.

CONCLUSIONES

8 CONCLUSIONS

1. *IRC7* alleles genotyping in a wide *Saccharomyces cerevisiae* genome collection (283 genomes), including different phylogenetic lineages and isolation origins, confirms the high *IRC7^S* prevalence within the Wine lineage. In addition, *IRC7^S* allele is also found, with a minor presence, in other domesticated –and close to Wine- lineages (Beer2 and Wine-PDM), but completely absent in the more distant domesticated lineages (Beer1 and Sake) and in all wild lineages (Philippines, North America and Japan, West Africa and Malaysia). These results led us to hypothesize that *IRC7^S* allele prevalence was favored during the domestication process in *S. cerevisiae*, especially among wine strains.
2. The higher prevalence of the *IRC7^S* allele in *S. cerevisiae* wine strains –associated with a lower thiol releasing capability- seems to be related to a phenotypic advantageous pattern observed in the *IRC7^S* homozygous strains (HS), both in growth parameters (shorter lag phases and higher growth rates) and in competitive fitness (killer toxins resistance and pseudofilamentous growth ability).
3. *IRC7^S* allele might contribute, although partially, to the advantageous phenotype observed in HS strains, determining a better oxidative damage protection and a higher tolerance to high copper concentration; both phenotypes were possibly favored by a greater intracellular cysteine availability derived from the lower cysteine-desulfurase activity of the enzyme *Irc7p^S*, encoded by this deleted allele.
4. The identification of sequence variants with significant *IRC7^S*-co-occurrence patterns in *S. cerevisiae* genome suggests that the higher prevalence of HS strains may be determined by the synergic contribution of genetic alleles related to diverse metabolic pathways. Among these genes we can highlight *VPS10* y *RSF1*, involved in killer toxins resistance and pseudofilamentous growth, respectively. Future studies about the functional impact of the mutations identified in these genes - associated to *IRC7^S* -will be necessary to understand their implications in HS strains high prevalence.
5. The use of *Torulaspora delbrueckii* Viniferm NS-TD and *Metschnikowia pulcherrima* NS-EM-34 strains, in sequential fermentations of *Verdejo* must inoculated with *S. cerevisiae*, allows to improve the aromatic intensity of white wines through the increase of thiol concentration, independently of the *IRC7*

CONCLUSIONS

genotype of the *S. cerevisiae* strain used, being specially relevant the case of *T. delbrueckii*.

6. Both non-*Saccharomyces* yeasts used also positively contribute to other oenological parameters of interest in the sequential fermentations, highlighting the lower production of ethanol, acetic acid and acetaldehyde. It should also be noted that the wines produced by sequential fermentations with non-*Saccharomyces* yeasts showed lower higher-alcohol concentration, especially in *M. pulcherrima* fermentations, which increase the perception of minor aromatic compounds, such as varietal thiols, in the aromatic matrix of wines.
7. The study of the global metabolite profiles (both volatile and non-volatile metabolites) produced by yeasts in single and sequential fermentations showed a more notable contribution of *T. delbrueckii* compared to *M. pulcherrima* in the chemical profile of wines. This fact, together with a minor alteration in the fermentative kinetics and its great contribution to the concentration of thiols in wine, confirmed great application potentials of *T. delbrueckii* Viniform NS-TD strain for the improvement of white wine properties under *S. cerevisiae* co-inoculation conditions.
8. The study of the effect of *T. delbrueckii* co-inoculation and nitrogen nutrition in *S. cerevisiae*, under synthetic must fermentation conditions, showed a greater impact of the nutritional variable compared to the effect of yeasts interaction, both at transcriptional and phenotypic level. The greater impact of the high ammonium concentration on *S. cerevisiae* transcriptional response is related to the repression of the use of alternative nitrogen sources and the induction of protein synthesis. On the other hand, the interaction with *T. delbrueckii* induces the activation of general stress response pathways, nutrient consumption mechanisms and the expression of catabolic processes.
9. The ammonium impact on *S. cerevisiae* is modulated by *T. delbrueckii* co-inoculation. The coexistence with a competing species seems to reduce the repressive effect of the high ammonia concentration, both at the transcriptional (total number of differentially expressed genes and magnitude of the global expression change) and phenotypic (fermentative kinetics and metabolite profile produced) level. Since ammonia is commonly used as an inorganic nutrient to ensure wine fermentation completion, but has a negative impact on the production of aromatic compounds, the co-inoculation of *T. delbrueckii*, besides its direct

impact on wine aromatic composition, can reduce the effect of high concentrations of ammonia in the production of metabolites of interest during fermentation.

10. The study of the *T. delbrueckii* transcriptional regulation by high ammonia concentration under co-inoculation conditions, revealed a global transcriptional response pattern similar to *S. cerevisiae*. However, genes sensitive to nitrogen repression appeared less repressed in *T. delbrueckii*. The lower impact of ammonia in *T. delbrueckii* was also manifested in the metabolite profiles produced during fermentation, which were more similar between extreme nitrogen conditions in *T. delbrueckii* single fermentations than in *S. cerevisiae* single fermentations.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera J, Randez-Gil F, Prieto JA (2007) Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews* 31:327–341
- Albertin W, Chasseriaud L, Comte G, Panfili A, Delcamp A, Salin F, Marullo P, Bely M. (2014) Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLoS One* 9:e94246
- Albertin W, Zimmer A, Miot-Sertier C, Bernard M, Coulon J, Moine V, Colonna-Ceccaldi B, Bely M, Marullo P, Masneuf-Pomarede I (2017) Combined effect of the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase and the non-*Saccharomyces* consortium to enhance wine fruitiness and complexity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:7603-7620
- Almeida P, Barbosa R, Zalar P, Imanishi Y, Shimizu K, Turchetti B *et al.* (2015) A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication. *Molecular Ecology* 24:5412-5427
- Alonso-del-Real J, Contreras-Ruiz A, Castiglioni GL, Barrio E, Querol A (2017) The use of mixed populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* to reduce ethanol content in wine: limited aeration, inoculum proportions, and sequential inoculation. *Frontiers in Microbiology* 8:2087
- Alonso-del-Real J, Pérez-Torrado R, Querol A, Barrio E (2019) Dominance of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains over *S. kudriavzevii* in industrial fermentation competitions is related to an acceleration of nutrient uptake and utilization. *Environmental Microbiology* 21:1627-1644
- Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Anfang N, Brajkovich M, Goddard MR (2009) Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15:1-8
- Araque I, Gil J, Carreté R, Bordons A, Reguant C (2009) Detection of arc genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:1841-1847

BIBLIOGRAFÍA

- Avbelj M, Zupan J, Raspor P (2016) Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:7841-7852
- Azzolini M, Tosi E, Lorenzini M, Finato F, Zapparoli G (2015) Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31:277-293
- Baranyi J, Roberts TA (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23:277-294
- Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153:243-259
- Barbosa C, Lage P, Vilela A, Mendes-Faia A, Mendes-Ferreira A (2014). Phenotypic and metabolic traits of commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *AMB Express* 4:39
- Barbosa C, Mendes-Faia A, Lage P, Mira NP, Mendes-Ferreira A (2015a) Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microbial Cell Factories* 14:1
- Barbosa C, García-Martínez J, Pérez-Ortín JE, Mendes-Ferreira A (2015b) Comparative transcriptomic analysis reveals similarities and dissimilarities in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains response to nitrogen availability. *PLoS One*:e0122709
- Barriuso J, Hogan DA, Keshavarz T, Martínez M. (2018) Role of quorum sensing and chemical communication in fungal biotechnology and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews* 42:627-638
- Bartle L, Sumby K, Sundstrom J, Jiranek V (2019) The microbial challenge of winemaking: yeast-bacteria compatibility. *FEMS Yeast Research* 19:foz040
- Bastian M, Heymann S, Jacomy M (2009) Gephi:an open source software for exploring and manipulating networks. *International AAAI Conference on Weblogs and Social Media*.
- Baumes R (2009) *Wine aroma precursors*. In *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, Cham

- Belda I, Navascues E, Marquina D, Santos A, Calderon F, Benito S (2015). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:1911-1922
- Belda I, Ruiz J, Alastruey-Izquierdo A, Navascués E, Marquina D, Santos A (2016a) Unraveling the Enzymatic Basis of Wine "Flavorome": A Phylo-Functional Study of Wine Related Yeast Species. *Frontiers in Microbiology* 7:12
- Belda I, Ruiz J, Navascués E, Marquina D, Santos A (2016b) Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeast with increased β -lyase activity. *International Journal of Food Microbiology* 225:1-8
- Belda I, Conchillo LB, Ruiz J, Navascués E, Marquina D, Santos A (2016c) Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 223:1-8.
- Belda I, Navascués E, Marquina D, Santos A, Calderón F, Benito S (2016d) Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast* 33:329-38
- Belda I, Zarraonaindia I, Perisin M, Palacios A & Acedo A (2017a) From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the "terroir" concept. *Frontiers in Microbiology* 8:821
- Belda I, Ruiz J, Esteban–Fernández A, Navascués E, Marquina D, Santos A *et al.* (2017b) Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* 22:189
- Belda I, Ruiz J, Besiert B, Navascués E, Marquina D, Calderón F *et al.* (2017c) Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3–SH and 4–MSP) release in wine sequential fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 257:183-191
- Belda I, Ruiz J, Santos A, Van Wyk N, Pretorius IS (2019) *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Genetics* 35:956-957
- Belda I, Gobbi A, Ruiz J, de Celis M, Ortiz–Álvarez R, Acedo A, Santos A (2021) *Microbiomics to Define Wine Terroir*. In: Reference Module in Food Science. Elsevier, Amsterdam

BIBLIOGRAFÍA

- Beltran G, Torija MJ, Novo M, Ferrer N, Poblet M, Guillamón JM *et al.* (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six years follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology* 25:287-293
- Beltran G, Esteve-Zarzoso B, Rozès N, Mas A, Guillamón JM (2005) Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:996-1002
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 57:289-300
- 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*. *European Food Research and Technology* 241:707-717
- Benito S, Ruiz J, Belda I, Kiene F, Beisert B, Navascués E, Marquina D, Calderón F, Santos A, Rauhut D (2019). *Application of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production*. In *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. Springer, Cham
- Benito S (2019) The impacts of *Schizosaccharomyces* on winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:4291-4312
- Benito-Vazquez I, Belda I, Ruiz J, Vicente J, Navascués E, Marquina D *et al.* (2021) Direct detection of *Brettanomyces bruxellensis* in wine by PCR targeting the vinylphenol reductase gene. *LWT* 136:110321
- Bisson L (1999) Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 50:107e119
- Bisson L, Joseph C (2009) *Yeasts*. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, Must and Wine*. Springer, Heidelberg
- Bisson L, Karpel JE (2010) Genetic of yeasts impacting on wine quality. *Annual Review of Food Science and Technology* 1:139-162
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30:2114-2120

- Bokulich NA, Ohta M, Richardson PM, Mills DA (2013) Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. *PLoS ONE* 8:e66437
- Bokulich NA, Collins TS, Masarweh C, Allen G, Heymann H, Ebeler SE, Mills DA (2016) Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behaviour suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio* 7:e00631-16
- Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkel RE (1995) *Yeast and biochemistry of ethanol fermentation*. In: Principles and Practices of Winemaking. The Chapman & Hall Enology. Library, New York
- Bowers K, Stevens TH (2005) Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1744:438-454
- Branco P, Kemsawasd V, Santos L, Diniz M, Caldeira J, Almeida MG, Arneborg N, Albergaria H (2017) *Saccharomyces cerevisiae* accumulates GAPDH-derived peptides on its cell surface that induce death of non-*Saccharomyces* yeasts by cell-to-cell contact. *FEMS Microbiol Ecology* 1:93
- Breslow DK, Cameron DM, Collins SR, Schuldiner M, Stewart-Ornstein J, Newman HW, *et al.* (2008) A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nature Methods* 5:711-718
- Brown SL, Stockdale VJ, Pettolino F, Pocock KF, de Barros Lopes M, Williams PJ, Bacic A, Fincher GB, Høj PB, Waters EJ (2007) Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73:1363-1376
- Camarasa C, Grivet JP, Dequin S (2003) Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways of succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* 149:2669-2678
- Camarasa C, Sanchez I, Brial P, Bigey F, Dequin S (2011) Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *PLoS One* 6:e25147.
- Capece A, Romaniello R, Siesto G, Pietrafesa R, Massari C, Poeta C *et al.* (2010) Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of

BIBLIOGRAFÍA

- selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 15:144:187-192
- Capone DL, van Leeuwen K, Taylor DK, Jeffery DW, Pardon KH, Elsey GM *et al.* (2011) Evolution and occurrence of 1,8-cineole (eucalyptol) in Australian wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:953-959
- Carrau FM, Medina K, Farina L, Boido E, Henschke PA, Dellacassa E (2008) Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research*, 8:1196-1207
- Carrau F, Boido E, Ramey D (2020) Yeasts for low input winemaking: Microbial terroir and flavor differentiation. *Advances in Applied Microbiology* 111:89-121
- Carstens E, Lambrechts MG, Pretorius IS (1998) Flocculation, Pseudohyphal Development and Invasive Growth in Commercial Wine Yeast Strains. *South African Journal of Enology and Viticulture* 19:52-61
- Cavaliere D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R, Polsinelli M (2003) Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of Molecular Evolution* 57:226–232
- Cebollero E, Gonzalez-Ramos D, Tabera L, Gonzalez R. (2007) Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? *Biotechnology Letters* 29:191-200
- Chen H, Fink GR (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development* 20:1150–1161
- Ciani M, Capece A, Comitini F, Canonico L, Siesto G, Romano P (2016a). Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Frontiers in Microbiology* 7:555
- Ciani M, Morales P, Comitini F, Tronchoni J, Canonico L, Curiel JA *et al.* (2016b). Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Frontiers in Microbiology* 7:642
- Ciani M, Comitini F (2019) *Yeast Ecology of Wine Production*. In *Yeasts in the Production of Wine*. Springer, New York
- Cingolani P, Platts A, Wang L, Coon M, Nguyen T, Wang L *et al.* (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff:SNPs

- in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118, iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6:80-92
- Coetzee C, du Toit WJ (2012) A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International* 45:287–298
- Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I *et al.* (2011) Selected non-saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28:873-882
- Coi AL, Bigey F, Mallet S, Marsit S, Zara G, Gladieux P *et al.* (2017) Genomic signatures of adaptation to wine biological ageing conditions in biofilm-forming flor yeasts. *Molecular Ecology* 26:2150-2166
- Conacher CG, Rossouw D, Bauer FFB (2019) Peer pressure: evolutionary responses to biotic pressures in wine yeasts. *FEMS Yeast Research* 19:foz072
- Contreras A, Hidalgo C, Henschke PA, Chambers PJ, Curtin C, Varela C (2014) Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 80:1670-1678
- Contreras A, Curtin C, Varela C (2015) Yeast population dynamics reveal a potential ‘collaboration’ between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during shiraz fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 99:1185-1895
- Cordente AG, Borneman AR, Bartel C, Capone D, Solomon M, Roach M *et al.* (2019) Inactivating mutations in *Irc7p* are common in wine yeasts, attenuating carbon sulfur β -lyase activity and volatile sulfur compound production. *Applied and Environmental Microbiology* 85:e02684-18
- Cordero-Otero RR, Ubeda-Iranzo JF, Briones-Perez AI, Potgieter N, Villena MA, Pretorius IS, Van Rensburg P (2003) Characterization of the β -glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science* 68:2564-2569
- Cosme F, Vilela A, Filipe-Ribeiro L, Inês A, Nunes FM (2018) *Wine Microbial Spoilage: Advances in Defects Remediation*. In: *Microbial Contamination and Food Degradation*, 271–314. Academic Press, Massachusetts

BIBLIOGRAFÍA

- Coton M, Romano A, Spano G, Ziegler K, Vetrana C, Desmarais C, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Coton E (2010) Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology* 27:1078-1085
- Crépin L, Nidelet T, Sanchez I, Dequin S, Camarasa C (2012) Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Applied and Environmental Microbiology* 78:8102–8111
- Cubillos FA (2016) Exploiting budding yeast natural variation for industrial processes. *Current Genetics* 62:745–751
- Cubillos FA, Brice C, Molinet J, Tisé S, Abarca V, Tapia SM *et al.* (2017) Identification of nitrogen consumption genetic variants in yeast through QTL mapping and bulk segregant RNA-seq analyses. *G3* 7:1693-1705
- Cullen PJ, Sprague GF (2012) The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* 190:23-49
- Cunningham TS, Svetlov VV, Rai R, Smart W, Cooper TG (1996) Gln3p Is capable of binding to UASNTR elements and activating transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 178:3470–3479
- Curiel JA, Morales P, Gonzalez R, Tronchoni J (2017) Different non-*Saccharomyces* yeast species stimulate nutrient consumption in *S. cerevisiae* mixed cultures. *Frontiers in Microbiology* 8:2121
- Dashko S, Zhou N, Compagno C, Piskur J (2014) Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research* 14:826–832
- De Celis M, Ruiz J, Martín-Santamaría M, Alonso A, Marquina D, Navascués E *et al.* (2019) Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneous and inoculated fermenting grapes from Spanish vineyards. *Letters in Applied Microbiology* 68:580-588
- De Deken RH (1966) The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology* 44:149–156
- Deed NK, van Vuuren HJ, Gardner RC (2011) Effects of nitrogen catabolite repression and di-ammonium phosphate addition during wine fermentation by a commercial strain of *S. cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:1537–1549

- Delcroix A, Gunata, Z, Sapis JC, Salmon JM, Bayonove C (1994) Glycosidase activities of here enological yeast strains during winemaking: effect on the terpinol content of Muscat wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 45:291-296
- Divol B, Du Toit M, Duckitt E (2012) Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95:601-613
- Dizzy M, Bisson LF (2000) Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 1:155-167
- Dubourdieu D, Lavigne-Cruege V (2004) The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. *Vinidea.net* 2:1-9
- Duhamel N, Piano F, Davison SJ, Larcher R, Fedrizzi B, Barker D (2015) Synthesis of alkyl sulfonic acid aldehydes and alcohols, putative precursors to important wine aroma thiols. *Tetrahedron Letters* 56:1728-1731
- Dunn B, Richter C, Kvitek DJ, Pugh T, Sherlock G (2012) Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* pan-genome reveals a pool of copy number variants distributed in diverse yeast strains from differing industrial environments. *Genome Research* 22:908–924
- Dutraive O, Benito S, Fritsch S, Beisert B, Patz CD, Rauhut D (2019) Effect of Sequential Inoculation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation* 5:79
- Ebeler SE (2001) Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor. *Food Reviews International* 17:45–64
- Eldarov MA, Beletsky AV, Tanashchuk TN, Kishkovskaya SA, Ravin NV, Mardanov AV (2018) Whole-Genome Analysis of Three Yeast Strains Used for Production of Sherry-Like Wines Revealed Genetic
- Escalera-Fanjul X, Quezada H, Riego-Ruiz L, González A (2019) Whole-Genome duplication and yeast's fruitful way of life. *Trends in Genetics* 35:42-54
- Fay, JC, McCullough, HL, Sniegowski, PD, Eisen, MB (2004) Population genetic variation in gene expression is associated with phenotypic variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology* 5:26

BIBLIOGRAFÍA

- Ferreira V, Ortin N, Cacho JF (2007) Optimization of a procedure for the selective isolation of some powerful aroma thiols. Development and validation of a quantitative method for the determination in wine. *Journal of Chromatography A* 1143:190–198
- Ferreira D, Galeote V, Sanchez I, Legras JL, Ortiz-Julien A, Dequin S (2017) Yeast multistress resistance and lag-phase characterisation during wine fermentation. *FEMS Yeast Res* 17:fox051
- Fidalgo M, Barrales RR, Ibeas JI, Jimenez J (2006) Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene. *PNAS* 103:11228-11233
- Fleet GH, Heard GM (1993). *Yeasts: growth during fermentation*. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*, Chur, Harwood Academic Publishers
- Fleet GH (2003) Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86:11-22.
- Fleet GH (2008) Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* 8:979-995
- Frost R, Quiñones I, Veldhuizen M, Alava JI, Small D, Carreiras M (2015) What can the brain teach us about winemaking? An fMRI study of alcohol level preferences. *PLoS ONE* 10:e0119220
- Galeote V, Novo M, Salema-Oom M, Brion C, Valério E, Gonçalves P *et al.* (2010) *FSY1*, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H⁺ symporter. *Microbiology* 156:3754-3761
- Gallone B, Steensels J, Prah T, Soriaga L, Saels V, Herrera-Malaver B *et al.* (2016) Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell* 166:1397-1410
- Gamero A, Quintilla R, Groenewald M, Alkema W, Boekhout T, Hazelwood L (2016) High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiology* 60:147–159.
- García M, Greetham D, Wimalasena TT, Phister TG, Cabellos JM, Arroyo T (2016) The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates. *Journal of Applied Microbiology* 121:215-233

- García-Ríos E, López-Malo M, Guillamón JM (2014) Global phenotypic and genomic comparison of two *Saccharomyces cerevisiae* wine strains reveals a novel role of the sulfur assimilation pathway in adaptation at low temperature fermentations. *BMC Genomics* 15:1059
- García-Ríos E, Guillamón JM (2019) *Mechanisms of Yeast Adaptation to Wine Fermentations*. In: *Yeasts in Biotechnology and Human Health. Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Springer, Cham
- Gasch AP (2003) *The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses*. In: *Yeast stress responses*. Springer, Cham
- Gasmi N, Jacques PE, Klimova N, Guo X, Ricciardi A, Robert F, Turcotte B (2014) Dual Role for Yeast Ert1: Activator of Gluconeogenic Genes and Repressor of *PDC1*, a Key Fermentation Gene. *Genetics* 3:114
- Gawel R, Sluyter SV, Waters EJ (2007) The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 13:38-45.
- Gerke J, Lorenz K, Cohen B (2009) Genetic interactions between transcription factors cause natural variation in yeast. *Science* 323:498-501
- Giudici P, Solieri L, Pulvirenti M, Cassanelli S (2005) Strategies and perspectives for Genetic improvement of wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:622-628
- Gobbi M, Comitini F, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I *et al.* (2013) *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology* 33:271-281
- Gobert A, Tourdot-Maréchal R, Morge C, Sparrow C, Liu Y, Quintanilla-Casas B *et al.* (2017) Non-*Saccharomyces* yeasts nitrogen source preferences: impact on sequential fermentation and wine volatile compounds profile. *Frontiers Microbiology* 8:2175
- Gobert A, Tourdot-Maréchal R, Sparrow C, Morge C, Alexandre H (2019) Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food Microbiology* 83:71-85

BIBLIOGRAFÍA

- González-Arenzana L, Garijo P, Berlanas C, López-Alfaro I, López R, Santamaría P, *et al.* (2017) Genetic and phenotypic intraspecific variability of non-*Saccharomyces* yeasts populations from La Rioja winegrowing region (Spain). *Journal of Applied Microbiology* 122:378-388
- González-Royo E, Pascual O, Kontoudakis N, Esteruelas M, Esteve-Zarzoso B, Mas A *et al.* (2015) Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology* 240:999-1012
- González B, Vázquez J, Cullen PJ, Mas A, Beltran G, Torija MJ (2018) Aromatic amino acid derived compounds induce morphological changes and modulate the cell growth of wine yeast species. *Frontiers Microbiology* 9:1-16
- Goto-Yamamoto N, Kitano K, Shiki K, Yoshida Y, Suzuki T, Iwata T *et al.* (1998) SSU1-R, a sulfite resistance gene of wine yeast, is an allele of *SSU1* with a different upstream sequence. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86:427–433
- Gramaje D, Úrbez-Torres JR, Sosnowski MR (2018) Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant disease* 102:12-39
- Guilloux-Benatier M, Chassagne D, Alexandre H, Charpentier C, Feuillat M (2001) Influence of yeast autolysis after alcoholic fermentation on the development of *Brettanomyces/Dekkera* in wine. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 35:157–164
- Gutiérrez A, Beltran G, Warringer J, Guillamón JM (2013) Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. *PLoS One* 8:e67166
- Hagman A, Sall T, Compagno C, Piskur J (2013) Yeast "Make-Accumulate-Consume" life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS ONE* 8:12
- Hall C, Brachat S, Dietrich FS (2005) Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 4:1102-1115

- Hall BG, Acar H, Nandipati A, Barlow M (2014) Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution* 31:232-238
- Hansen EC (1896) *Practical studies in fermentation: being contributions to the life history of micro-organisms*. E. & FN Spon.
- Harsch MJ, Gardner RC (2013) Yeast genes involved ion sulfur and nitrogen metabolism affect the production of volatile thiols from Sauvignon Blanc musts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:223–235
- Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJ, Pronk JT, Dickinson JR (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2259–2266
- Heard GM, Fleet GH (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Microbiology* 65:23e28
- Henschke PA, Jiranek V (1993) *Metabolism of nitrogen compounds*. In: *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers
- Hernández L, Espinosa J, Fernandez-Gonzalez M, Briones, A (2003) β -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology* 80:171–176
- Hernández T, Estrella I, Pérez-Gordo M, Alegría EG, Tenorio C, Ruiz-Larrea F *et al.* (2007) Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:5260-5266
- Hinze H, Holzer H (1986) Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Archives of Microbiology* 145:27–31
- Holt S, Cordente AG, Curtin C (2012) *Saccharomyces cerevisiae* STR3 and yeast cystathionine β -lyase enzymes: The potential for engineering increased flavor release. *Bioengineered Bugs* 3:178-180
- Homann OR, Cai H, Becker JM, Lindquist SL (2005) Harnessing natural diversity to probe metabolic pathways. *PLoS Genet* 1:e80

BIBLIOGRAFÍA

- Howell KS, Swiegers JH, Elsey GM, Siebert TE, Bartowsky EJ, Fleet GH *et al.* (2004) Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiology Letters* 240:125-129
- Hranilovic A, Bely M, Masneuf-Pomarede I, Jiranek V, Albertin W (2017) The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PLoS One* 12:e0184652
- Ihmels J, Bergmann S, Gerami-Nejad M, Yanai I, McClellan M, Berman J *et al.* (2005) Rewiring of the yeast transcriptional network through the evolution of motif usage. *Science* 309:938–941.
- Iranzo JU, Perez AB, Canas PI (1998) Study of the oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microbiology* 15:399–406
- Jolly NP, Varela C, Pretorius IS (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* 14:215-237
- Kántor A, Hutková J, Petrová J, Hleba L, Kačániová M (2019) Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 5:282-285
- Kapaklis A (2014) Impact of specific volatile thiols on varietal aroma of wines produced from Greek and some international grape varieties. Ph.D. thesis, Justus-Liebig-University Gießen, Germany
- Kassemeyer HH (2017). *Fungi of grapes*. In: *Biology of Microorganisms on Grapes*. In: *Must and in Wine*. Springer, Cham
- Kellis M, Birren BW, Lander ES (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428:617–624
- Kemsawasd V, Viana T, Ardö Y, Arneborg N (2015) Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:10191–10207
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL (2015) HISAT: A fast-spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12:357–360

- Knaus BJ, Grunwald NJ (2016) VcfR: an R package to manipulate and visualize VCF format data. *BioRxiv*: 041277
- Knight S, Klaere S, Fedrizzi B, Goddard MR (2015) Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific Reports* 5:14233
- Knight SJ, Klaere S, Morrison-Whittle P, Goddard MR (2018) Fungal diversity during fermentation correlates with thiol concentration in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 24:105-112
- Kreuger F (2012) Trim galore: A wrapper around Cutadapt and FastQC to consistently apply adapter and quality trimming to FastQ files, with extra functionality for RRBS data. https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/.
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 35:1216-1223
- Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma-a review. *South African Journal for Enology and Viticulture* 21:97-129
- Lee SJ, Rathbone D, Asimont S, Adden R, Ebeler SE (2004) Dynamic changes in ester formation during Chardonnay juice fermentations with different yeast inoculation and initial brix conditions. *American Journal of Enology and Viticulture* 55:346–354
- Lee J (2016) Further research on the biological activities and the safety of raspberry ketone is needed. *NFS journal* 2:15-18
- Legras J, Karst F (2003) Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* Strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters* 221:249-255
- Legras J, Merdinoglu D, Cornuet J, Karst F (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology* 16:2091-2102
- Legras JL, Erny C, Charpentier C (2014) Population structure and comparative genome hybridization of European flor yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome. *PloS One* 9:e108089.

BIBLIOGRAFÍA

- Legras JL, Moreno-Garcia J, Zara S, Zara G, Garcia-Martinez T, Mauricio JC *et al.* (2016). Flor yeast: new perspectives beyond wine aging. *Frontiers in microbiology*, 7:503
- Legras JL, Galeote V, Bigey F, Camarasa C, Marsit S, Nidelet T, *et al.* (2018) Adaptation of *S. cerevisiae* to fermented food environments reveals remarkable genome plasticity and the footprints of domestication. *Molecular Biology and Evolution* 35:1712-1727
- Lerm E, Engelbrecht L, Du Toit, M (2010) Malolactic fermentation: the ABC's of MLF. *South African Journal for Enology and Viticulture* 31:186-212
- Letunic I, Bork P (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* 44:242-245
- Lewis JA, Broman AT, Will J, Gasch AP (2014) Genetic architecture of ethanol-responsive transcriptome variation in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Genetics* 198:369–382
- Li H, Durbin R (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* 26:589–595
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) featureCounts: An efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930
- Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, *et al.* (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 458:337-341
- Liti, G, Louis EJ (2012) Advances in quantitative trait analysis in yeast. *PLoS Genetics* 8:e1002912
- Liti G (2015) The Natural History of Model Organisms: The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. *Elife* 4:e05835
- Liu SQ (2002) Malolactic fermentation in wine - beyond acidification (A review). *Journal of Applied Microbiology* 92:589-601
- Liu Y, Rousseaux S, Tourdot–Maréchal R, Sadoudi M, Gougeon R, Schmitt–Kopplin P, Alexandre H (2018) Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57:856–873
- Liu D, Zhang P, Chen D, Howell K (2019) From the Vineyard to the Winery: How Microbial Ecology Drives Regional Distinctiveness of Wine. *Frontiers in Microbiology* 10:2679

- Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA *et al.* (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 458:337-341
- Lleixà J, Manzano M, Mas A, Portillo MC (2016) *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugars and Nitrogen Conditions. *Frontiers in Microbiology* 7:1959
- López S, Prieto M, Dijkstra J, Dhanoa MS, France J (2004) Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology* 96:289–300
- López-Malo M, García-Ríos E, Chiva R, Guillamon JM (2014) Functional analysis of lipid metabolism genes in wine yeasts during alcoholic fermentation at low temperature. *Microbial Cell* 1:1–11
- Lorentzen MPG, Lucas PM (2019) Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:2937–2945
- Loureiro V, Malfeito-Ferreira M (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86:23–50
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15:550
- Lu L, Roberts G, Simon K, Yu J, Hudson AP (2003) Rsf1p, a protein required for respiratory growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 43:263–272
- Luo Z, van Vuuren HJJ (2008) Stress-induced production, processing and stability of a seripauperin protein, Pau5p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 8:374–385
- Ma M, Liu ZL (2010) Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:829–845
- Magasanik B, Kaiser CA (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290:1–18
- Magyar I, Tóth T (2011) Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28:94–100

BIBLIOGRAFÍA

- Malfeito-Ferreira M, Silva AC (2019) *Spoilage Yeasts in Wine Production*. In: Yeasts in the Production of Wine. Springer
- Maicas S, Mateo JJ (2005) Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67:322–335
- Mandl K, Schieck J, Silhavy-Richter K, Alexander P, Schneider V, Schmidt HP (2015) Vines take up yeasts from soil and transport them through the vine to the stem and skins of grapes. *Ithaka Journal* 349–355.
- Marquina D, Santos A, Peinado J (2002) Biology of killer yeasts. *International Microbiology* 5:65–71
- Marsit S, Dequin S (2015) Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS yeast research* 15:fov067
- Marsit S, Mena A, Bigey F, Sauvage FX, Couloux A, Guy J, *et al.* (2015). Evolutionary Advantage Conferred by an Eukaryote-to-Eukaryote Gene Transfer Event in Wine Yeasts. *Molecular Biology and Evolution* 32:1695-1707
- Marullo P, Mansour C, Dufour M, Albertin W, Sicard D, Bely M, *et al.* (2009) Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. *FEMS yeast research* 9:1148-1160
- Mateo JJ, Peris L, Ibanez C, Maicas S (2011) Characterization of glycolytic activities from non-*Saccharomyces* yeasts isolated from bobal musts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38:347–354
- McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA *et al.* (2004) Fermented beverages of pre-and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:17593-17598
- McGovern P, Jalabadze M, Batiuk S, Callahan MP, Smith KE, Hall GR *et al.* (2017) Early neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:10309-10318
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A *et al.* (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 20:1297-1303

- Medina-Trujillo L, González-Royo E, Siczkowski N, Heras J, Canals JM, Zamora F (2017) Effect of sequential inoculation (*Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foaming properties of sparkling wine. *European Food Research and Technology* 243:681-688
- Mencher A, Morales P, Valero E, Tronchoni J, Patil KR, Gonzalez R (2020) Proteomic characterization of extracellular vesicles produced by several wine yeast species. *Microbial Biotechnology* 13:1581-1596
- Mendes I, Franco-Duarte R, Umek L, Fonseca E, Drumonde-Neves J, Dequin S, *et al.* (2013) Computational models for prediction of yeast strain potential for winemaking from phenotypic profiles. *PLoS One* 8:e66523
- Mendes-Ferreira A, Mendes-Faia A, Leao C (2002) Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. *Journal of Food Protection* 65:1033–1037
- Mendes-Ferreira A, Del Olmo M, García-Martínez J, Jiménez-Martí E, Mendes-Faia A, Pérez-Ortín JE *et al.* (2007) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 73:3049–3060
- Mendes-Ferreira A, Barbosa C, Jiménez-Martí E, del Olmo M, Mendes-Faia A (2010) The wine yeast strain-dependent expression of genes implicated in sulfide production in response to nitrogen availability. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:1314–1321
- Mestres M, Busto O, Guasch J (2000) Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A* 881:569–581
- Milanovic V, Ciani M, Oro L, Comitini F (2012) *Starmerella bombicola* influences the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* at pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase level during mixed wine fermentation. *Microbial Cell Factories* 11:18
- Mills DA, Johannsen EA, Cocolin L (2002) Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4884-4893
- Minh BQ, Nguyen AT, von Haeseler A (2013) Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. *Molecular Biology and Evolution* 30:1188–1195

BIBLIOGRAFÍA

- Mira NP, Teixeira MC, Sá-Correia I (2010) Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. *OMICS* 14:525-40
- Moreira N, Mendes F, Hogg T, Vasconcelos I (2005) Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 103:285-294
- Mortimer R, Polsinelli M (1999) On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150:199-204
- Morrison-Whittle P, Goddard MR (2018) From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. *Environmental Microbiology* 20:75–84
- Murat ML, Masneuf I, Darriet P, Lavigne V, Tominaga T, Dubourdieu D (2001) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon blanc wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 52:136–139
- Nagasawa N, Bogaki T, Iwamatsu A, Hamachi M, Kumagai C (1998) Cloning and Nucleotide Sequence of the Alcohol Acetyltransferase II Gene (*ATF2*) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62:1852–1857
- Nardi T, Corich V, Giacomini A, Blondin B (2010) A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene *SSU1* in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *Microbiology* 156, 1686-1696
- Navarro-Tapia E, Querol A, Pérez-Torrado R (2018) Membrane fluidification by ethanol stress activates unfolded protein response in yeasts. *Microb Biotechnol* 11:465–475.
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32:268–274
- Nikolaou E, Soufleros EH, Bouloumpasi E, Tzanetakis N (2006) Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology* 23:205-211
- Nissen P, Nielsen D, Arneborg N (2003) Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell–cell contact mediated mechanism. *Yeast* 20:331–341

- Noble J, Sanchez I, Blondin B (2015) Identification of new *Saccharomyces cerevisiae* variants of the *MET2* and *SKP2* genes controlling the sulfur assimilation pathway and the production of undesirable sulfur compounds during alcoholic fermentation. *Microbial Cell Factories* 14:68.
- Novo M, Bigey F, Beyne E, Galeote V, Gavory F, Mallet S, *et al.* (2009) Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *PNAS* 106:16333-8
- Okonechnikov K, Conesa A, Garcia-Alcalde F (2016) Qualimap 2: Advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 32:292–294
- OIV (2019) State of the world vitivinicultural sector in 2019. https://www.oiv.int/public/medias/7298/c_oiv-state-of-the-vitivinicultural-sector-in-2019.pdf
- Origone AC, Rodríguez ME, Oteiza JM, Querol A, Lopes CA (2018) *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces uvarum* hybrids generated under different conditions share similar winemaking features. *Yeast* 35:157–171
- Oro L, Ciani M, Comitini F (2014) Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 116:1209–1217
- Ough CS, Bell AA (1980) Effects of nitrogen fertilization of grapevine on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 31:122–123
- Padilla B, Gil JV, Manzanares P (2016) Past and future of Non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers Microbiol* 7:411
- Pasteur L (1860) Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Annales de Chimie et de Physique* 58, 323-426.
- Peltier E, Bernard M, Trujillo M, Prodhomme D, Barbe J, Gibomn Y, Marullo P (2018) Wine yeast phenomics: a standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions. *PLoS One* 13:e0190094

BIBLIOGRAFÍA

- Perpetuini G, Tittarelli F, Battistelli N, Suzzi G, Tofalo R (2020) Contribution of *Pichia manshurica* strains to aroma profile of organic wines. *European Food Research and Technology* 1-13
- Pérez-Magariño S, Cano-Mozo E, Albors C, Santos A, Navascués E (2021) Autochthonous *Oenococcus oeni* strain to avoid histamine formation in red wines: A study in real winemaking conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*. *American Journal of Enology and Viticulture*, *Aceptado para su publicación*
- Pérez-Ortín JE, Querol A, Puig S, Barrio E (2002) Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Research* 12:1533–9
- Pérez-Serradilla JA, Luque De Castro MD (2008) Role of lees in wine production: A review. *Food chemistry* 111:447-456
- Pérez-Torrado R, Carrasco P, Aranda A, Gimeno-Alcañiz J, Pérez-Ortín JE, Matallana E, del Olmo, M (2002) Study of the first hours of microvinification by the use of osmotic stress-response genes as probes. *System Applied Microbiology* 25:153e161
- Peter J, De Chiara M, Friedrich A, Yue JX, Pflieger D, Bergström A (2018) Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature* 556:339-344
- Petrie PR, Sadras VO (2008) Advancement of grapevine maturity in Australia between 1993 and 2006: putative causes, magnitude of trends and viticultural consequences. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14:33-45
- Pfeiffer T, Morley A (2014) An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences* 1:17
- Piao H, Hawley E, Kopf S, DeScenzo R, Sealock S, Henick-Kling *et al.* (2015) Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes. *Frontiers Microbiology* 6:809
- Pinu FR, Jouanneau S, Nicolau L, Gardner GC, Villas-Boas SG (2012) Concentrations of the volatile thiol 3-mercaptohexanol in Sauvignon blanc wines: No correlation with juice precursors. *American Journal of Enology and Viticulture* 63:107–412
- Piskur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A, Compagno C (2006) How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics* 22:183–186

- Polaskova P, Herszage J, Ebeler SE (2008) Wine flavor: Chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews* 37:2478–2489
- Pontes A, Hutzler M, Brito PH, Sampaio JP (2020) Revisiting the taxonomic synonyms and populations of *Saccharomyces cerevisiae*—Phylogeny, phenotypes, ecology and domestication. *Microorganisms* 8:903.
- Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. *Yeast* 16:675–729
- Pretorius IS, Boeke JD (2018) Yeast 2.0-connecting the dots in the construction of the world's first functional synthetic eukaryotic genome. *FEMS Yeast Research* 18:foy032
- Pretorius IS (2020) Tasting the terroir of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Research* 20:foz084
- Pulvirenti A, De Vero L, Blaiotta G, Sidari R, Iosca G, Gullo M, Caridi A (2020) Contribution of *Pichia manshurica* strains to aroma profile of organic wines. *European Food Research and Technology* 246:1405–1417
- Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramón D (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied Environmental Microbiology* 58:2948–2953
- Quirós C, Herrero M, García LA, Díaz M (2012) Effects of SO₂ on lactic acid bacteria physiology when used as a preservative compound in malolactic fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 118:89-96
- Ramírez M, Velázquez R, Maqueda M, López-Piñeiro A, Ribas JC (2015) A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Frontiers in Microbiology* 6:983
- Ramírez M, Velázquez R (2018) The Yeast *Torulaspora delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. *Fermentation* 4:94
- Ramón D, González R (2011) *Improvement of Wine Yeasts by Genetic Engineering*. In: *Molecular wine microbiology*. Academic Press, Cambridge
- Rapp A, Mandery H (1986) Wine aroma. *Experientia* 42:873–884

BIBLIOGRAFÍA

- Rapp A, Yavas I, Hastrich U (1994). Einfache und schnelle Anreicherung (Kaltronmethode) von Aromastoffen des Weines und deren quantitative Bestimmung mittels Kapillargaschromatographie. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 90:171–174
- Rauhut D (2017) *Usage and Formation of Sulphur Compounds*. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Cham
- Renault PE, Albertin W, Bely M (2013) An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:4105–19
- Renault P, Coulon J, Moine V, Thibon C, Bely M (2016) Enhanced 3–Sulfanylhexas–1–ol Production in Sequential Mixed Fermentation with *Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Situation of Synergistic Interaction between Two Industrial Strains. *Frontiers in Microbiology* 7:293
- Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:149–16
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donéche B, Lonvaud A (2006) *The microbiology of wine and vinifications*. In: *Handbook of enology*. Wiley, New Jersey
- Rivero D, Berná L, Stefanini I, Baruffini E, Bergerat A, Csikász-Nagy A *et al.* (2015) Hsp12p and *PAU* genes are involved in ecological interactions between natural yeast strains. *Environmental Microbiology* 17:3069–3081
- Roca-Mesa H, Sendra S, Mas A, Beltran G, Torija MJ (2020) Nitrogen preferences during alcoholic fermentation of different non-*Saccharomyces* yeasts of oenological interest. *Microorganisms* 8:157
- Rodríguez ME, Lopes CA, Barbagelata RJ, Barda NB, Caballero AC (2010) Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behavior and wine aroma. *International Journal of Food Microbiology* 138:19–25
- Roland A, Vialaret J, Razungles A, Rigou P, Scheneider R (2010) Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon Blanc Musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:4406–4413
- Rollero S, Bloem A, Ortiz-Julien A, Camarasa C, Divol B (2018) Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients

- between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. *Frontiers in Microbiology* 9:196
- Rollero S, Mouret JR, Sanchez I, Camarasa C, Ortiz-Julien A, Sablayrolles JM *et al.* (2016) Key role of lipid management in nitrogen and aroma metabolism in an evolved wine yeast strain. *Microbial Cell Factories* 15:1–15
- Roncoroni M, Santiago M, Hooks DO, Moroney S, Harsch MJ, Lee SA, *et al.* (2011) The yeast *IRC7* gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiology* 28:926–935
- Rossouw D, Meiring SP, Bauer FF (2018) Modifying *Saccharomyces cerevisiae* adhesion properties regulates yeast ecosystem dynamics. *mSphere* 14:10–1
- Ruiz J, Belda I, Beisert B, Navascués E, Marquina D, Calderón F *et al.* (2018) Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:8501-8509
- Ruiz J, Kiene F, Belda I, Fracassetti D, Marquina D, Navascués E *et al.* (2019a) Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:7425-7450.
- Ruiz J, Ortega N, Martín-Santamaría M, Acedo A, Marquina D, Pascual O *et al.* (2019b) Occurrence and enological properties of two new non-conventional yeasts (*Nakazawaea ishiwadae* and *Lodderomyces elongisporus*) in wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 305:108255
- Ruiz J, de Celis M, de Toro M, Mendes-Ferreira A, Rauhut D, Santos A *et al.* (2020a) Phenotypic and transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation in response to nitrogen nutrition and co-inoculation with *Torulasporea delbrueckii*. *Food Research International* 137:109663
- Ruiz J, de Celis M, Martín-Santamaría M, Benito-Vázquez I, Pontes A, Lanza VF *et al.* (2020b) New insights into the paradoxical distribution of *IRC7* in *Saccharomyces cerevisiae* and its associated phenotypic and genomic landscapes. *BioRxiv*
- Sadoudi M, Tourdot-Maréchal R, Rousseaux S, Steyer D, Gallardo-Chacón JJ, Ballester J (2012) Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc

BIBLIOGRAFÍA

- wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology* 32:243-253
- Sadoudi M, Rousseaux S, David V, Alexandre H, Tourdot-Maréchal R (2017) *Metschnikowia pulcherrima* influences the expression of genes involved in PDH bypass and glyceropyruvic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers Microbiol* 8:1137
- Sahara T, Goda T, Ohgiya S (2002) Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *Journal of Biological Chemistry* 277:50015–50021
- Salmon JM, Barre P (1998) Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3831–3837
- Santiago M, Gardner RC (2015a) Yeast genes required for conversion of grape precursors to varietal thiols in wine. *FEMS Yeast Research* 15:fov034
- Santiago M, Gardner RC (2015b) The *IRC7* gene encodes cysteine desulphydrase activity and confers on yeast the ability to grow on cysteine as a nitrogen source. *Yeast* 32:519–532
- Santos A, San Mauro M, Bravo E, Marquina D (2009) PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology (Reading)* 155:624-634
- Santos J, Sousa MJ, Cardoso H, Inacio J, Silva S, Spencer-Martins I (2008) Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology* 154:422-430
- Santos J, Sousa MJ, Leão C (2012) Ammonium is toxic for aging yeast cells, inducing death and shortening of the chronological lifespan. *PLoS ONE* 7:e37090
- Schneider A, Gerbi V, Redoglia MA (1987) Rapid HPLC method for separation and determination of major organic acids in grape musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 38:151–155.

- Schneider R, Charrier F, Razungles A, Baumes R (2006) Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta* 563:58–64
- Schwarz LV, Marcon AR, Delamare APL, Agostini F, Moura S, Echeverrigaray S (2020) Selection of low nitrogen demand yeast strains and their impact on the physicochemical and volatile composition of mead. *Journal of Food Science and Technology* 57:2840–2851
- Seguinot P, Bloem A, Brial P, Meudec E, Ortiz-Julien A, Camarasa C (2020) Analysing the impact of the nature of the nitrogen source on the formation of volatile compounds to unravel the aroma metabolism of two non-*Saccharomyces* strains. *International Journal of Food Microbiology* 316:108441
- Schmidt SA, Kolouchova R, Forgan AH, Borneman AR (2020) Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast competitive fitness in enologically relevant environments by barcode sequencing. *G3*:591–603
- Servienė E, Lukša J, Orentaitė I, Lafontaine DL, Urbonavičius J (2012) Screening the budding yeast genome reveals unique factors affecting K2 toxin susceptibility. *PLoS One* 7:e50779
- Shekhawat K, Patterson H, Bauer FF, Setati ME (2019) RNA-seq based transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in mixed-culture fermentations under anaerobic conditions. *BMC Genomics* 20:145
- Shi X, Zou Y, Chen Y, Ying H (2018) Overexpression of *THI4* and *HAP4* improves glucose metabolism and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology* 9:1444
- Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C *et al.* (2008) *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* 135:726–37
- Sicard D, Legras J (2011) Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies* 334:229–36

BIBLIOGRAFÍA

- Sipiczki M (2006) *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6716–6724
- Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA (2010) The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 109:13–24
- Steel CC, Blackman JW, Schmidtke LM (2013) Grapevine bunch rots: impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 61:5189-5206
- Steensels J, Gallone B, Voordeckers K, Verstrepen KJ (2019) Domestication of Industrial Microbes. *Current Biology*. 29:381-393
- Stefanini I, Dapporto L, Legras J, Calabretta A, Paola MD, Filippo CD, *et al.* (2012) Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *PNAS* 109:13398–13403
- Subileau M, Schneider R, Salmon JM, Degryse E (2008) Nitrogen Catabolite Repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon blanc at the level of precursor transport. *FEMS Yeast Res* 8:771–780
- Swiegers JH, Bartowsky PA, Henschke PA, Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11:139-173
- Swiegers J, Pretorius I (2007) Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:954–960
- Su Y, Seguinot P, Sanchez I, Ortiz–Julien A, Heras JM, Querol A (2020) Nitrogen sources preferences of non–*Saccharomyces* yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions. *Food Microbiology* 85:103287
- Tao Y, García JF, Sun DW (2014) Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54:817-835
- Tarasov A, Rauhut D, Jung R (2017) “Cork taint” responsible compounds. Determination of haloanisoles and halophenols in cork matrix: A review. *Talanta* 175:82-92

- Team RC (2013) R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org/>.
- Tempère S, Marchal A, Barbe JC, Bely M, Masneuf-Pomadere, Marullo P, *et al.* (2018) The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:3995-4007
- Tesnière C, Brice C, Blondin B (2015) Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:7025–7034
- Teixeira MC, Raposo LR, Mira NP, Lourenço AB, Sá-Correia I (2009) Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Applied and Environmental Microbiology* 75:5761–5772
- Thibon C, Marullo P, Claisse O, Cullin C, Dubourdiou D, Tominaga T (2008) Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 8:1076–1086
- Thomson JM, Gaucher EA, Burgan MF, De Kee DW, Li T, *et al.* (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature Genetics* 37:630–5
- Tofalo R, Perpetuini G, Battistelli N, Tittarelli F, Suzzi G (2020) Correlation between *IRC7* gene expression and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one production in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast* 37: 487-495
- Tominaga T, Masneuf I, Dubourdiou D (1995) A S-cysteine conjugate precursor of aroma of white sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 29:227–232
- Tominaga T, Dubourdiou D (2006) A novel method for quantification of 2-methyl-3-furanthiol and 2-furanmethanethiol in wines made from *Vitis vinifera* grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:29–33.
- Tondini F, Onetto CA, Jiranek V (2020) Early adaptation strategies of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* to co-inoculation in high sugar grape must-like media. *Food Microbiology* 90:103463
- Tronchoni J, Medina V, Guillamón JM, Querol A, Pérez-Torrado R (2014) Transcriptomics of cryophilic *Saccharomyces kudriavzevii* reveals the key role of gene translation efficiency in cold stress adaptations. *BMC Genomics* 15:432

BIBLIOGRAFÍA

- Tronchoni J, Curiel JA, Morales P, Torres-Pérez R, Gonzalez R (2017) Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology* 241:60–68
- Ubeda-Iranzo JF, Briones-Perez AI, Izquierdo-Canas PM (1998) Study of the oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microbiology* 15:399-406
- van Dijken JP, Weusthuis RA, Pronk JT (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63:343–352
- van Wyk N, Kroukamp H, Espinosa MI, von Wallbrunn C, Wendland J, Pretorius IS (2020) Blending wine yeast phenotypes with the aid of CRISPR DNA editing technologies. *International Journal of Food Microbiology* 324:108615
- Velázquez R, Zamora E, Álvarez ML, Hernández LM, Ramírez M (2015) Effects of new *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Frontiers in Microbiology* 6:1222
- Varela C, Barker A, Tran T, Borneman A, Curtin C (2017) Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *International Journal of Food Microbiology* 252:1–9
- Varela C, Bartel C, Nandorfy DE, Borneman A, Schmidt S, Curtin C (2020). Identification of flocculant wine yeast strains with improved filtration-related phenotypes through application of high-throughput sedimentation rate assays. *Scientific Reports* 10:2738
- Veech JA (2013) Probabilistic model for analysing species co-occurrence. *Global Ecology and Biogeography* 60122:252–260
- Vermeersch L, Perez-Samper G, Cerulus B, Jariani A, Gallone B, Voordeckers K *et al.* (2019) On the duration of the microbial lag phase. *Current Genetics* 65:721-727
- Viana F, Gil JV, 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*. *International Journal of Food Microbiology* 135:68-74
- Vicente J, Ruiz J, Belda I, Benito-Vázquez I, Marquina D, Calderón F *et al.* (2020) The Genus *Metschnikowia* in Enology. *Microorganisms* 8:1038

- Villalba ML, Sáez JS, del Monaco S, Lopes CA, Sangorrín, MP (2016) TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 217:94-100
- Vilela A (2019) Use of Nonconventional Yeasts for Modulating Wine Acidity. *Fermentation* 5:27
- Voordeckers K, Kominek J, Das A, Espinosa-Cantú A, De Maeyer D, Arslan A *et al.* (2015) Adaptation to high ethanol reveals complex evolutionary pathways. *PLoS Genetics* 11:e1005635
- Walker ME, Nguyen TD, Liccioli T, Schmid F, Kalatzis N, Sundstrom JF (2014) Genome-wide identification of the Fermentome; genes required for successful and timely completion of wine-like fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 15:552
- Waterhouse AL, Sacks GL, Jeffery DW (2016) *S-conjugated*. In: *Understanding Wine Chemistry*. Wiley, New Jersey
- Warringer J, Blomberg A (2003) Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20:53-67
- Warringer J, Zörgö E, Cubillos FA, Zia A, Gjuvsland A, Simpson JT *et al.* (2011) Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS Genetics* 7:e1002111
- Warringer J, Blomberg A (2014) *Yeast phenomics-large scale mapping of the genetic basis for organismal traits*. In: *Phenomics*. CRC Press, Florida
- Wells A, Osborne JP (2011) Production of SO₂ binding compounds and SO₂ by *Saccharomyces* during alcoholic fermentation and the impact on malolactic fermentation. *South African Journal of Enology and Viticulture* 32:267-279
- Wenger JW, Schwartz K, Sherlock G (2010) Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics* 6:e1000942
- Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, *et al.* (2019) Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software* 4:1686

BIBLIOGRAFÍA

- Will JL, Kim HS, Clarke J, Painter JC, Fay JC, Gasch AP (2010) Incipient balancing selection through adaptive loss of aquaporins in natural *Saccharomyces cerevisiae* populations. *PLoS Genetics* 6:e1000893
- Yang KM, Lee NR, Woo JM, Choi W, Zimmermann M, Blank LM *et al.* (2012) Ethanol reduces mitochondrial membrane integrity and thereby impacts carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 12:675–684
- Yu G, Wang LG, Han Y, He QY (2012) clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 16:284–287
- Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annual Review of Genetics* 42:27-81
- Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P, West K, Hampton-Marcell J, Lax S *et al.* (2015) The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio* 6:2527-2514
- Zietsman AJ, de Klerk D, van Rensburg P (2011) Coexpression of α -l-arabinofuranosidase and β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 11:88-103
- Zhang W, Du G, Zhou J, Chen J (2018) Regulation of sensing, transportation, and catabolism of nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82:1–29
- Zimmer A, Durand C, Loira N, Durrens P, Sherman DJ, Marullo P (2014) QTL dissection of Lag phase in wine fermentation reveals a new translocation responsible for *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to sulfite. *PLoS One* 9:e86298.
- Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I (2008) Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125:197-203
- Zott K, Thibon C, Bely M, Lonvaud-Funel A, Dubourdieu D, Masneuf-Pomarede I (2011) The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology* 151:210–215

