

INTERACCIONES ENTRE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL VINO

Aarón Javierre Ortin

TRABAJO FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: María Jesús Torija Martínez, Grado de Biotecnología,
Departamento de Biotecnología y Bioquímica, mjesus.torija@urv.cat

En cooperación con: Grupo de Biotecnología Enológica, Departamento de
Bioquímica y Biotecnología, URV

Supervisora: María Jesús Torija Martínez, Grado de Biotecnología,
Departamento de Biotecnología y Bioquímica, mjesus.torija@urv.cat

ÍNDICE

DATOS DEL CENTRO	1
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	2
INTRODUCCIÓN	3
EL VINO Y SU MICROBIOLOGÍA	3
FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	3
ECOLOGÍA Y DINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA	4
FERMENTACIÓN INOCULADA	5
LEVADURAS <i>NO-SACCHAROMYCES</i>	6
USO DE LAS LEVADURAS <i>NO-SACCHAROMYCES</i> EN LA VINIFICACIÓN	8
INTERACCIONES ENTRE LEVADURAS EN FERMENTACIONES MIXTAS	9
<i>LACHANCEA THERMOTOLERANS</i> Y <i>TORULASPORA DELBRUECKII</i>	12
PROBLEMÁTICA	14
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO	18
METODOLOGÍA	19
MICROORGANISMOS UTILIZADOS	19
FERMENTACIONES	19
ANÁLISIS	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
CONCLUSIÓN	35
CONSECUENCIAS DEL COVID-19 Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	36
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	40
ANEXO 1: PREPARACIÓN DE MOSTO SINTÉTICO	40
ANEXO 2: PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	42
ANEXO 3: PROTOCOLO DNEASY PLANT MINI KIT (QIAGEN; 69104)	43
ANEXO 4: PCR CUANTITATIVA (qPCR)	44
ANEXO 5: ANÁLISIS DE DENSIDAD ÓPTICA DE LAS FERMENTACIONES	46
ANEXO 6: ANÁLISIS BIOQUÍMICOS	47
AUTOEVALUACIÓN	48

Datos del centro

El estudio se ha llevado a cabo en los laboratorios del Campus Sescelades en la Universitat Rovira i Virgili, dentro del grupo de investigación de Biotecnología Enológica, a cargo de la Dra. María Jesús Torija Martínez.

El grupo consta de diferentes líneas de investigación relacionadas con los microorganismos involucrados en la producción del vino, las levaduras y las bacterias lácticas. Concretamente, yo me he incorporado a la línea de investigación sobre levaduras, donde se trabaja en el desarrollo de técnicas para la identificación y cuantificación de las levaduras a lo largo de la fermentación, en el estudio de las interacciones entre levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*, en el estudio de diferentes estrategias microbiológicas para reducir el contenido de etanol de los vinos y en la producción de compuestos bioactivos por parte de las levaduras, principalmente enfocado a la síntesis de melatonina.

Además, como el grupo forma parte de la Facultad de Enología, tiene a su disposición las instalaciones de la bodega Mas dels Frares, donde se hacen fermentaciones experimentales para diversos estudios.

Resumen y palabras clave

En anteriores investigaciones se han observado interacciones entre una cepa de *Lachancea Thermotolerans* (*Lt2*) y una cepa de *Torulaspota delbrueckii* (*Td5*) cuando comparten medio de cultivo. Visto el comportamiento de ambas especies, se quiere determinar el mecanismo de interacción entre las cepas *Td5* y *Lt2*. Para ello, se realizaron fermentaciones secuenciales y fermentaciones mixtas (coinoculaciones) en mosto sintético con ambas cepas. En unas de las fermentaciones secuenciales se mantenía *Td5* en el momento de inocular *Lt2*, además, se añadían 100 mg/L de nitrógeno asimilable (YAN). En las otras fermentaciones secuenciales, se eliminaba *Td5* antes de la inoculación de *Lt2* y la adición de nitrógeno asimilable. Con estas metodologías se quiso comprobar si los problemas de fermentación observados se debían a la falta de nutrientes, a la secreción de alguna molécula o la acción combinada de ambos. Las fermentaciones se analizaron midiendo la cinética de fermentación, mediante análisis de densidad del mosto, y midiendo la evolución de la población de levaduras, mediante densidad óptica, siembra en placa y PCR cuantitativa (qPCR). Los resultados obtenidos fueron similares a los estudios anteriores, observándose una inhibición del crecimiento entre las cepas cuando se coinoculan en ratio 1:1 y en inoculaciones secuenciales filtradas. Sin embargo, se observa una sinergia en la fermentación secuencial cuando ambas levaduras mantienen contacto. Analizando los resultados se concluye que la falta de nitrógeno asimilable no es la causa de la inhibición de la fermentación, por lo que se requieren más investigaciones para conocer el mecanismo de la inhibición.

Palabras clave: *Torulaspota delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, Interacciones entre levaduras, *no-Saccharomyces* y Fermentación alcohólica.

Introducción

El vino y su microbiología

El mosto de uva es un sustrato que contiene varios tipos de microorganismos, donde puede darse el crecimiento de diversidad de levaduras con capacidad de fermentarlo, convirtiendo el contenido inicial de azúcar en etanol, CO₂ y otros subproductos. El agente más importante de la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae*.

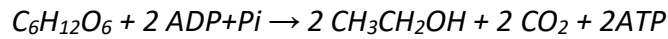
La población de microorganismos de las uvas incluye hongos filamentosos, levaduras y bacterias con diferentes características fisiológicas y diferente impacto sobre la calidad del vino final. En 1998, Kurtzman & Fell describieron la población de levaduras asociadas a la uva en 15 géneros diferentes: *Dekkera/Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, y *Zygosaccharomyces*. Posteriormente, esta clasificación se ha ido modificando hasta más de 40 géneros de levadura diferentes por el aislamiento e identificación de nuevas especies, así como la reclasificación de algunas especies, como *Candida zemplinina*, actualmente conocida como *Starmerella bacillaris* (Revisado por Romano et al., 2019).

La presencia de levaduras en la superficie de las uvas puede variar en niveles cualitativos y cuantitativos también en función de los tratamientos agroquímicos y de la región donde se cultiva. Estas comunidades microbianas se relacionan con rasgos climáticos específicos, estableciendo una relación entre las condiciones ambientales del viñedo y los patrones de hábitado de los microorganismos.

El uso de *S. cerevisiae* como cultivo iniciador es la práctica más extendida en la elaboración del vino. En las últimas décadas, numerosos estudios (Ciani et al., 2016; Ciani et al., 2010; Ciani & Comitini, 2019; Petitgonnet et al., 2019) han descrito la importancia de las levaduras *no-Saccharomyces* en la mejora de la complejidad aromática del vino. En este contexto, se propone la inclusión de ciertas levaduras *no-Saccharomyces* junto con *S. cerevisiae* para mejorar las propiedades químicas y sensoriales del vino.

Fermentación alcohólica

El alcohol que caracteriza la mayoría de las bebidas fermentadas es resultado del metabolismo de las levaduras, que convierten el azúcar presente en el sustrato (fruta, cereales, ...) y otras fuentes de carbono en etanol. A partir de azúcares como la glucosa se dan las reacciones de glucólisis y fermentación alcohólica dando como resultado la siguiente reacción:



La fermentación del vino es llevada a cabo típicamente por un complejo de microorganismos que involucran bacterias y levaduras. Junto con *S. cerevisiae*, las especies *no-Saccharomyces* participan activamente durante la fermentación alcohólica. En el pasado, estas levaduras se consideraban negativas para el vino ya que no son capaces de realizar la fermentación y tienen una alta producción de productos no deseados que afectan al perfil aromático del vino. Recientemente, varios estudios han reevaluado el papel de las levaduras *no-Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica y su impacto en las características sensoriales de los vinos blancos y tintos (Romano et al., 2019; Varela, 2016).

Ecología y dinámica de la fermentación espontánea

Hasta la década de 1980, el vino se producía en gran medida por fermentación espontánea, dependiendo de la microbiota que residía en las uvas, en el viñedo y en la bodega. Las uvas representan un nicho ecológico complejo donde conviven hongos filamentosos, levaduras y bacterias. La comunidad microbiana que coloniza este nicho ecológico incluye especies cuya concentración depende de múltiples factores, los más importantes están relacionados con la maduración de la uva y la disponibilidad de nutrientes. Las comunidades microbianas pueden verse afectadas por muchas otras variables como prácticas vitícolas, factores climáticos, enfermedades y plagas que podrían modificar la integridad de la uva (Varela, 2016).

De forma general, se puede decir que *Hanseniaspora* y su forma anamorfa, *Kloeckera*, es el género predominante en la uva, con más del 50% de la población total. En menor medida, se detectan especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Starmerella*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Metschnikowia* y *Kluyveromyces (Lachancea)*, entre otros (Heard & Fleet, 1988; Mills et al., 2002; Rosini et al., 1982).

Durante las fermentaciones, especialmente en fermentaciones espontáneas, hay una sucesión secuencial de levaduras (Figura 1). A pesar de la presencia sostenida de ciertas levaduras *no-Saccharomyces*, no es posible recuperar en placas la mayoría de levaduras durante las primeras etapas de fermentación debido a su lento crecimiento y a la inhibición por los efectos combinados del SO₂, el pH, el aumento de etanol y la deficiencia de oxígeno.

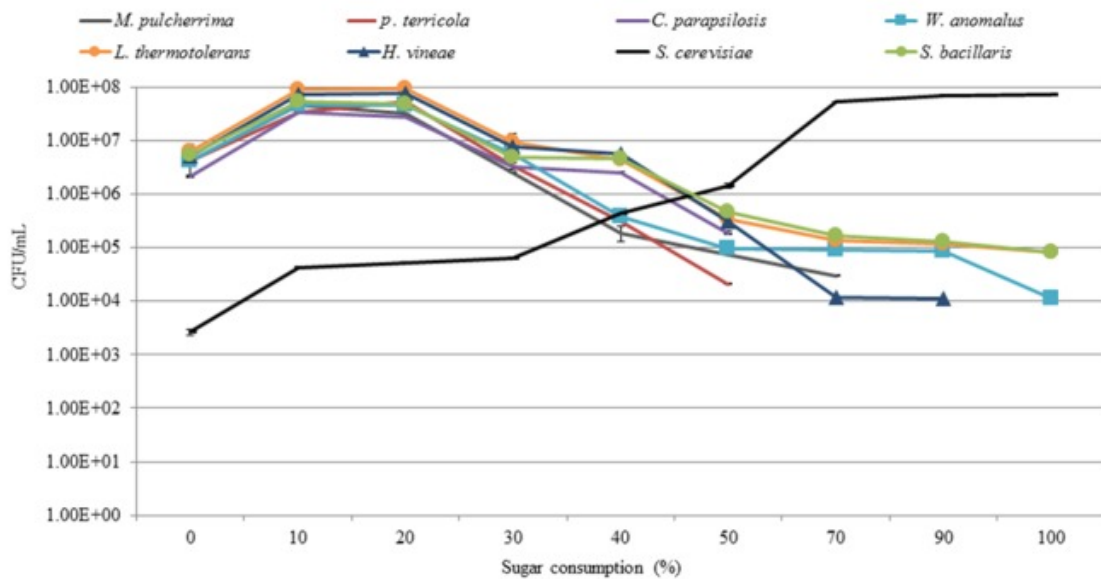


Figura 1. Perfiles de crecimiento de la población de levaduras durante la fermentación NS-Sc del mosto (Bagheri et al., 2017).

NS-Sc: *no-Saccharomyces-Saccharomyces*

Conforme avanza la fermentación, la concentración de azúcares disponibles en el mosto disminuye y aumenta la concentración de etanol, provocando, inicialmente, la imposición de especies *no-Saccharomyces* con mayor resistencia al etanol, como los géneros *Torulaspora* y *Lachancea*. Posteriormente, son las especies del género *Saccharomyces*, y especialmente *S. cerevisiae*, las que dominan el proceso desde mitad de fermentación hasta que todos los azúcares fermentables son consumidos (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

La población de *S. cerevisiae* puede modificar el comportamiento de las levaduras *no-Saccharomyces*. Por ello, se han llevado a cabo estudios para determinar las propiedades enológicas y los posibles roles de las levaduras *no-Saccharomyces* en la vinificación, destacando el papel positivo de algunas de estas levaduras en la composición analítica del vino (Ciani et al., 2010; Comitini et al., 2011; Varela, 2016).

Fermentación inoculada

Uno de los avances tecnológicos más importantes en vinificación ha sido la inoculación del mosto de uva con cultivos seleccionados de *S. cerevisiae*. Un control microbiológico del proceso fermentativo permite un mayor control de la fermentación alcohólica. La inoculación de *S. cerevisiae* junto al uso de agentes antisépticos, como el SO₂, garantiza el dominio de la cepa inoculada, ya que las poblaciones indígenas no son capaces de crecer bajo esas condiciones, permitiendo a las bodegas producir vinos con criterios de calidad establecidos.

El perfil sensorial de los vinos producidos utilizando cultivos iniciadores de *S. cerevisiae* difiere sustancialmente de aquellos que fermentan espontáneamente. Los vinos que son fermentados por una única cepa son menos complejos que los vinos donde participan varias levaduras.

A pesar de la creencia de que el inóculo de *S. cerevisiae* suprime cualquier especie *no-Saccharomyces* indígena y domina el proceso fermentativo, muchos estudios (Ciani & Comitini, 2015; Comitini et al., 2011) han revelado que las levaduras *no-Saccharomyces* pueden persistir durante varias etapas en fermentaciones que han sido inoculadas con un cultivo puro de *S. cerevisiae*.

En la comunidad enológica hay controversia en el uso de cultivos iniciadores de *S. cerevisiae*, ya que, por un lado, resulta interesante mantener la diversidad microbiológica para obtener vinos con mayor complejidad organoléptica, pero por otro lado, el uso de starters comerciales garantiza un mayor control y reproducibilidad de la fermentación.

Un compromiso propuesto por la comunidad científica y aceptado por la industria enológica es la selección de cepas de levaduras *no-Saccharomyces* aisladas del entorno de la viña, con propiedades enológicas interesantes, y utilizarlas como starters juntamente con *S. cerevisiae*. Este tipo de inóculo permitirá el control de la microbiota indeseada y del proceso de fermentación, aumentando al mismo tiempo la complejidad de los vinos (Benito et al., 2019; Ciani et al., 2010; Comitini et al., 2011; Varela, 2016).

Levaduras *no-Saccharomyces*

Al comienzo del desarrollo de la microbiología industrial las levaduras *no-Saccharomyces* se consideraban organismos indeseados o alterantes del vino, ya que, en general, por sí solas no pueden completar la fermentación alcohólica, resultando en una ralentización del proceso e incluso en paradas de fermentación.

En vinificación, las levaduras *no-Saccharomyces* se han estudiado para mejorar diferentes factores de la calidad del vino, así como de seguridad alimentaria (Tabla 1). Sin embargo, su escalado a escala industrial es complejo, ya que la mayoría de levaduras *no-Saccharomyces* poseen poca-moderada actividad fermentativa. Es decir, la producción de vinos no es posible para la mayoría de levaduras *no-Saccharomyces* cuando están en cultivo puro.

Tabla 1. Ventajas principales del uso de especies no-Saccharomyces en vinificación (Adaptado de la revisión Benito, 2018b).

Especies de levaduras	Ventajas
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Ácido acético ↓, complejidad aromática ↑, tioles ↑
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Ésteres ↑, terpenos ↑, tioles ↑, complejidad aromática ↑
<i>Kloeckera apiculata</i>	Complejidad aromática ↑
<i>Hanseniaspora vineae</i>	Complejidad aromática ↑, 2-fenil-etil acetato ↑, aminas biógenas ↓
<i>Hansenula anomala</i>	Reducción de alcoholes C6
<i>Pichia kluyveri</i>	Complejidad aromática ↑, tioles ↑, ésteres ↑
<i>Pichia guilliermondii</i>	Estabilidad del color ↑
<i>Candida stellata</i>	Glicerol ↑
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Polisacáridos ↑
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ácido L-málico ↓, desacidificación ↑
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Ácido L-láctico ↑, acidificación ↑

Durante los últimos años, se ha promocionado el uso de fermentaciones con multi-starters, utilizando cultivos seleccionados de *S. cerevisiae* y levaduras *no-Saccharomyces*. Muchos aspectos apoyan el uso de fermentaciones multi-starter en la vinificación, los más importantes son:

- Modificación de algunos componentes analíticos específicos, como el aumento del glicerol, la mejora de la acidez total o la disminución de la acidez volátil del vino.
- Mejora del perfil analítico del vino (ésteres, tioles volátiles).
- Reducción del contenido de etanol del vino.
- Control de la microbiota alterante.
- Mejora general de la calidad y complejidad del vino.

El aumento de temperaturas causado por el cambio climático global provoca una maduración más rápida de las uvas, aumentando su contenido de azúcar, pero no así su madurez fenólica. Este desfase provoca que la necesidad de esperar a que la uva alcance la madurez fenólica resulte en un aumento del contenido de azúcar y en la disminución de la acidez del mosto de uva. Cuando el mosto es fermentado por el cultivo de *S. cerevisiae*, el mayor contenido de azúcar da como resultado vinos con mayor contenido alcohólico. Este efecto es común en regiones vitivinícolas cálidas, donde el riesgo de sobre maduración es alto.

Sin embargo, el mercado apuesta por vinos con un contenido de alcohol moderado. Además, estos altos grados alcohólicos pueden producir problemas económicos para las bodegas debido a las altas tasas impuestas en algunos países.

Por tanto, para solucionar el problema de tener vinos con un grado alcohólico excesivo, desde hace unos años, se están buscando diferentes aproximaciones para la reducción de dicho

grado alcohólico. Existen métodos físicos para reducir el contenido de alcohol del vino, pero estos pueden suponer la pérdida de parte del aroma del vino. Una aproximación microbiológica para reducir los niveles de etanol es el uso de levaduras *no-Saccharomyces*. Las especies de levaduras *no-Saccharomyces* permiten reducir el contenido inicial de etanol sobre un 1-2% (v/v), dependiendo de la especie y las condiciones de fermentación (Benito et al., 2019).

Otro problema ligado a la sobre-maduración de la uva es la disminución de la acidez del mosto, esta acidez es esencial desde distintos puntos de vista como la conservación del vino, sus propiedades organolépticas y, en última instancia, su degustación. La solución más común utilizada para gestionar la falta de acidez del vino es la adición de ácidos comerciales, aunque presenta problemas, como la falta de estabilidad química. La acidificación microbiana permite la producción de vinos de calidad gracias a su habilidad de incrementar la acidez del vino y otro parámetros secundarios (Benito, 2018b).

Por tanto, como se ha comentado anteriormente, uno de los principales problemas del uso de levaduras *no-Saccharomyces* es su baja capacidad fermentativa, por lo que la solución propuesta es su uso combinado con *S. cerevisiae* (Benito, 2018a; Ciani & Comitini, 2019; Ciani et al., 2010; Tempère et al., 2018; Varela, 2016).

Uso de las levaduras *no-Saccharomyces* en la vinificación

Con el objetivo de proporcionar al vino perfiles sensoriales novedosos o complejos, más relacionados con las fermentaciones espontáneas, pero manteniendo el control de la fermentación que nos proporciona la fermentación inoculada, la investigación enológica ha explorado el uso de cultivos mixtos formados por levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*, utilizando dos metodologías diferentes de inoculación.

Coinoculación

La coinoculación o inoculación simultánea consiste en la adición de dos o más cepas de levadura al mismo tiempo (al inicio de la fermentación). Para favorecer el crecimiento y la influencia de la levadura *no-Saccharomyces*, esta inoculación puede hacerse en distintas proporciones de *S. cerevisiae* y *no-Saccharomyces* (Ciani et al., 2016; Romano et al., 2019). Diferentes estudios (Ciani et al., 2016; Ciani & Comitini, 2015; Tempère et al., 2018; Varela, 2016) han mostrado que, en fermentaciones naturales, las levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* no coexisten pasivamente, sino que interactúan entre ellas inhibiendo su crecimiento, retrasando la fermentación y secretando moléculas que afectan al metabolismo de las otras especies de levaduras.

Inoculación secuencial

La inoculación secuencial consiste en la inoculación primero de una cepa y, transcurrido un tiempo, la inoculación de la segunda. Como hemos visto anteriormente, las levaduras *no-Saccharomyces* generalmente no pueden completar la fermentación alcohólica por sí mismas, por ello se utilizan junto con una cepa vínica de *S. cerevisiae* (Romano et al., 2019).

Varela (2016) describe el proceso de inoculación secuencial con una primera inoculación de la especie *no-Saccharomyces* y, tras 24/48 h de fermentación, la inoculación de una cepa de *S. cerevisiae*. De este modo la levadura *no-Saccharomyces* influencia positivamente el producto y *S. cerevisiae* garantiza que se complete la fermentación.

Entre las posibles aproximaciones, la fermentación secuencial parece ser la más exitosa, ya que prolonga el potencial enológico de las levaduras *no-Saccharomyces* sin los posibles efectos inhibitorios del género *Saccharomyces* durante los primeros días de fermentación alcohólica. El momento de la segunda inoculación permite obtener una interacción sinérgica entre ambas cepas inoculadas (Benito, 2018a; Ciani et al., 2016).

Un posible problema de estas fermentaciones es el retraso de la fermentación secuencial *no-Saccharomyces* y *S. cerevisiae* comparado con la realizada con el inóculo puro de *S. cerevisiae*. (Benito et al., 2019)

Interacciones entre levaduras en fermentaciones mixtas

La fermentación del vino es un proceso complejo, donde las condiciones fisicoquímicas y las interacciones microbianas influyen el crecimiento y metabolismo de los microorganismos involucrados.

Se ha demostrado que, cuando algunas levaduras se desarrollan juntas en condiciones de fermentación, estas interactúan entre ellas y producen compuestos impredecibles o diferentes niveles de productos de fermentación que pueden afectar a la composición química y aromática de los vinos (Figura 2).

Aunque la base fisiológica y bioquímica de las interacciones entre las levaduras vínicas son factores poco definidos, los factores ambientales, la producción de compuestos bioactivos o la interacción levadura-levadura se cree que pueden estar involucrados.

La composición y complejidad de la microbiota de las uvas es generalmente estable en el tiempo y depende de varios factores bióticos y abióticos (Romano et al., 2019).

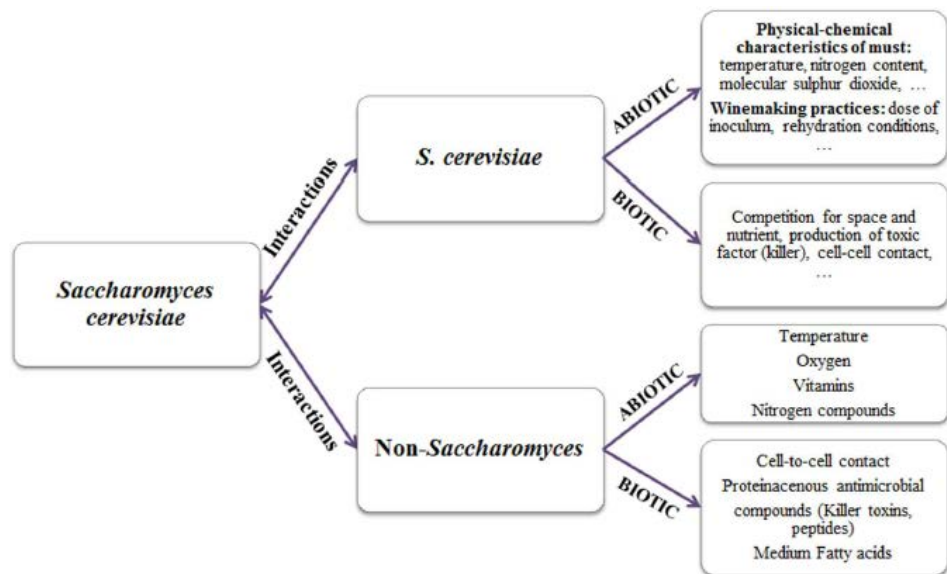


Figura 2. Factores que afectan a las interacciones entre levaduras en la fermentación de vinos inoculados (Ciani et al., 2016).

Factores abióticos

Entendemos por factores abióticos a los componentes no vivos, químicos y físicos del ecosistema.

La concentración creciente de etanol durante el proceso de fermentación es el factor principal que determina el dominio de *S. cerevisiae* sobre levaduras *no-Saccharomyces*, ya que las cepas de *S. cerevisiae* tienen mayor tolerancia al etanol que las levaduras *no-Saccharomyces*.

Otro factor importante es la disponibilidad de fuentes de nitrógeno y vitaminas que puede influir en el comportamiento y el dominio de las cepas de levadura en la fermentación mixta. En general, cuando especies de *no-Saccharomyces* crecen temprano durante la fermentación del vino, estas especies pueden consumir aminoácidos y vitaminas limitando el crecimiento de *S. cerevisiae*. Diferentes fuentes de nitrógeno tienen diferente impacto en el crecimiento y el comportamiento de la fermentación. La disponibilidad de oxígeno también afecta al crecimiento y rendimiento de la fermentación ya que en presencia de bajos niveles de oxígeno el comportamiento de las levaduras se altera. En condiciones anaeróbicas *S. cerevisiae* es capaz de crecer rápidamente, mientras que géneros como *Torulaspora* crecen pobremente (Ciani et al., 2016, 2010; Ciani & Comitini, 2015). Por tanto, la competencia por los nutrientes va a contribuir a modular la presencia y el dominio de las especies de levaduras durante la fermentación del vino.

La competencia por otros nutrientes también puede influir en las interacciones entre levaduras. Se han informado varias interacciones positivas y negativas respecto a la limitación/agotamiento del sustrato, como la producción de ácido pulcherrimínico por

Metschnikowia pulcherrima, que agota el hierro presente en el medio por lo que no está disponible para otras levaduras (Oro et al., 2014). Entre los factores ambientales la temperatura tiene un papel importante en las interacciones entre levaduras y el dominio del proceso de fermentación. La temperatura de fermentación desempeña un papel importante en la capacidad de *S. cerevisiae* para dominar ambientes con alto contenido de azúcar. Sin embargo, también hay algunas levaduras *no-Saccharomyces* como *Candida zemplinina* que tienen mayor prevalencia cuando se fermentan a baja temperatura (Estela-Escalante, 2019).

Taillandier et al. (2014) analizó la interacción entre *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* durante la fermentación del vino y la influencia del contenido de nitrógeno en dicha fermentación. Para ello, realizaron fermentaciones con cultivos puros, en coinoculación e inoculaciones secuenciales, estando en las fermentaciones mixtas las especies separadas por una membrana de diálisis. Los resultados obtenidos fueron que en un medio con 300 mg N/L, el crecimiento de *S. cerevisiae* era menor en inoculación secuencial que en cultivo puro. Los autores asociaron esta inhibición a que el contenido de nitrógeno del mosto no era suficiente para el crecimiento normal de *S. cerevisiae*, viéndose este resultado reafirmado, al retrasarse el doble la fermentación en un mosto con contenido reducido de nitrógeno (170 mg/L). Los autores concluyeron que la cepa de *T. delbrueckii* tenía un consumo elevado de nitrógeno, lo que provocaba una inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae*.

Factores bióticos

Se define como factores bióticos a la influencia sobre el entorno de los organismos debido a la presencia y actividad de otros organismos. Los factores bióticos pueden afectar al dominio del cultivo iniciador. Las moléculas con actividad antimicrobiana y el mecanismo de contacto célula a célula son actividades metabólicas que pueden influir en las fermentaciones (Albergaria et al., 2013).

Entre las moléculas con actividad antimicrobiana, podemos encontrar de diferentes tipos durante la fermentación, como pueden ser las toxinas killer, algunos péptidos e incluso algunos ácidos grasos. En la revisión hecha por Petitgonnet et al. (2019), algunos autores asocian el arresto temprano del crecimiento de alguna especie *no-Saccharomyces* en fermentaciones mixtas a la secreción de un péptido antimicrobiano por parte de *S. cerevisiae*. Junto con los compuestos antimicrobianos, los ácidos grasos producidos durante la fermentación alcohólica pueden exhibir acciones inhibitorias hacia *S. cerevisiae* u otras especies (Ciani et al., 2016).

El contacto célula-célula también puede influir en la interacción entre cepas de levadura modificando su metabolismo. El contacto físico entre las células da lugar a interacciones que tienen como resultado una parada temprana del crecimiento en fermentaciones mixtas (Ciani & Comitini, 2015; Ciani et al., 2010).

Lachancea thermotolerans y *Torulaspota delbrueckii*

Lachancea thermotolerans

Lachancea thermotolerans (anteriormente clasificada como *Kluyveromyces thermotolerans*) se clasifica dentro de los ascomicetes y es la especie más común del género *Lachancea* que se utiliza actualmente en la vinificación. Las especies de *Lachancea* tienen células con morfología esférica o elipsoidal y su tamaño es ligeramente menor al de las células de *S. cerevisiae*. Este género puede reproducirse de manera asexual mediante gemación o de manera sexual mediante la formación de ascas. Junto con *Torulaspota delbrueckii*, fue la primera levadura *no-Saccharomyces* en ser propuesta como levadura seca activa (Benito, 2018b).

En cuanto a sus nichos ecológicos, *L. thermotolerans* habita una amplia gama de hábitats naturales, incluidos insectos, plantas y suelo, así como ambientes (principalmente de fermentaciones de uva/vino) (Romano et al., 2019).

Entre las levaduras *no-Saccharomyces*, *L. thermotolerans* es la levadura utilizada con más frecuencia a nivel industrial para acidificar mostos de uva poco ácidos, característicos de regiones vitivinícolas cálidas, obteniendo vinos con mayor calidad. Esta capacidad de acidificación del vino viene dada por su capacidad de producir ácido láctico durante su metabolismo fermentativo, reduciendo el pH del vino de 4 a 3,5. Esta disminución de pH también conlleva el incremento de la intensidad de color del vino tinto (Revisado por Benito et al., 2019).

L. thermotolerans se considera una especie capaz de fermentar vinos a concentraciones ligeramente superiores del 10% de etanol, pero debe ser combinada con *S. cerevisiae* para la producción de vinos secos. Sin embargo, en otras industrias, como la del vino dulce, es suficiente con la inoculación de *L. thermotolerans*.

Malpertuy et al., (2000) reportaron que el genoma de *L. thermotolerans* tiene un alto grado de homología con el genoma de *Schizosaccharomyces pombe*, lo que puede ser de gran interés para la producción de híbridos entre las dos especies que pudieran solucionar algunos de los problemas enológicos, como el rendimiento de la fermentación maloláctica en mostos de uva de pH elevado en regiones vitivinícolas cálidas. Además también se podrían resolver algunos

problemas de seguridad alimentaria y acidez, mediante la utilización de *L. thermotolerans* y *S. pombe* en fermentaciones secuenciales.

Bajo condiciones enológicas, *L. thermotolerans* puede mejorar otros parámetros de fermentación que afectan a la calidad del vino e influyen positivamente la percepción sensorial, como el incremento de producción de compuestos aromáticos, la reducción de concentración de ácido acético y acetaldehído, el incremento de glicerol, de ácido pirúvico, de antocianinas y de polisacáridos. Su utilización para la reducción de ocratoxina A y aminos biógenas en vino también parece ser un factor prometedor (Benito, 2018b).

Aunque haya muchas ventajas del uso de *L. thermotolerans* en vinificación, algunos autores han reportado algunas desventajas como la falta de poder fermentativo o el incremento de moléculas indeseadas bajo ciertas circunstancias, aunque estos efectos negativos parecen ser dependientes de cepa, al igual que las características positivas (Benito et al., 2019).

Torulaspóra delbrueckii

Torulaspóra delbrueckii (anteriormente clasificada como *Saccharomyces rosei* o *Saccharomyces roseus*) se clasifica dentro de los ascomicetes y es la especie más estudiada del género *Torulaspóra*. Dentro del género *Torulaspóra*, es la levadura que posee mayor crecimiento en medios con 2-ceto-D-gluconato y etanol. Las especies de *Torulaspóra* tienen una estructura morfológica esférica o elipsoidal y son ligeramente más pequeñas que *S. cerevisiae*. Este género puede reproducirse de manera asexual mediante la división celular por gemación o de manera sexual mediante la formación de ascas que contienen cuatro ascosporas esféricas.

T. delbrueckii tiene fama de fermentador de "alta pureza" debido a la baja producción de compuestos indeseados y a que puede aumentar la complejidad y el carácter frutal del vino (Romano et al., 2019).

Además de su uso en la vinificación, *T. delbrueckii* tiene otros intereses biotecnológicos: se utiliza para aplicaciones de panadería y se asocia naturalmente con la fermentación de alimentos y bebidas, incluidos los productos lácteos. *T. delbrueckii* también se aísla con frecuencia en reservorios naturales diversos, como suelos, plantas e insectos.

Entre las especies de levaduras *no-Saccharomyces*, es la más estudiada, comercializada y utilizada a nivel industrial. Su manejo es sencillo comparado con otras *no-Saccharomyces* debido a su alto poder fermentativo (toleran concentraciones de etanol de hasta 9-10% v/v). Dada su resistencia al etanol, pueden influenciar notablemente el producto final durante gran parte del periodo fermentativo. Algunas industrias la utilizan exclusivamente para llevar a cabo

la fermentación. (Benito et al., 2019; Romano et al., 2019). Además, se ha descrito que puede mejorar ciertos parámetros como los perfiles aromáticos relacionados con ésteres frutales, tioles, terpenos, baja producción de acetaldehído, propiedades de sensación en boca causadas por la liberación de manoproteínas y polisacáridos que influyen positivamente a la percepción sensorial. Sin embargo, hay controversia respecto a la mejora en factores como la baja producción de ácido acético, la baja producción de alcoholes superiores o glicerol. De todas formas, hay una variabilidad significativa sobre estos parámetros enológicos cuando se comparan fermentaciones de diferentes cepas de *T. delbrueckii* (Benito, 2018a).

A pesar de que muchos estudios (Benito et al., 2019; Benito, 2018a) se han centrado en las principales virtudes de *T. delbrueckii*, algunos problemas generados por *T. delbrueckii* son la producción de pequeñas cantidades de 4-etil fenol, concentraciones superiores de ácido succínico o ligeros incrementos de precursores de aminas biógenas. En muchos casos *T. delbrueckii* no puede completar la fermentación del vino, por lo que debe combinarse con una cepa de *S. cerevisiae* compatible, además de seleccionarse una cepa de *T. delbrueckii* que evite efectos inhibitorios.

Problemática

En estudios anteriores, el grupo de investigación de Biotecnología Enológica de la Universitat Rovira i Virgili (URV) reportó que una cepa de *T. delbrueckii*, a la que denominaron *Td5*, interactuaba con una cepa de *S. cerevisiae*, la cual denominaron *ScR*, obteniendo resultados inesperados.

El estudio consistía en una inoculación secuencial en la que primero se inoculó *Td5* y 48h más tarde se inoculó *ScR*. La fermentación del mosto sintético se realizó a 16 °C y se evaluó cómo evolucionaba la densidad y la población viable del mosto.

El resultado esperado era una imposición de *ScR* sobre *Td5* (Comitini et al., 2011), sin embargo, no fue así (Figura 3), observándose una inhibición del crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* durante la fermentación.

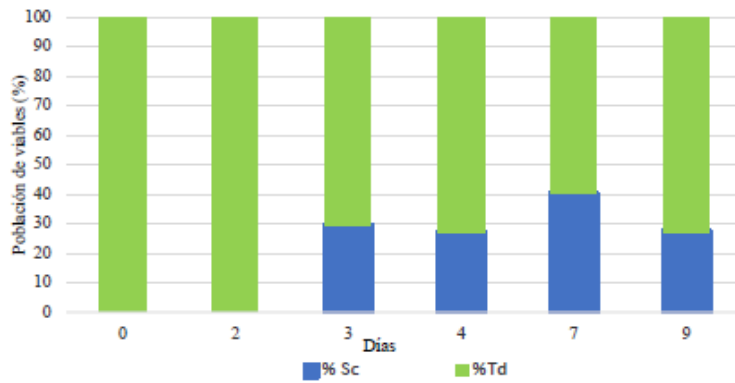


Figura 3. Porcentaje de las poblaciones de *Td5* y de *ScR* en la fermentación secuencial a lo largo de los días.

Una posible causa de la falta de imposición de *ScR* sobre *Td5* podía ser una inhibición por contacto célula-célula. Para comprobar esta hipótesis se repitió la fermentación eliminando la cepa de *T. delbrueckii* del medio antes de la inoculación de *ScR*. El resultado obtenido fue una parada de fermentación, lo que demostró que la falta de imposición de *ScR* no era debida a una inhibición por contacto célula-célula.

Otra posible causa era la temperatura de fermentación, que la falta de imposición de *ScR* se debiera a la baja temperatura. Para comprobarlo, se realizaron fermentaciones de los cultivos puros de ambas cepas a 16 y 22 °C y fermentaciones secuenciales filtradas en las que primero se inoculó *Td5*, posteriormente se eliminó y se inoculó *ScR* a 16 y 22 °C. Las fermentaciones con cultivos puros fueron más rápidas que las fermentaciones secuenciales, así como las fermentaciones a mayor temperatura (22 °C vs 16 °C). A pesar de que *ScR* fermentó mucho más rápido que *Td5*, *Td5* fue capaz de terminar la fermentación sin la necesidad de inocular una cepa de *S. cerevisiae*, a diferencia de los resultados reportados por otros autores (S. Benito, 2018a). La fermentación secuencial a 22 °C se ralentizó respecto a las fermentaciones individuales, pero esta fue capaz de terminar la fermentación, a diferencia de la fermentación a 16 °C, que se paró tras la inoculación de *ScR*. Por tanto, estos resultados mostraban que *Td5* era la causante de la inhibición del crecimiento de *ScR*, siendo esta inhibición más acusada a 16 °C.

La tercera hipótesis que se planteó fue que la parada de fermentación se debiera a una falta de nutrientes, es decir, que en el momento de inocular *ScR* en el mosto, este careciera de algún nutriente esencial para el crecimiento, debido al crecimiento previo de *Td5*. Para ello, en las fermentaciones secuenciales, una vez eliminada *Td5*, se inoculó la cepa de *S. cerevisiae* y se añadieron diversos nutrientes (aminoácidos, vitaminas, oligoelementos o factores de anaerobiosis) de forma individual y conjunta para determinar cuál podía ser el nutriente que causara la limitación del crecimiento de *ScR*.

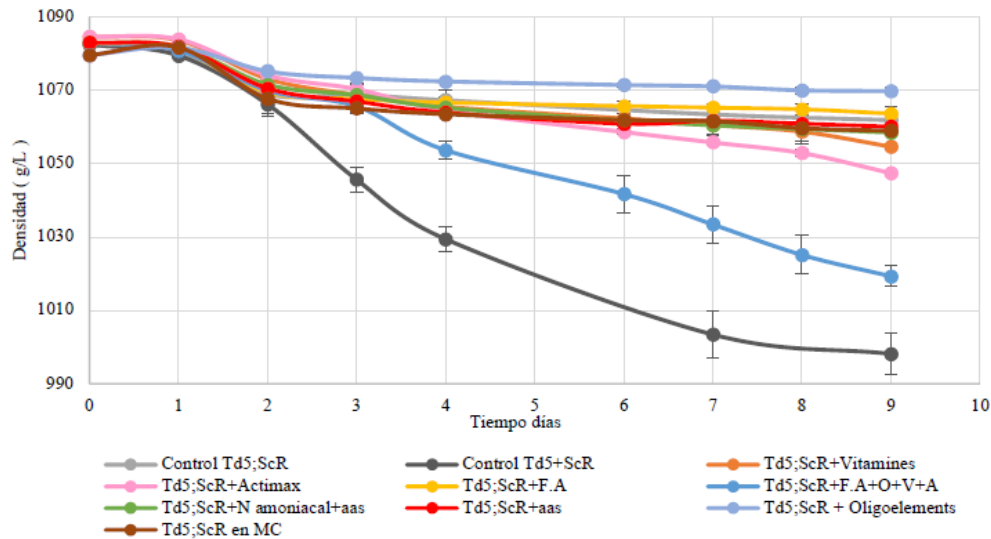


Figura 4. Efecto de la adición de diferentes nutrientes sobre la cinética de fermentación en procesos con inoculación secuencial y sin contacto célula-célula entre las dos cepas. Los nutrientes se adicionaron tras la filtración realizada a las 48 horas de fermentación y antes de la inoculación de *ScR*.

Td5;ScR: Fermentación secuencial filtrada. *Td5+ScR*: Fermentación secuencial mixta. Actimax: mezcla de vitaminas con compuestos orgánicos nitrogenados. Aas: alfa-amínico. MC: mosto concentrado. FA: Factores de anaerobiosis. O: oligoelementos. V: Vitaminas. A: Actimax

Los resultados obtenidos solo mostraron mejoras significativas cuando se añadían conjuntamente todos los nutrientes, pero siendo estas solo parciales, ya que las fermentaciones continuaban siendo bastante más lentas, como se observa en la Figura 4.

La última hipótesis planteada por el grupo de investigación fue que la inhibición se debiera a la secreción de toxinas killer por parte de *Td5* que afectará a la viabilidad de *ScR*. Algunos autores (Ciani & Comitini, 2019; Ramírez et al., 2015; Varela, 2016) han registrado la síntesis de proteínas killer por parte de *T. delbrueckii*. Esta característica permite controlar posibles contaminaciones del mosto y ser más competitivas frente a otras levaduras, como *S. cerevisiae*. La persistencia de las especies *no-Saccharomyces* puede influenciar positivamente en las propiedades organolépticas del vino, como se ha descrito anteriormente. Esta hipótesis fue descartada, ya que en anteriores investigaciones del grupo de Biotecnología Enológica confirmaron que *Td5* no mataba a *ScR*.

Para verificar si las inhibiciones eran específicas de cepa, se repitieron estos experimentos utilizando otras cepas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Los resultados de estos experimentos reportaron que la inhibición de crecimiento de *S. cerevisiae* no era específica de cepa, sino que era común en las especies utilizadas. Por lo tanto, esto puede ser un inconveniente para la industria enológica ya que, como ha descrito (Benito et al., 2019), esto puede suponer un retraso de un par de días en la fermentación e incluso paradas de fermentación (González, 2020).

Tras observar que la inhibición entre *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* no era específica de cepa, se quiso comprobar si ésta también se daba con otras especies *no-Saccharomyces*. Así, se repitió parte de la experimentación con una cepa de *L. thermotolerans* (*Lt2*), en concreto, las fermentaciones con inoculación secuencial a 16 °C, donde se eliminaba *Lt2* antes de la inoculación de *ScR* (48 h). En estas fermentaciones también se observó la inhibición del crecimiento y ralentización de la fermentación por parte de *ScR* tras la eliminación de *Lt2* (Figura 5). Por lo tanto, *Lt2* también influenciaba de forma negativa a *ScR*, demostrando que la inhibición de crecimiento y fermentación no era específica de *T. delbrueckii*, ya que otra levadura *no-Saccharomyces* como *L. thermotolerans* también la producía (Figura 5).

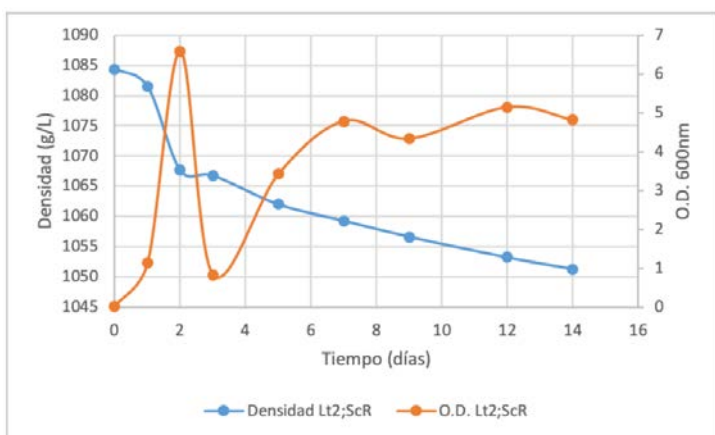


Figura 5. Seguimiento de la fermentación secuencial de *Lt2* y *ScR* a 16 °C.

Posteriormente, se decidió comprobar si las cepas *Td5* y *Lt2* también se inhibían entre ellas o era un efecto específico sobre *S. cerevisiae*. Para ello, se realizaron diversas fermentaciones secuenciales con y sin contacto e invirtiendo el orden de inoculación de las cepas, observándose que las cepas eran capaces de inhibirse entre ellas. En las fermentaciones con contacto célula-célula, se observó una interacción positiva ya que, aunque la primera cepa inhibía el crecimiento de la segunda, también se observaba una sinergia a nivel fermentativo, que resultaba en una aceleración del proceso. La causa del menor crecimiento de la segunda cepa se asoció a la ausencia de ciertos nutrientes, a la secreción de alguna molécula o al contacto célula-célula. En el caso de las fermentaciones sin contacto entre células, se observó un efecto inhibitorio del proceso fermentativo, que resultó en una ralentización del proceso (*Lt2; Td5*) o en una parada de fermentación (*Td5; Lt2*) (Figura 6). Por tanto, se concluyó que el efecto inhibitorio mayor lo provocaba *Td5* sobre *Lt2* y que no era causado por el contacto célula-célula ya que se seguía observando el efecto inhibitorio cuando no entraban en contacto las dos cepas.

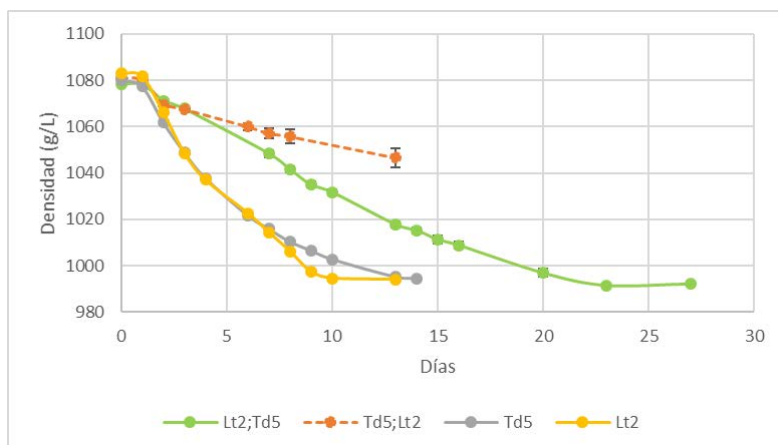


Figura 6. Variación de la densidad en el tiempo de fermentaciones secuenciales filtradas (*Td5;Lt2* y *Lt2;Td5*).

Td5;ScR: Fermentación secuencial filtrada. *Td5+ScR*: Fermentación secuencial mixta

Por tanto, la causa de esta inhibición debía estar causada por el déficit de algún nutriente esencial o por la síntesis de alguna molécula que inhibe la fermentación de *Lt2*. Estos resultados fueron confirmados por la capacidad de crecimiento de la segunda cepa inoculada: cuando la segunda cepa inoculada era *Td5* esta crecía aunque de forma más lenta, sin embargo, cuando la segunda cepa inoculada era *Lt2*, ésta crecía mucho menos.

Hipótesis

A raíz de investigaciones previas se ha determinado que *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* provocan una inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae*. Esta inhibición no es específica contra *S. cerevisiae*, ya que también se ha observado inhibición entre ellas.

La hipótesis planteada en este proyecto es que la inhibición producida entre *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* es causada por la falta de algún nutriente, la secreción de alguna molécula o por el efecto sinérgico de ambos factores.

Objetivo

El objetivo de este proyecto es determinar el mecanismo de interacción entre las cepas *Td5* de *T. delbrueckii* y *Lt2* de *L. thermotolerans*. De este modo, tendremos una mayor comprensión del comportamiento de ambas especies.

Para ello, se llevarán a cabo tanto fermentaciones secuenciales como fermentaciones mixtas (coinoculaciones) en mosto sintético con ambas cepas. En estas fermentaciones se analizará la cinética de fermentación por densidad del mosto y la evolución de la población de levaduras mediante densidad óptica, siembra en placa y PCR cuantitativa (qPCR).

Metodología

Microorganismos utilizados

Las cepas utilizadas fueron una cepa de *Torulaspora delbrueckii* (*Td5*), una cepa de *Lachancea thermotolerans* (*Lt2*) y una cepa de *S. cerevisiae* (*ScR*) como control, todas ellas proporcionadas por Agrovin S.A. (España).

Los pre-cultivos se llevaron a cabo en medio YPD (2% (p/v) glucosa, 2% (p/v) bactopectona, 1% (p/v) extracto de levadura; Cultimed, Barcelona, España) a 28 °C y 120 rpm durante 24h.

Fermentaciones

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un mosto sintético a pH 3,3 descrito por Beltran et al., 2004 (Anexo 1).

Para llevar a cabo el proyecto se han realizado tres tipos de fermentaciones, cada una con un propósito.

Fermentaciones mixtas

Con estas fermentaciones mixtas, donde las dos cepas se inoculan en igual concentración (1:1), se quiere determinar cuál de las dos cepas tiene mayor capacidad fermentativa y, por lo tanto, se impone durante la fermentación del mosto. Estas fermentaciones mixtas se compararon con las fermentaciones realizadas por las cepas puras y así como con un control realizado con una cepa de *S. cerevisiae*.

Tabla 2. Tasa de inoculación de las diferentes cepas en los fermentadores.

Muestra	Número de fermentadores	Concentración inicial de <i>Td5</i> (células/mL)	Concentración inicial de <i>Lt2</i> (células/mL)	Concentración inicial de <i>ScR</i> (células/mL)
<i>Lt2 + Td5</i>	3	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	-
<i>Td5</i>	1	$2 \cdot 10^6$	-	-
<i>Lt2</i>	1	-	$2 \cdot 10^6$	-
<i>ScR</i>	1	-	-	$2 \cdot 10^6$

Se prepararon 1,5 L de mosto sintético y se repartieron 220 mL de mosto a cada fermentador (6 fermentadores). La tasa de inoculación de cada fermentador se presenta en la Tabla 2. Se inoculó la cantidad pertinente de pre-cultivo de cada cepa a cada fermentador y se incubaron en agitación (120 rpm) a 22 °C hasta que la concentración de azúcares reductores fuera menor de 2 g/L, dando por terminada la fermentación, o hasta que la densidad del mosto dejara de disminuir durante varios días, resultado de una parada de fermentación.

Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras de mosto de cada fermentador. Estas muestras fueron utilizadas para el análisis de la cinética de fermentación y de las poblaciones presentes.

Fermentación secuencial

Esta metodología permite conocer cómo interaccionan las cepas *Td5* y *Lt2* entre ellas. En esta situación, las levaduras mantienen el contacto célula-célula y se hace una aportación externa de nitrógeno asimilable mediante la incorporación de fosfato diamónico (DAP; Panreac Química S.A.U., España) al mosto en el momento de la segunda inoculación. Con este aporte de DAP al medio se quiere evitar que el nitrógeno sea un nutriente limitante para el crecimiento adecuado de la segunda cepa inoculada.

Se prepararon 750 mL de mosto sintético y se inocularon con el pre-cultivo de *Td5* para obtener una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/mL. Después, se repartieron 220 mL del mosto inoculado a cada frasco de fermentación de 250 mL (3 fermentadores) y se dejaron incubando a 22 °C en agitación (120 rpm). Se dejaron fermentar bajo estas condiciones hasta que la densidad del mosto se redujo en 10-15 unidades (24h aproximadamente).

Una vez se alcanzó la densidad deseada se inoculó el medio con el pre-cultivo de *Lt2* para obtener una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/mL de esta levadura y se añadió el DAP necesario para aumentar la concentración de nitrógeno asimilable 100 mg N/L en cada fermentador. La fermentación del mosto continuó a 22 °C en agitación (120 rpm) hasta que la concentración de azúcares reductores fuera menor de 2 g/L, dando por terminada la fermentación, o hasta que la densidad del mosto dejara de disminuir durante varios días, resultado de una parada de fermentación.

Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras de mosto de cada fermentador. Estas muestras fueron utilizadas para el análisis de la cinética de fermentación y de las poblaciones presentes.

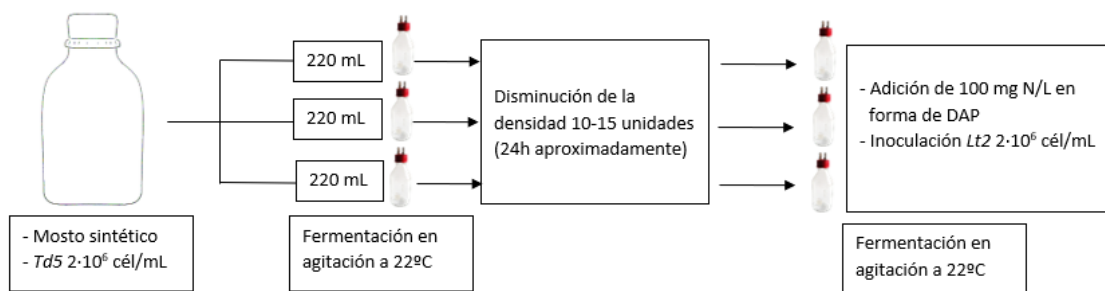


Figura 7. Esquema de la inoculación secuencial.

Fermentación secuencial sin contacto entre las cepas

Esta metodología nos permite ver el efecto del mosto fermentado por la primera cepa sobre la segunda, sin que haya contacto físico entre ellas. En estas fermentaciones, también se hizo una aportación de nitrógeno asimilable en forma de DAP al mosto justo antes de la segunda inoculación.

Se prepararon 750 mL de mosto sintético y se inocularon con el pre-cultivo de *Td5* para obtener una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/mL. Después, se repartieron 220 mL del mosto inoculado a cada frasco de fermentación de 250 mL (3 fermentadores) y se dejaron incubando a 22 °C en agitación (120 rpm). Se dejaron fermentar bajo estas condiciones hasta que la densidad del mosto redujera 10-15 unidades (24h aproximadamente).

Una vez se alcanzó la densidad deseada se centrifugó a 8.000 rpm y 22 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó un filtrado al vacío del sobrenadante utilizando filtros S-Pack de poro de 0,22 μm (Millipore; GSWG047S). La centrifugación y posterior filtración permite eliminar *Td5* del medio.

Una vez eliminada *Td5* se inoculó el medio con el pre-cultivo de *Lt2* para obtener una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/mL de esta levadura y se añadió el DAP necesario para aumentar la concentración de nitrógeno asimilable 100 mg N/L en cada fermentador. La fermentación del mosto continuó a 22 °C en agitación (120 rpm) hasta que la concentración de azúcares reductores fuera menor de 2 g/L, dando por terminada la fermentación, o hasta que la densidad del mosto dejara de disminuir durante varios días, resultado de una parada de fermentación.

Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras de mosto de cada fermentador. Estas muestras fueron utilizadas para el análisis de la cinética de fermentación y de las poblaciones presentes.

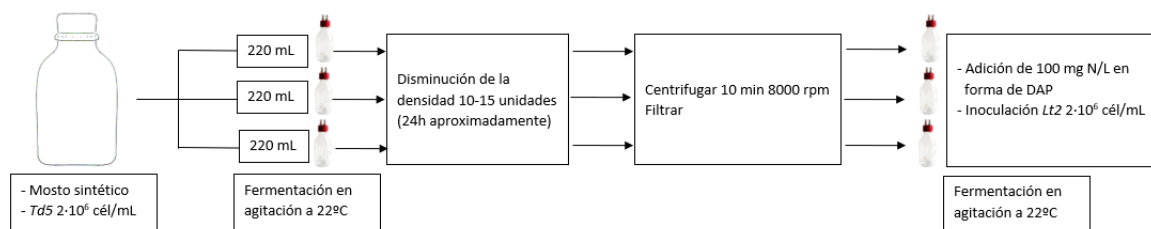


Figura 8. Esquema de la inoculación secuencial sin contacto entre las cepas.

Análisis

Los análisis de las fermentaciones se realizaron mediante técnicas microbiológicas, químicas y bioquímicas, lo que permitió determinar la cinética de cada fermentación y el estudio de las poblaciones.

Toma de muestra

La toma de muestra se realizó cada 24h durante los primeros días de fermentación para el seguimiento de la densidad y de la población de levaduras. A medida que avanzaba la fermentación, la toma de muestras se realizaba cada 48/72 h. De cada fermentador se extraían 8 mL, que se utilizaban para hacer los diferentes análisis (Figura 10).

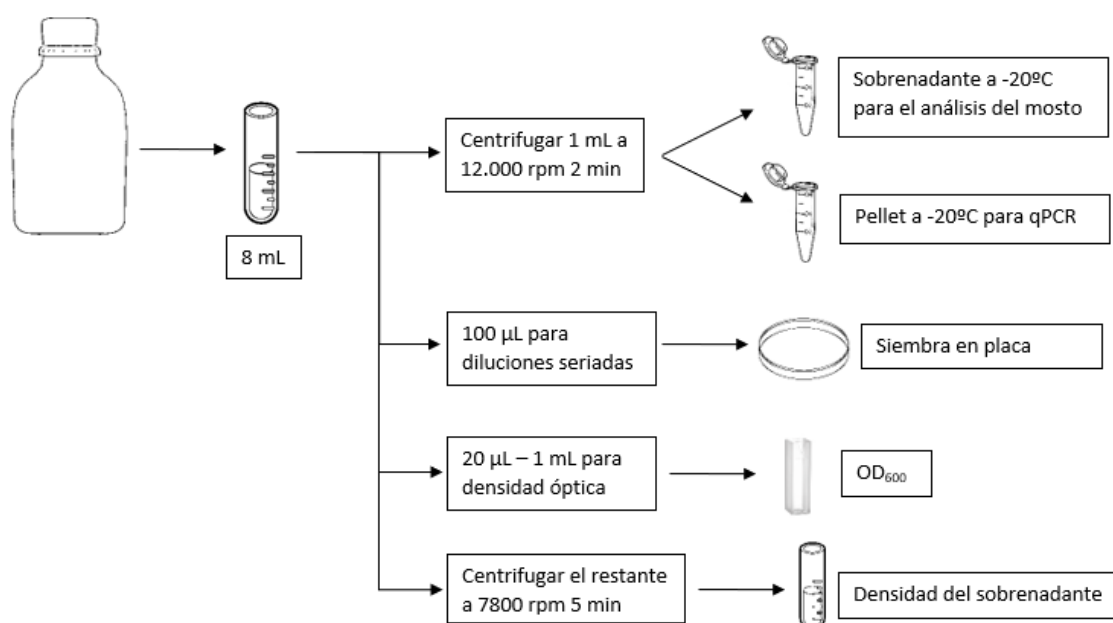


Figura 9. Esquema de la toma de muestra, así como los análisis realizados a cada muestra.

Densidad

La cinética de fermentación puede seguirse midiendo la cantidad de azúcar consumido, el alcohol formado o el dióxido de carbono liberado, siendo la medición de la masa por unidad de volumen (densidad) el método más simple para seguir su evolución.

La densidad constituye una medida aproximada de la cantidad de azúcar contenida en el mosto de uva. Durante la fermentación, el consumo del azúcar y la formación de etanol por parte de las levaduras provocan una disminución de la densidad (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Cuando la densidad del mosto se mantiene estable a lo largo de los días, significa que la fermentación ha acabado o se ha parado. La densidad inicial del mosto sintético era 1080 g/L aproximadamente y la fermentación se dio por finalizada cuando la densidad se encontraba

por debajo de los 1000 g/L. Para realizar las mediciones de densidad se utilizó un densímetro electrónico 30 PX, (Mettler Toledo, Hospitalet del Llobregat, España).

Población total de levaduras

El número total de células de levadura se puede estimar midiendo la densidad óptica del medio de fermentación a 600 nm. Esta medida permite hacer una estimación de las células totales a partir de la turbidez del medio, debido al crecimiento de las levaduras (Ribéreau-Gayon et al., 2006). El total de células contadas incluye tanto las levaduras muertas como las levaduras vivas. Para la medición de la densidad óptica del mosto se utilizó un espectrofotómetro Thermospectronic Genesys 10 UV, (Pracisa + Giralt, Madrid, España).

Población viable de las diferentes cepas

El recuento de la población viable se realizó mediante el contaje de colonias. Cuando las levaduras se colocan en un medio nutritivo sólido adecuado, las células viables son capaces de desarrollar y formar un grupo microscópico, visible a simple vista, llamado colonia. (Ribéreau-Gayon et al., 2006)

Los medios de cultivo utilizados fueron un medio YPD-sólido (Anexo 2) y un medio diferencial Difco WL Nutrient Broth (BD; 247110) (WLN, Anexo 2). El medio WLN permite el recuento de las poblaciones viables y la diferenciación entre las especies que se encuentran en el mosto, gracias a las diferencias morfológicas entre las colonias. Las cepas utilizadas en este proyecto cuando se cultivan en medio WLN, se caracterizan por las siguientes morfologías: *Td5* forma colonias circulares con tonalidad blanquecina, con el paso del tiempo el centro de la colonia adquiere una coloración verdosa; *Lt2* forma colonias circulares con una tonalidad verde intensa (Figura 14C).

Para el recuento de viables de las muestras, se sembraron 100 μ L de la dilución pertinente en el medio diferencial WLN, distribuyéndose por toda la placa gracias a unas beads (perlas) de vidrio esterilizadas, las cuales se eliminan tras la agitación. Una vez sembrada la placa, esta se mantiene a 28 °C durante 48h, tiempo suficiente para que las colonias crezcan hasta un tamaño óptimo para su recuento.

Población total de cada especie determinada por PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR es una técnica molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite la detección y cuantificación de las levaduras presentes en el mosto, lo que nos permite realizar estudios de la población.

Los primers utilizados para la detección y cuantificación de cada especie están especificados en la Tabla 3. Como son primers específicos de especie, se hizo una qPCR para cada especie que queríamos cuantificar.

Tabla 3. Secuencia de los primers usados en la qPCR para cada una de las especies.

Organismo	Nombre	Secuencia del primer 5'-3'	Referencia
<i>T. delbrueckii</i>	Tods L2	CAAAGTCATCCAAGCCAGC	(Zott et al., 2010)
	Tods R2	TTCTCAAACAATCATGTTTGGTAG	
<i>L. thermotolerans</i>	LTH2-F	CGCTCCTTGTGGGTGGGGAT	(García et al., 2017)
	LTH2-R	CTGGGCTATAACGCTTCTCC	
<i>S. cerevisiae</i>	CESP-F	ATCGAATTTTGAACGCACATTG	(Hierro et al., 2007)
	SCER-R	CGCAGAGAAACCTCTCTTTGGA	

Para realizar la qPCR es necesario realizar previamente la extracción de DNA de la muestra a analizar. Para la extracción se utilizó el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen; 69104) (Protocolo en el Anexo 3).

Una vez extraído el DNA, se preparó el Master Mix con los reactivos comerciales: TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus), Bulk (Takara; RR820L) y con los primers específicos de la especie a cuantificar (composición de la solución Master Mix en Anexo 4). En una placa de 96 pocillos se añadieron 18 μ L de Master Mix y 2 μ L de DNA extraído y se analizaron las poblaciones presentes en la muestra en el termociclador QuantStudio 5 Real-Time PCR Instrument, (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) (programa utilizado en Anexo 4). El resultado obtenido es una representación de la fluorescencia emitida por el reactivo Syber Green cuando se une al ADN bicatenario respecto al número de ciclos de amplificación realizados, conocido como curvas de amplificación. Gracias a las curvas de amplificación se obtuvo el ciclo umbral (Ct), es decir, el ciclo donde se produce la intersección entre la curva de amplificación y el valor umbral fijado de forma automática por el equipo. El Ct de cada muestra se interpoló a la recta patrón realizada con concentraciones de ADN conocidas de *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* (Rectas en el Anexo 4). Tras la interpolación se obtiene la población total de cada levadura analizada.

Análisis bioquímicos

Se determinaron los azúcares reductores del mosto (glucosa y fructosa) utilizando el kit enzimático BioSystems (Biosystems S.A.; 12800). Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 minutos, y se analizó el sobrenadante utilizando un multianalizador automático Miura One, (TDI S.L, Gavà, España).

Resultados y discusión

Coinoculación

En el experimento de la coinoculación se inocularon *Td5* y *Lt2* en igual concentración (1:1) en mosto sintético y se incubó en agitación (120 rpm) a 22 °C. Como control se utilizaron fermentaciones individuales de *ScR*, *Td5* y *Lt2*. Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras de mosto de cada fermentador y se analizó la cinética de fermentación y de las poblaciones presentes.

Cinética de fermentación

El estudio de la cinética de fermentación de la coinoculación, realizado mediante el análisis de la variación de la densidad del mosto, permite comparar la cinética de fermentación del cultivo mixto frente a las cinéticas de fermentación de los cultivos individuales.

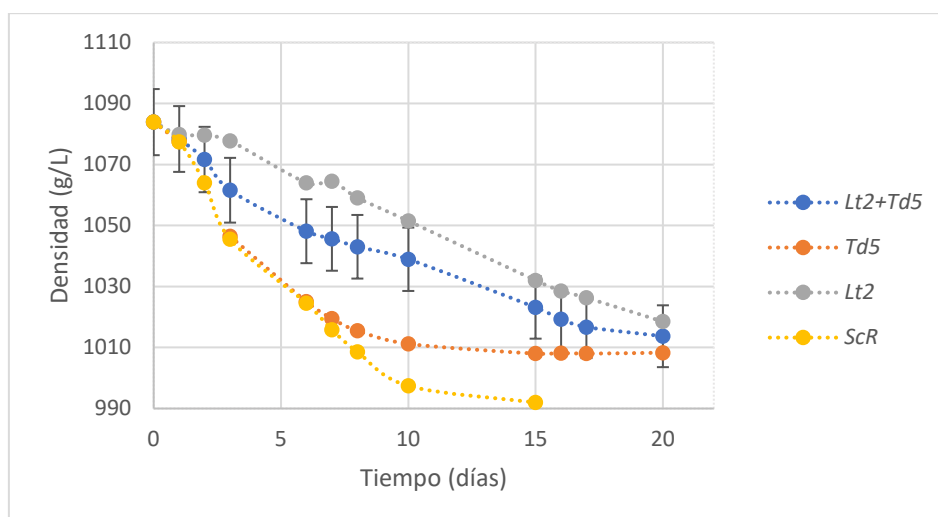


Figura 10. Evolución de la densidad de la fermentación coinoculada y las fermentaciones individuales.

Lt2+Td5: Fermentación coinoculada de *Lt2* y *Td5* en proporción 1:1. *Td5*, *Lt2* y *ScR*: Fermentaciones individuales de *Td5*, *Lt2* y *ScR*, respectivamente.

Como se observa en la Figura 10, la densidad de la fermentación coinoculada disminuyó de forma similar a las fermentaciones individuales de *ScR* y *Td5*. Posteriormente, esta disminución se fue ralentizando, resultando en una parada de fermentación. Hablamos de parada de fermentación porque, a pesar de seguir disminuyendo lentamente la densidad, uno de los triplicados consiguió terminar la fermentación a causa de una contaminación por una cepa de *S. cerevisiae*, cambiando la tendencia (Anexo 6). La fermentación mixta fermentó mejor que la fermentación individual de *Lt2* pero peor que la fermentación individual de *Td5*, aunque en todos los casos, terminaron parándose a unas densidades similares. Por lo tanto, no se observó una interacción positiva entre las cepas, sino que la presencia de *Lt2* afectó negativamente a la

capacidad fermentativa de *Td5*. En lugar de obtener una interacción sinérgica completando con mayor rapidez la fermentación, la fermentación se retrasó respecto a la fermentación individual llevada a cabo por *Td5*, sin llegar tampoco a completarla. Únicamente la fermentación inoculada con *ScR* fue capaz de completar la fermentación alcohólica.

En estudios anteriores del grupo de Biotecnología Enológica (Figura 11), tanto *Lt2* como *Td5* fueron capaces de terminar la fermentación a 22 °C, inoculadas en cultivo puro. Resultados similares se observaron en fermentaciones realizadas con otras cepas de estas especies, las cuales también fueron capaces de acabar la fermentación inoculadas en cultivo puro, presentando igualmente un retraso a nivel de fermentación respecto a las cepas de *S. cerevisiae* (Petitgonnet et al., 2019; Ramírez & Velázquez, 2018). En cambio, la fermentación individual de *Td5* (Figura 10) se para cuando la densidad del mosto desciende hasta 1010 g/L, sin llegar a consumir todos los azúcares del medio (Anexo 6). Este retraso también se observa en la fermentación individual de *ScR*, tardando 10 días en terminarla. Por lo tanto, el retraso global en todas las fermentaciones debe estar asociado a un factor que haya afectado a todos los cultivos, como puede ser algún problema con el medio en el que se inocularon (común para todas las fermentaciones), p. ej. la deficiencia de algún nutriente al preparar el medio que provocara retraso en todas las fermentaciones, e incluso algunas paradas de fermentación.

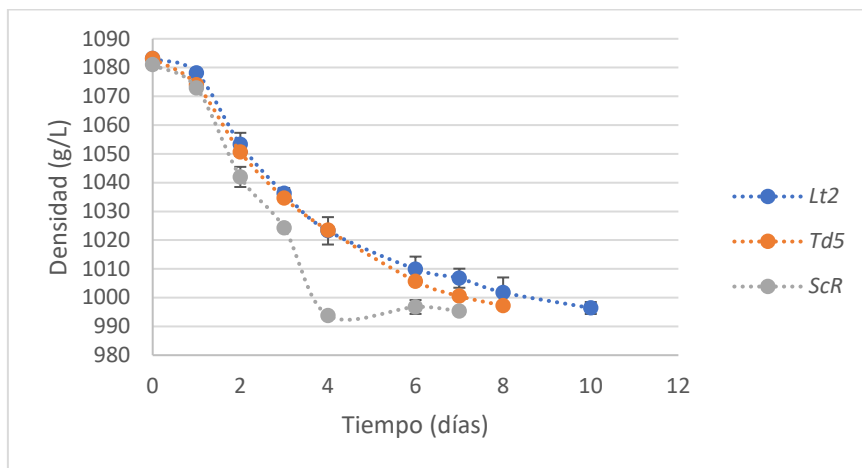


Figura 11. Comparación de las diferentes fermentaciones realizadas por *Td5*, *Lt2* y *ScR* de forma individual a 22 °C en mosto sintético.

Crecimiento poblacional

Para comprobar si la ralentización observada en las fermentaciones mixtas era debido a un efecto negativo en el crecimiento de alguna de las dos cepas, se analizó la evolución de su población, mediante diferentes metodologías: población total por densidad óptica a 600 nm (Anexo 5), viabilidad total y de cada una de las especies, mediante crecimiento en medio rico

(YPD) y medio diferencial (WLN), respectivamente y, finalmente mediante el uso de la qPCR con primers específicos.

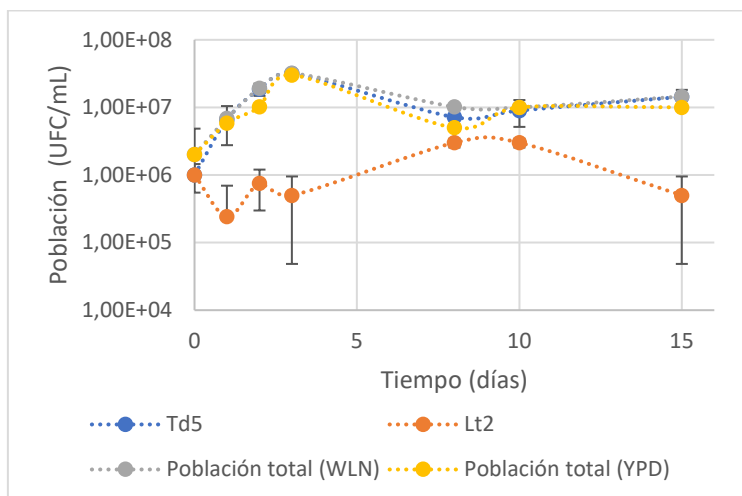


Figura 12. Población viable de *Td5* y *Lt2* en la fermentación coinoculada en medio YPD y medio diferencial WLN.

El recuento de las poblaciones de *Td5* y *Lt2* presentes en el medio se realizó en medio diferencial WLN. UFC: Unidades Formadoras de Colonias

En la Figura 12 se muestra la evolución de la población viable en medio YPD y WLN, así como el crecimiento de ambas cepas (*Td5* y *Lt2*) en el medio diferencial WLN. Utilizamos el medio diferencial WLN porque nos permite diferenciar las dos especies, por su morfología característica en este medio, y poder hacer un seguimiento de la población individual. La población viable de *Lt2* disminuyó el primer día de fermentación. Posteriormente, esta población creció aunque no aumentó mucho. Sin embargo, la población de *Td5* alcanzó una concentración de $3,00E+07$ UFC/mL el día 3 de fermentación y se mantuvo en fase estacionaria hasta el final de la fermentación. Por lo tanto, el recuento de la población total del mosto se debía mayoritariamente a la población de *Td5*, ya que la población de *Lt2* siempre fue inferior y en algunos casos con diferencias de prácticamente 2 órdenes de magnitud con la población de *Td5*. El hecho de que *Td5* sea la cepa mayoritaria a lo largo de toda la fermentación cuando se coinocularon ambas cepas confirma los resultados previos del grupo que apuntaban hacia que *Td5* tiene mayor capacidad fermentativa que *Lt2*. De hecho, teniendo en cuenta las características requeridas para realizar la fermentación alcohólica industrial, se cree que *T. delbrueckii* es la levadura *no-Saccharomyces* más similar a *S. cerevisiae*, dada su buena capacidad fermentativa.

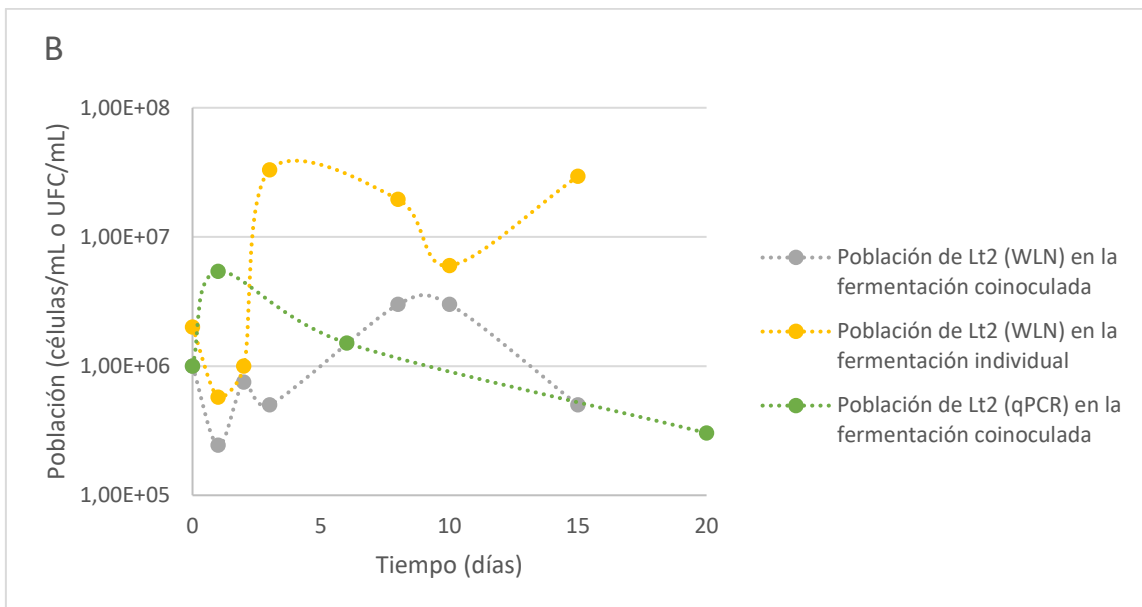
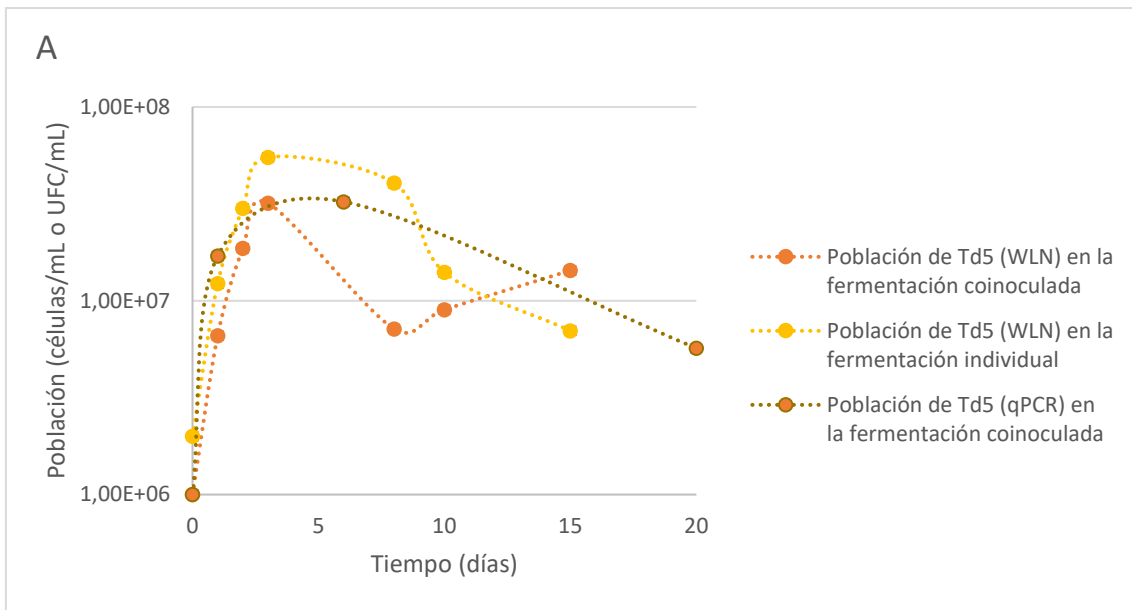


Figura 13. Evolución de la población por recuento en medio diferencial WLN y qPCR de *Td5* (A) y *Lt2* (B) en cultivo mixto e individual.

Para comprobar si hay un efecto inhibitorio sobre el crecimiento entre ambas especies cuando comparten el mismo medio de cultivo se compara el crecimiento de estas en cultivo mixto frente al crecimiento de estas en cultivo individual. En la Figura 13A se compara el crecimiento de *Td5*, en ambos tipos de fermentación (mixta e individual), la cepa presentó un crecimiento exponencial hasta el tercer día que entró en fase estacionaria, de forma similar en ambas fermentaciones. Sin embargo, la población máxima alcanzada fue menor en la fermentación mixta que en la individual, lo que confirmaba la interacción negativa entre ambas cepas. Además en el análisis por qPCR de la población de *Td5* se observó una disminución a partir del día 8 de fermentación, resultado también observado en la fermentación individual. Este descenso no se observó en el crecimiento en medio WLN, sino todo lo contrario, observándose

un repunte a partir de ese mismo día. El crecimiento tardío pudo ser causado por la contaminación del medio con una cepa de *S. cerevisiae*. La morfología de las colonias de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* en medio WLN es muy similar, con una coloración blanquecina que hace muy difícil su diferenciación (Figura 14). Esta similitud en la morfología de las colonias puede haber causado la contabilización de colonias de *S. cerevisiae* contaminante como colonias de *Td5* (dato confirmado por qPCR como se observa en la Figura 15, que explicaría el repunte a partir de décimo día de fermentación).

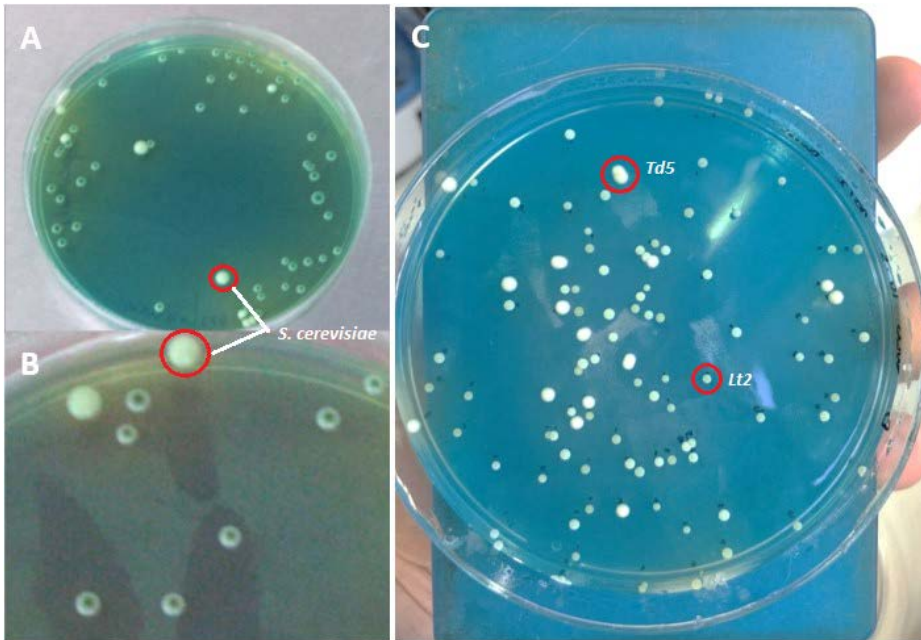


Figura 14. Placas de WLN conteniendo cultivos mixtos de levaduras *no-Saccharomyces* con *S. cerevisiae* (Figura 14A y 14B) (Medina, 2014). Placa cultivo mixto *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* (Figura 14C).

La levadura *Saccharomyces* de estas fotografías (Figura 5A y 5B) se diferencian de las *no-Saccharomyces* por su mayor tamaño, color blanco mate (sin brillo) y textura espesa. La Figura 5C es un cultivo mixto de *Td5* (colonias con morfología blanca) y *Lt2* (colonias con morfología verdosa).

En la Figura 13B, *Lt2* presentó un crecimiento exponencial hasta el tercer día de fermentación. Sin embargo, la diferencia entre la fermentación individual y la fermentación mixta es todavía mayor ya que, aunque se observó un ligero aumento al inicio por qPCR, la cepa en cultivo mixto prácticamente no creció y rápidamente comenzó a disminuir su población, a diferencia del cultivo individual que alcanzó la fase estacionaria con una población un orden superior. Estos resultados confirman que la presencia de *Td5* tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Lt2*.

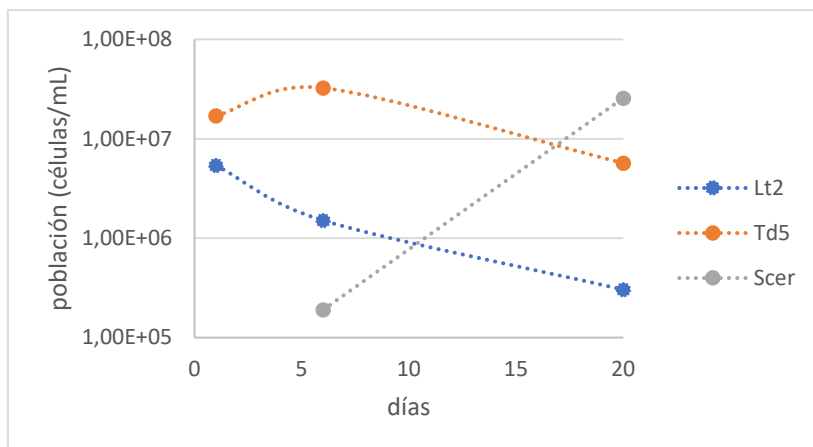


Figura 15. Análisis de la población de levaduras presentes en el mosto durante la fermentación mixta por PCR cuantitativa (qPCR).

Scer: S. cerevisiae

Para comprobar si el medio se había contaminado con *S. cerevisiae* se llevó a cabo un análisis por qPCR. Confirmando las sospechas anteriores, el día 6 de fermentación había una población de $1,91E+05$ células/mL de *S. cerevisiae* y aumentó con el paso del tiempo, alcanzando una población de $2,57E+07$ células/mL el día 20 de fermentación. A diferencia de los datos obtenidos por el grupo de Biotecnología Enológica (Figura 3), la presencia de *Td5* no ha inhibido el crecimiento de esta cepa de *S. cerevisiae* y esta ha sido capaz de imponerse sobre las otras levaduras presentes en el mosto. La contaminación de *S. cerevisiae* es un factor para tener en cuenta. En el momento de la contaminación, *Td5* y *Lt2* están presentes en el medio. Además, la composición del medio se ha visto afectada por el consumo de nutrientes por parte de ambas levaduras. Sin embargo, *S. cerevisiae* ha sido capaz de crecer y alcanzar una población considerable, dominando la fermentación. El hecho de que *Td5* y *Lt2* se inhiban entre ellas puede favorecer el crecimiento de una tercera especie. De hecho, en las fermentaciones espontáneas se produce una sucesión de diferentes especies hasta que finalmente se impone *S. cerevisiae*, responsable de terminar la fermentación (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

En otros estudios donde se realizaron cultivos mixtos de *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae* y *L. thermotolerans* con *S. cerevisiae* a la misma concentración (1:1) (Ciani et al., 2016; Ramírez & Velázquez, 2018), el crecimiento de *S. cerevisiae* no se vio afectado por la levadura *no-Saccharomyces* coinoculada, la cual desapareció rápidamente. La muerte prematura de las poblaciones de levaduras *no-Saccharomyces* en cultivo mixto con *S. cerevisiae* se asociaron al contacto célula-célula y a la secreción de péptidos antimicrobianos por parte de *S. cerevisiae*. Sin embargo, Varela (2016) indicó que estas levaduras *no-Saccharomyces* pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* en cultivos coinoculados y durante la inoculación secuencial. Esta inhibición la asoció al consumo de nutrientes clave para el crecimiento de *S. cerevisiae*,

teniendo un efecto perjudicial para la fermentación si no se suplementa el medio. En este mismo estudio, también se observó una inhibición del crecimiento de *L. thermotolerans* por *S. cerevisiae* y se asoció al contacto célula-célula (Varela, 2016). Además, el fenómeno killer entre levaduras se ha descrito ampliamente en vinificación, identificando distintas cepas de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* como buenos agentes de biocontrol (Ciani & Comitini, 2019). Ramírez et al., (2015) identificaron una cepa de *T. delbrueckii* capaz de secretar una toxina que afecta a la fermentación por parte de *S. cerevisiae* (*Kbarr-1*). Estudios anteriores del grupo de Biotecnología Enológica demostraron que el contacto célula-célula no era el causante de esta inhibición. Sin embargo, el consumo de algún nutriente esencial o la secreción de alguna molécula que inhiba el crecimiento de las cepas podrían ser las causas de los comportamientos observados durante la fermentación.

Inoculación secuencial

Cinética de fermentación

Como se ha comentado en los antecedentes, en un estudio previo del grupo se observó que al realizar fermentaciones secuenciales entre estas dos cepas sin contacto celular, al eliminar la primera cepa, las fermentaciones se ralentizaban mucho e incluso en algunos casos se paraban. Uno de los posibles motivos era la falta de algún nutriente esencial para el desarrollo de la segunda cepa, siendo el nitrógeno el nutriente limitante más habitual en este tipo de fermentaciones. Por ese motivo, se realizaron estas fermentaciones secuenciales, adicionando 100 mg N/L justo en el momento de inocular la segunda cepa, con y sin contacto celular. El contenido de nitrógeno asimilable del mosto es un factor clave para el crecimiento de las levaduras y se requiere cantidad suficiente para evitar ralentizaciones o paradas de fermentación (Bisson, 1999).

En la Figura 16, la densidad de la fermentación secuencial en la que las poblaciones de levaduras mantuvieron el contacto físico entre ellas disminuyó rápidamente a partir de la inoculación de *Lt2* y la adición de DAP, dando por terminada la fermentación el día 6. Sin embargo, la densidad disminuyó lentamente cuando *Td5* se eliminó del medio, a pesar de la adición de DAP, produciéndose una parada de fermentación. Por lo tanto, el nitrógeno asimilable no parece ser el nutriente limitante de la fermentación porque, cuando se eliminó *Td5* del medio, *Lt2* no fue capaz de reanudar la fermentación, produciéndose una parada. Comparando las cinéticas de fermentación de las fermentaciones secuenciales con la fermentación individual de *Td5* a 22 °C de la Figura 11, cuando ambas cepas mantuvieron contacto físico se produjo un aumento de la cinética de fermentación cuando se inoculó la

segunda cepa, *Lt2*, y se añadió DAP, terminándola antes que el cultivo individual. Esta disminución de la densidad fue causada, probablemente, por el crecimiento normal de la primera cepa inoculada, *Td5*. Comparando con la inoculación secuencial a 16 °C de la Figura 17, cuando se mantiene el contacto físico entre especies en fermentaciones a 22 °C y se adiciona DAP, se produce un aumento de la cinética de fermentación. Sin embargo, no se observa una mejora sustancial cuando se elimina *Td5* del medio.

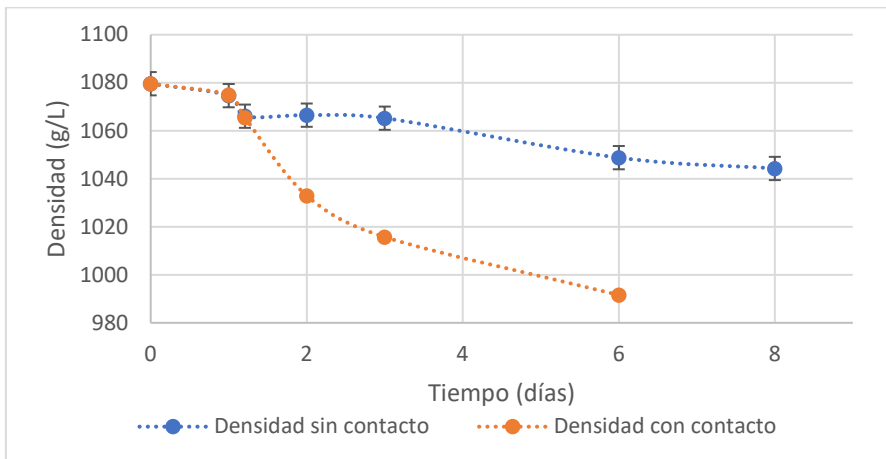


Figura 16. Variación de las densidades de las fermentaciones secuenciales con y sin contacto físico entre *Td5* y *Lt2*.

*En las fermentaciones secuenciales primero se inoculó *Td5* y, tras 24h de fermentación, se inoculó *Lt2* y se añadió el DAP. En las fermentaciones sin contacto, previamente a la inoculación de *Lt2* se realiza un filtrado y se elimina *Td5* del medio. En las fermentaciones con contacto se inocula *Lt2* directamente, sin la eliminación de *Td5*.*

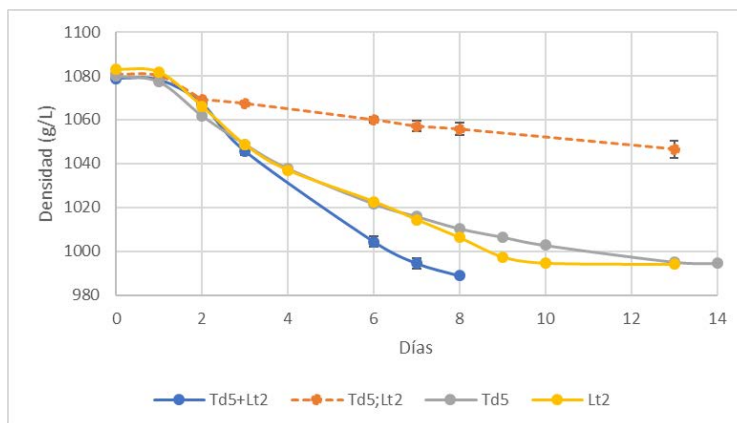


Figura 17. Variación de la densidad de fermentaciones secuenciales mixtas (*Td5+Lt2*), fermentaciones secuenciales filtradas (*Td5;Lt2*) y fermentaciones individuales (*Td5* y *Lt2*) a 16 °C.

La causa del aumento de la capacidad fermentativa cuando ambas levaduras mantienen contacto puede ser causado por la interacción con *Lt2*, el incremento del nitrógeno asimilable en el medio o la acción sinérgica de ambos, ya que *Td5* es la responsable de llevar a cabo la fermentación del mosto. En este tipo de experimentación las interacciones negativas, observadas en el experimento de la coinoculación, no están tan presentes ya que no se ha

producido una ralentización de la fermentación. El efecto contrario se observa cuando se elimina *Td5* del medio, en la que *Lt2* es incapaz de terminar la fermentación.

Crecimiento poblacional

El estudio del crecimiento poblacional nos permite conocer si hay una relación entre la cinética de fermentación y la población del medio. Para verificar si *Td5* es la responsable de la fermentación del mosto en la inoculación secuencial se analiza el crecimiento poblacional mediante densidad óptica a 600 nm (Anexo 5) y el crecimiento en placa en medio WLN.

En la Figura 18, se compara el crecimiento de las poblaciones de *Td5* y *Lt2* en las fermentaciones secuenciales en las que se mantiene contacto físico en el medio con el crecimiento de las poblaciones cuando *Td5* se elimina del medio antes de inocular *Lt2*. En la fermentación secuencial filtrada (*Td5* se eliminó del medio) la población de *Td5* creció hasta $1,87\text{E}+07$ UFC/mL antes de ser eliminada del medio. Cuando se inoculó *Lt2* y se añadió DAP, la población de *Lt2* creció hasta $3,91\text{E}+07$ UFC/mL y se mantuvo en fase estacionaria hasta el final de la fermentación. Sin embargo, no se observó prácticamente descenso de la densidad, a pesar del crecimiento de la cepa. En la fermentación en la que se mantuvo el contacto físico entre las levaduras, al igual que en el resto de fermentaciones, la población de *Td5* permaneció en fase de crecimiento exponencial hasta el tercer día. La población alcanzada fue mayor que en el cultivo individual de *Td5*, lo que sugiere la ausencia de algún nutriente en el mosto de la primera experimentación. Una vez alcanzada la fase estacionaria, esta se mantuvo estable hasta el final de la fermentación. A pesar de añadir DAP, no observamos crecimiento de *Lt2*. La diferencia de población entre *Td5* y *Lt2* fue de más de dos órdenes de magnitud durante la fermentación. Por lo tanto, *Td5* fue la principal responsable de la fermentación del mosto y el contacto con *Lt2* parece no inhibir su crecimiento.

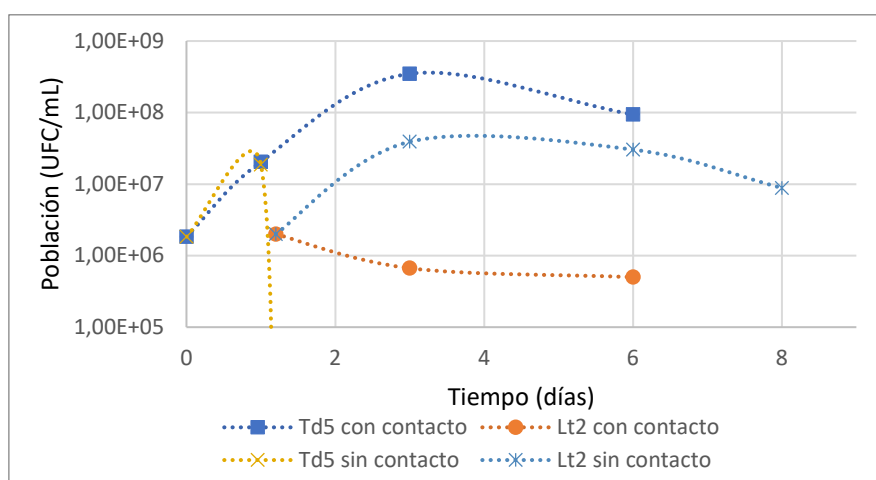


Figura 18. Comparación de la población viable (en medio WLN) de *Td5* y *Lt2* en las fermentaciones secuenciales con y sin contacto físico entre las levaduras.

En estudios anteriores del grupo de Biotecnología Enológica (Figura 19), la población de *Td5* en la fermentación secuencial mixta a 16 °C alcanzó una población de 3,00E+08 células/mL y se mantuvo estable durante la fermentación. Al igual que en los resultados obtenidos en esta experimentación añadiendo DAP, la población de *Lt2* se mantuvo con el paso del tiempo siendo incapaz de crecer. En la fermentación secuencial filtrada el comportamiento de las levaduras es similar en ambas experimentaciones. A 22 °C, *Td5* alcanzó una población superior antes de ser filtrada, la diferencia de temperatura provoca un aumento de la cinética de fermentación, por lo que la inoculación de la segunda cepa se hace un día antes. Más allá de las diferencias en el tiempo de inoculación, el comportamiento de *Lt2*, cuando se elimina *Td5* del medio, es muy similar en ambas fermentaciones. A pesar del crecimiento, *Lt2* fue incapaz de completar la fermentación.

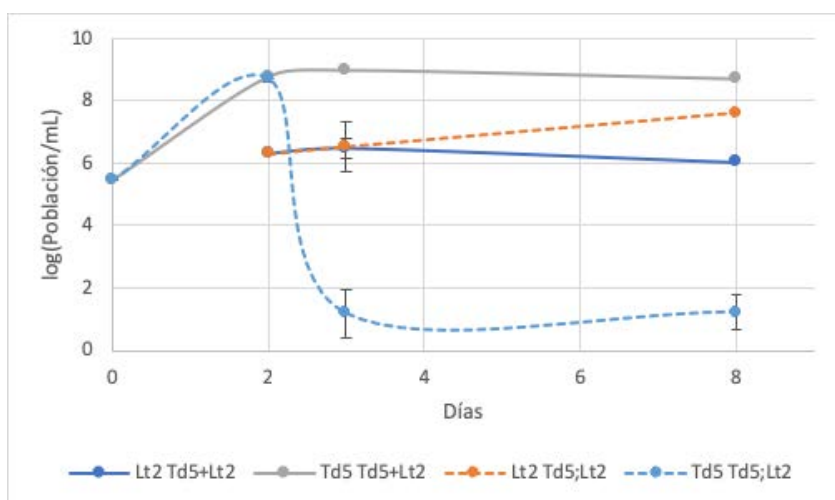


Figura 19. Comparación del análisis por qPCR de fermentaciones secuenciales mixtas (*Td5+Lt2*), fermentaciones secuenciales filtradas (*Td5;Lt2*) a 16 °C.

En un estudio de fermentaciones secuenciales de *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae* y *L. thermotolerans* con *S. cerevisiae*, Benito et al., (2019) reportaron el retraso de la fermentación secuencial cuando se compara con los cultivos puros de *S. cerevisiae*. El lento crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* en la fermentación secuencial con *T. delbrueckii* se asoció a una competencia por los nutrientes o al agotamiento del nitrógeno (Ciani et al., 2016). Como hemos comprobado en este estudio, el nitrógeno no fue el metabolito limitante causante de esta inhibición. Petitgonnet et al., (2019) destacaron la importancia de nutrientes como el nitrógeno, el oxígeno y los fitoesteroides en el momento de la inoculación de *S. cerevisiae* en los cultivos secuenciales con levaduras *L. thermotolerans*. Durante las primeras 24h de fermentación, las levaduras *no-Saccharomyces* consumen nutrientes, por lo que debe tenerse en cuenta su concentración en el medio antes de inocular la segunda cepa. En este mismo experimento (Petitgonnet et al., 2019), la población de *L. thermotolerans* aumentó hasta el

momento de la inoculación de *S. cerevisiae*. Tras 5 días de fermentación la población de *L. thermotolerans* disminuyó drásticamente. Por lo tanto, observaron cómo, en presencia de una levadura con mayor fuerza fermentativa, *L. thermotolerans* fue incapaz de crecer, muriendo con el paso del tiempo. Varela (2016) indicó que las interacciones entre *S. cerevisiae* y levaduras *no-Saccharomyces* pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* utilizando nutrientes clave para *S. cerevisiae* antes de su inoculación. Además, las especies *no-Saccharomyces* pueden producir metabolitos que limiten el crecimiento de otras especies, afectando a las dinámicas de población de las levaduras durante la fermentación. Por tanto, teniendo en cuenta los resultados y la bibliografía existente, los factores causantes de la inhibición del crecimiento observada durante la fermentación deben ser el consumo de algún nutriente esencial para la segunda cepa, diferente al nitrógeno y/o la secreción de algún metabolito con actividad antimicrobiana por parte de *Td5*. Más estudios son necesarios para poder seguir discerniendo cuál de estos motivos puede ser la causa de dicha inhibición (Ver apartado Consecuencias del COVID-19 y perspectivas de futuro).

Conclusión

Durante la fermentación coinoculada se observan interacciones con efecto negativo sobre ambas cepas. Los resultados muestran que *Td5* tiene mayor capacidad fermentativa que *Lt2* y, por lo tanto, lidera la fermentación. La capacidad fermentativa de *Td5* se ve afectada por la presencia de *Lt2*, por lo que la fermentación no llega a completarse. La población de cada levadura influye negativamente sobre el crecimiento de la otra especie cuando se inoculan en un ratio 1:1. Este efecto inhibitorio provoca que *Lt2* sea incapaz de crecer cuando comparte medio de cultivo con *Td5*. Esta limitación del crecimiento puede ser debida a la competencia por micro y macronutrientes, o por la secreción de algún metabolito con actividad antimicrobiana.

Tras analizar los resultados obtenidos, se ha comprobado que el problema causante de la inhibición de la fermentación no es el nitrógeno asimilable ya que a pesar de adicionar nitrógeno y observar un crecimiento de *Lt2*, la fermentación se sigue parando. En el estudio de las fermentaciones secuenciales se observa una mejora de la fermentación cuando se inocula *Lt2* y se añade DAP al medio con *Td5*. Esta fermentación aumenta su cinética respecto a la fermentación individual de *Td5*. Sin embargo, esta sinergia de fermentación no está causada por un aumento de las poblaciones de ambas especies porque, como hemos comentado anteriormente, *Lt2* es incapaz de crecer en un medio con presencia de *Td5*. Cuando *Td5* se elimina del medio, *Lt2* es capaz de crecer, sin embargo, no es capaz de reanudar la

fermentación, resultando en una parada de fermentación. El efecto sinérgico observado en la fermentación se da principalmente por la presencia mayoritaria de *Td5*, cuyo crecimiento no se ve afectado por la presencia de *Lt2*.

Por tanto, la hipótesis de que el causante de esta inhibición sea la falta de algún nutriente, la secreción de alguna molécula o el efecto sinérgico de ambos sigue vigente, por lo que son necesarios más estudios para descifrar el motivo de la inhibición observada.

Consecuencias del COVID-19 y perspectivas de futuro

El sábado 14 de marzo de 2020 el Gobierno de España decreta el estado de alarma para hacer frente a la expansión del coronavirus COVID-19. En ese momento, me encontraba en medio de las prácticas curriculares, llevando a cabo el proyecto sobre interacciones entre levaduras. Entre las medidas tomadas, declaran la suspensión de los empleos no esenciales y el comienzo del confinamiento. Por este motivo, me he visto en la situación de presentar el proyecto con los resultados obtenidos hasta ese día.

Mi proyecto es la continuación de otro proyecto realizado por el grupo de Biotecnología Enológica de la URV, en el que se dejaban abiertas varias líneas de estudio sobre la interacción entre *Td5* y *Lt2*. En este proyecto decidimos comenzar por la coinoculación de ambas especies en un ratio 1:1 y continuar con la fermentación secuencial. Sin embargo, varios análisis no se pudieron completar como son: el análisis del nitrógeno asimilable presente en el medio a lo largo de las fermentaciones y el análisis de las poblaciones por qPCR a lo largo de toda la fermentación (en la coinoculación se tomaron tres puntos para verificar la contaminación por *S. cerevisiae* y en la fermentación secuencial no se llegaron a realizar). Mas allá de completar los análisis de las pruebas ya realizadas, se quería repetir la fermentación coinoculada para trabajar en condiciones de esterilidad en un medio completo y verificar si el comportamiento de las cepas observado en la primera experimentación se mantiene bajo condiciones óptimas. Probablemente, el medio utilizado tenía deficiencias en algún nutriente que hizo que las fermentaciones se ralentizaran.

A las pruebas realizadas, le seguía la fermentación secuencial en la que primero se inocula *Lt2* y posteriormente se inocula *Td5*. En esta prueba se quería comprobar si la adición de nitrógeno asimilable al medio en el momento de la segunda inoculación era suficiente para que *Td5* creciera y terminara la fermentación, ya que se había demostrado que tiene mayor capacidad fermentativa que *Lt2*. Posteriormente, se quería realizar una coinoculación en la que las dos especies estaban separadas por una membrana de diálisis. Utilizando esta metodología se podría detectar si la causa de las interacciones observadas era una molécula

que quedara retenida, o no, dentro del saco de diálisis, utilizando membranas de diferente tamaño de poro.

Además de los experimentos pendientes, otra posible línea de investigación sería un análisis detallado de la composición del mosto a lo largo de la fermentación. Esto nos permitiría ver cómo afecta la fermentación de ambas levaduras a la composición del mosto y determinar los requerimientos nutricionales de cada especie. Otra línea de investigación es la coinoculación de ambas cepas con diferentes ratios, observando si se produce un efecto sinérgico o inhibitorio cuando se varían los ratios de inoculación. Finalmente, se podría repetir la experimentación utilizando otras cepas de las mismas especies para comprobar que esta inhibición no es específica de las cepas seleccionadas.

Bibliografía

- Albergaria, H., Branco, P., Francisco, D., Coutinho, R., Monteiro, M., Ferreira, M., ... Caldeira, J. (2013). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentations: secretion of antimicrobial peptides and microbial interactions (pp. 98–101). Torino: Conf. on Microbial Diversity: Microbial Interactions in Complex Ecosystems.
- Bagheri, B., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2017). The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations. *Frontiers in Microbiology*, *8*(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01988>
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019). The influence of non-saccharomyces species on wine fermentation quality parameters. *Fermentation - MDPI*, *5*(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030054>
- Benito, S. (2018a). The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(7), 3081–3094. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
- Benito, S. (2018b). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(16), 6775–6790. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9117-z>
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic*, *50*(1), 107–119. Retrieved from <https://www.ajevonline.org/content/50/1/107>
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>
- Ciani, M., & Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, *1*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>
- Ciani, M., & Comitini, F. (2019a). Use of Non- *Saccharomyces* Yeasts in Red Winemaking. *Academi Press*, (1998), 51–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00004-9>
- Ciani, M., & Comitini, F. (2019b). Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Red Winemaking. *Red Wine Technology*, 51–68. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814399-5.00004-9>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *Federation of European Microbiological Societies*, (February), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, *28*(5), 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Estela-Escalante, W. D. (2019). Perspectives and Uses of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Fermented Beverages. *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81868>
- González, J. M. (2020). *Interacciones entre especies no-saccharomyces en la fermentación alcohólica*. Universitat Rovira i Virgili. Trabajo Final de Grado
- Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*, *65*(1), 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04312.x>
- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. B. T.-T. Y. (Fourth E. (Eds.). (1998). Summary of species

- characteristics (pp. 915–947). Amsterdam: Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50120-9>
- Malpertuy, A., Tekaiia, F., Casarégola, S., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., ... Dujon, B. (2000). Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 19. Ascomycetes-specific genes. *FEBS Letters*, *487*(1), 113–121. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02290-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02290-0)
- Medina, K. (2014). *Biodiversidad de levaduras no saccharomyces: Efecto del metabolismo secundario en el color y el aroma de vinos de calidad*. Universidad de la república. Retrieved from <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/17186/1/uy24-17268.pdf>
- Mills, D. A., Johannsen, E. A., & Cocolin, L. (2002). Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(10), 4884–4893. <https://doi.org/10.1128/aem.68.10.4884-4893.2002>
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, *116*(5), 1209–1217. <https://doi.org/10.1111/jam.12446>
- Petitgonnet, C., Klein, G. L., Roullier-Gall, C., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., ... Alexandre, H. (2019). Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome. *Food Microbiology*, *83*(May), 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.005>
- Ramírez, M., & Velázquez, R. (2018). The yeast *Torulaspora delbrueckii*: An interesting but difficult-to-use tool for winemaking. *Fermentation*, *4*(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040094>
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñeiro, A., & Ribas, J. C. (2015). A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Frontiers in Microbiology*, *6*(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00983>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). The Microbiology of Wine and Vinifications. In *Handbook of Enology* (2nd ed., Vol. 1, pp. 1–89). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470010363.ch3>
- Romano, P., Ciani, M., & Fleet, G. H. (2019). Yeasts in the Production of Wine. In *Yeasts in the Production of Wine* (pp. 1–80). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4>
- Rosini, G., Federici, F., & Martini, A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology*, *8*(1), 83–89. <https://doi.org/10.1007/BF02011464>
- Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(7), 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Tempère, S., Marchal, A., Barbe, J. C., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Marullo, P., & Albertin, W. (2018). The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(9), 3995–4007. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8914-8>
- Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(23), 9861–9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>

Anexos

Anexo 1: Preparación de mosto sintético

1. Pesar reactivos (Tabla 4A) y añadir agua destilada (menos de 200 o 300 mL del volumen final deseado).
2. Poner en el autoclave. Poner también el material requerido para filtrar.
3. Pasar a un vaso de precipitados. Añadir vitaminas, aminoácidos, oligoelementos y factores de anaerobiosis (Tabla 4B).
4. Ajustar el pH a 3,3 (añadiendo pellets de NaOH).
5. Añadir agua destilada hasta el volumen final deseado
6. Filtrar (utilizando filtros S-Pack de poro de 0,22 µm) usando una bomba de vacío.

Tabla 4. Cantidad de reactivos para añadir en los antes de autoclavar (punto 1) (Tabla 4A) y después de autoclavar (punto 3) (Tabla 4B) en la preparación del mosto sintético.

A	Reactivo	g/L	B	Reactivo	mL/L
	Glucosa	100		Oligoelementos	1
	Fructosa	100		Vitaminas	10
	Ácido málico	5		Factores de anaerobiosis	1
	Ácido cítrico monohidratado	0,5		Aminoácidos (300 mg/L)	10
	Ácido tartárico	3			
	KH ₂ PO ₄	0,75			
	K ₂ SO ₄	0,5			
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25			
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,16			
	NaCl	0,2			
	NH ₄ Cl (300 mg/L)	0,46			

Tabla 5. Composición de las diferentes soluciones stock utilizadas para la preparación del mosto sintético.

Vitaminas	g/L
Mio-inositol	2
Pantotenato de calcio	0,15
Tiamina	0,025
Ácido nicotínico	0,2
Piridoxina	0,025
Biotina (100 mg/L)	0,0003

Factores de anaerobiosis	Cantidad para 0,1 L
Ergosterol	1,5 g
Ácido oleico	0,5 mL
Tween 80	50 mL
Etanol (absoluto)	Hasta 100 mL

Aminoácidos	g/L
Asp	4,42
Glu	11,96
Ser	7,8
Gln	49,92
His	3,38
Gly	1,82
Thr	7,54
Arg	36,79
Ala	14,56
Tyr	1,95
Cis	2,08
Val	4,42
Met	3,12
Trp	17,42
Phe	3,77
Ile	3,25
Leu	4,81
Lys	1,69
Pro	59,93

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

Anexo 2: Preparación de los medios de cultivo

YPD sólido (Cultimed, Barcelona, España)

1. Pesar 20 g de glucosa, 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura y añadir 1L de agua destilada.
2. Añadir 17 g de Agar Bacteriológico, Bacteriological American Type (Ingredient) for microbiology (ITW Reagents; 402303.1210).
3. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
4. Repartir en placas de Petri y dejarlas secar.

Difco WL Nutrient Broth (BD; 247110)

1. Pesar 60 g de polvo Nutrient Broth y añadir a 1L de agua destilada.
2. Añadir 17 g de Agar Bacteriológico, Bacteriological American Type (Ingredient) for microbiology (ITW Reagents; 402303.1210).
3. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
4. Repartir en placas de Petri y dejarlas secar.

Anexo 3: Protocolo DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen; 69104)

1. Resuspender el pellet en 1 mL de agua destilada y esterilizada.
2. Centrifugar a 13.300 rpm durante 2 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 700 μ L de "AP1 buffer".
4. Pasar la solución a un tubo eppendorf con mini beads de cristal.
5. Realizar 3 ciclos con los eppendorf 1 minuto en el Mini-beadbeater-24, BioSpec, Bartlesville (Estados Unidos) y 1 minuto en hielo.
6. Centrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto.
7. Extraer 400 μ L de sobrenadante y pasar a un eppendorf nuevo.
8. Añadir 4 μ L de "RNAsa", invertir el eppendorf e incubar 10 minutos a 65 °C.
9. Añadir 130 μ L de "P3 buffer", mezclar con la pipeta e incubar 5 minutos en hielo.
10. Centrifugar a 13.300 rpm durante 5 minutos.
11. Extraer 500 μ L de sobrenadante y pasar a una columna lila.
12. Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos.
13. De la fracción filtrada, añadir 675 μ L de "AW1 buffer", mezclar y pasar 650 μ L a una columna blanca.
14. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto y eliminar la fracción filtrada.
15. Añadir la fracción filtrada restante de la columna lila a la columna blanca.
16. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto y eliminar la fracción filtrada.
17. Añadir a la columna blanca 500 μ L de "AW2 buffer", centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos y descartar la fracción filtrada. Repetir este paso 2 veces.
18. Colocar la columna en un eppendorf nuevo.
19. Añadir a la columna 50 μ L de "AE buffer" e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
20. Centrifugar a 8.000 rpm durante 2 minutos.
21. Repetir los pasos 19 y 20 dos veces. Si no se va a utilizar el DNA de inmediato, guardar el eppendorf a -20 °C.

Anexo 4: PCR cuantitativa (qPCR)

Composición de la solución Master Mix

Tabla 6. Composición de reactivos de la solución Master Mix para qPCR.

Reactivo	μL/muestra
TB Green Premix Ex Taq II (2X)	10
Primer Forward (10 μM)	0,8
Primer Reverse (10 μM)	0,8
Rox II (50X)	0,08
H2O Mili Q estéril	6,32

Programa utilizado para la qPCR

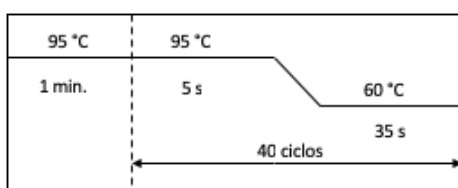


Figura 20. Programa utilizado para la qPCR.

Rectas patrones

- *T. delbrueckii* (Td5)

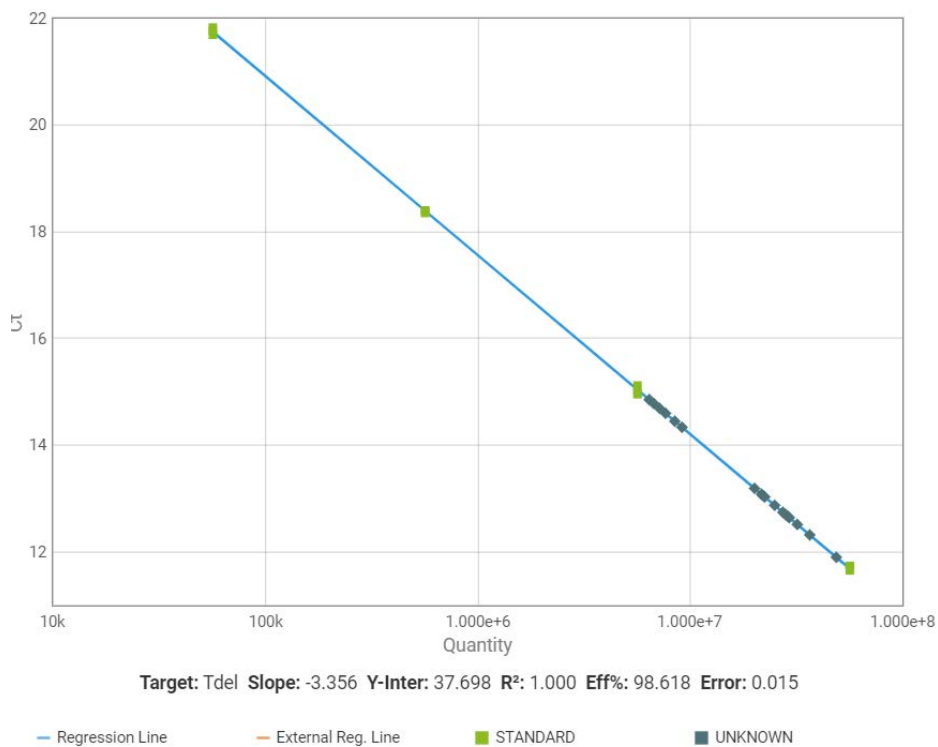


Figura 21. Recta patrón utilizada para la cuantificación de *Td5* por qPCR.

- ***L. thermotolerans (Lt2)***

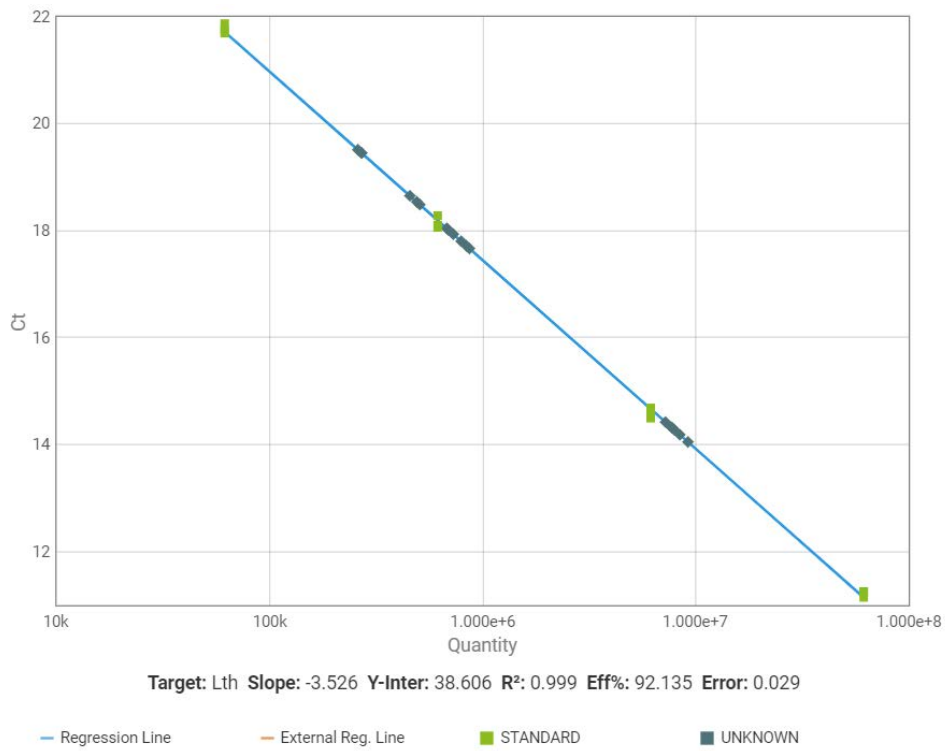


Figura 22. Recta patrón utilizada para la cuantificación de *Lt2* por qPCR.

- ***S. cerevisiae***

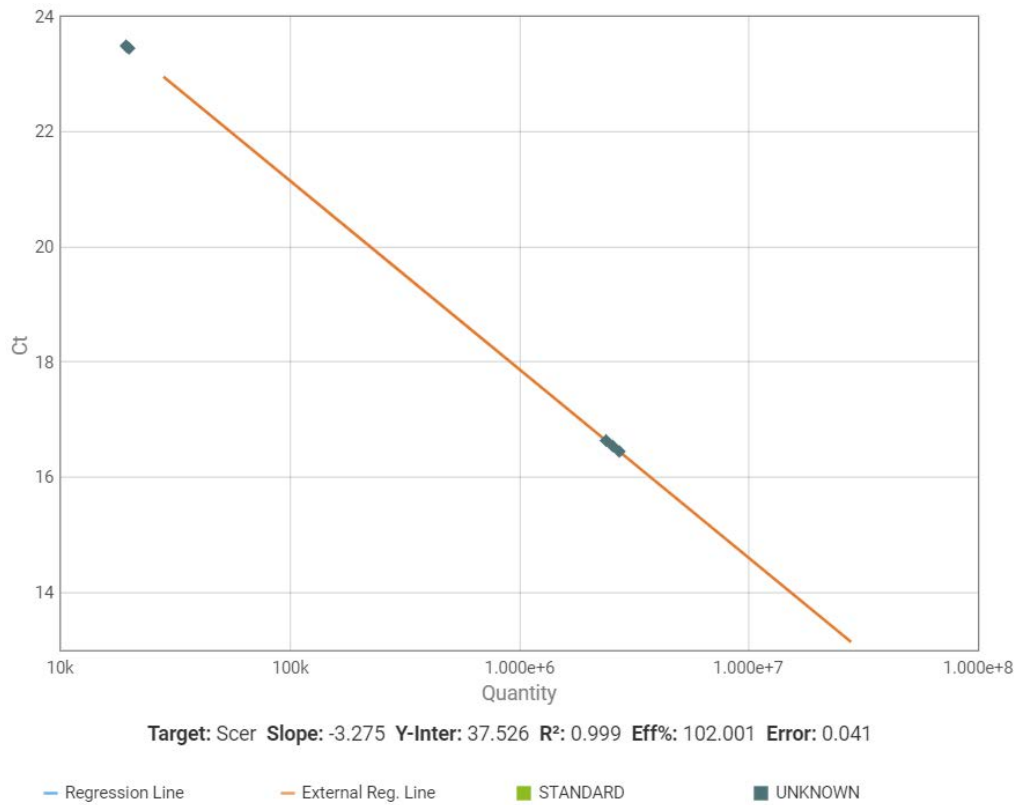


Figura 23. Recta patrón utilizada para la cuantificación de *S. cerevisiae* por qPCR.

Anexo 5: Análisis de Densidad Óptica de las fermentaciones

• Coinoculación

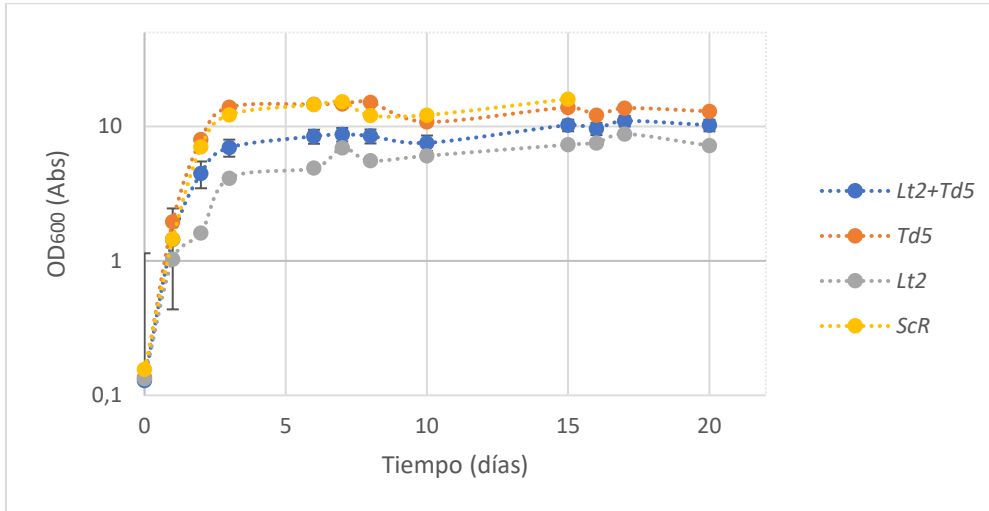


Figura 24. Variación de la densidad óptica medida a 600 nm de la fermentación coinoculada y de las fermentaciones individuales.

Lt2+Td5: Fermentación coinoculada de Lt2 y Td5 en proporción 1:1. Td5, Lt2 y ScR: Fermentaciones individuales de Td5, Lt2 y ScR, respectivamente.

• Fermentación secuencial

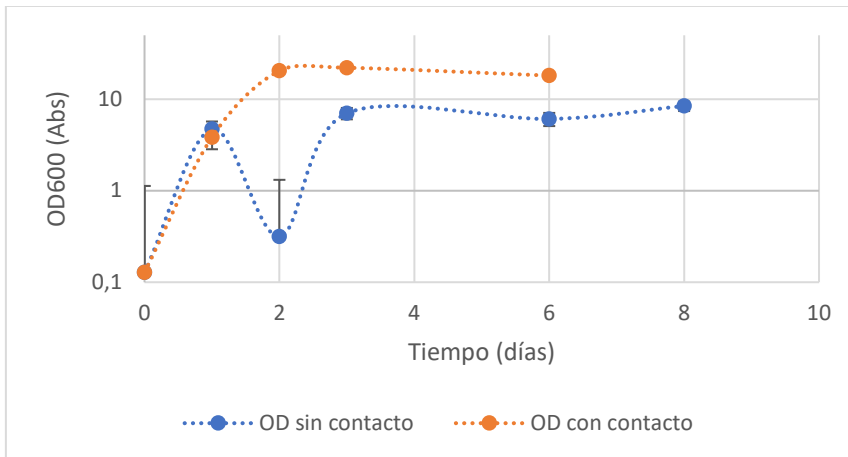


Figura 25. Variación de la densidad óptica medida a 600 nm de la fermentación secuencial con y sin contacto físico entre las levaduras.

Anexo 6: Análisis bioquímicos

- **Coinoculación y fermentaciones individuales**

Tabla 7. Concentración de azúcares asimilables en el mosto al final de la fermentación.

Se estudiaron tres muestras de fermentaciones coinoculadas (Lt2+Td5; triplicados) que se representan como (A), (B) y (C).

Fermentación	Glucosa + Fructosa (g/L)
Lt2 + Td5 (A)	0,00
Lt2 + Td5 (B)	78,1
Lt2 + Td5 (C)	45,8
Lt2	54,2
Td5	45,8
ScR	0,00

- **Inoculación secuencial con contacto**

Tabla 8. Concentración de azúcares asimilables en el mosto al final de la fermentación.

Se estudiaron tres muestras de fermentaciones secuenciales (Td5+Lt2; triplicados) que se representan como (A), (B) y (C).

Fermentación	Glucosa + Fructosa (g/L)
Td5 + Lt2 (A)	0,68
Td5 + Lt2 (B)	0,03
Td5 + Lt2 (C)	0,03

Autoevaluación

Antes de comenzar con las prácticas curriculares sentía curiosidad por cómo es trabajar en el mundo de la investigación en el sector microbiológico. Una vez introducido en este sector, descubrí que obtener resultados consistentes no iba a ser sencillo para unas manos inexpertas. Esta dificultad radica en la facilidad con la que los cultivos se pueden contaminar y en que el mínimo error de manipulación puede llevar a resultados erróneos. Además, hay que tener en cuenta que no se cumple el concepto de “cell factory”, ya que al trabajar con organismos vivos hay una variabilidad en los resultados y estos pueden ser contrarios a los resultados obtenidos por otros autores. En mi caso, esta ha sido mi primera experiencia en el sector de la investigación. La falta de experiencia provocó que no prestara atención suficiente al mantenimiento de la asepsia y de la reproducibilidad. Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en el experimento de la coinoculación. Con el paso del tiempo fui mejorando mis habilidades, siendo más consciente de cómo deben hacerse las cosas y siendo capaz de interpretar los resultados obtenidos. El estado de alarma declarado ha hecho que trabaje con todos los resultados obtenidos hasta la fecha, sin embargo, esta no era mi intención principal. Antes del comienzo del confinamiento le comenté a mi tutora, la Dra. María Jesús Torija, que quería repetir la primera experimentación de nuevo. La experiencia obtenida durante los primeros meses me había motivado a querer repetir la experimentación con el objetivo de presentar unos resultados consistentes, aunque no pudo ser así.

Para concluir, considero que el sector de la investigación microbiológica puede ser frustrante cuando no se presta suficiente atención a los procedimientos y los resultados obtenidos son confusos. Sin embargo, una vez se tienen en cuenta cómo pueden afectar estas variables y se intenta trabajar de forma adecuada, el esfuerzo y el trabajo se ven recompensados. Por todo ello, he decidido orientar mi carrera profesional hacia este sector.