



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI



**EFFECTO DE LAS MANOPROTEÍNAS DE LEVADURAS VÍNICAS EN LA  
FERMENTACIÓN MALOLACTICA DE *OENOCOCCUS OENI***

Maite Los Arcos Senosiain

**TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA**

Tutor académico: Cristina Reguant Miranda, Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili, [cristina.reguant@urv.cat](mailto:cristina.reguant@urv.cat)

En cooperación con: Grupo de investigación Biotecnología Enológica de la Universitat Rovira i Virgili

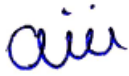
Supervisor: Cristina Reguant Miranda, Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili, [cristina.reguant@urv.cat](mailto:cristina.reguant@urv.cat)

Junio 2022



Yo, Maite Los Arcos Senosiain, con DNI 73115661-H, soy conocedora de la guía de prevención del plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada el julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competenciesnuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 7 de junio de 2022

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'aii'.

## ÍNDICE

1. DATOS DEL CENTRO.....	5
2. RESUMEN.....	5
3. PALABRAS CLAVES .....	5
4. INTRODUCCIÓN .....	6
4.1 Fermentación alcohólica .....	6
4.2 Fermentación maloláctica .....	6
4.3 Interacción levaduras-bacteria lácticas.....	7
4.3.1 <i>Interacciones adversas para las bacterias lácticas</i> .....	7
4.3.2 <i>Interacciones beneficiosas para las bacterias lácticas</i> .....	8
4.4 Manoproteínas .....	9
4.4.1 <i>Propiedades enológicas de las manoproteínas</i> .....	11
4.4.2 <i>Manoproteínas y fermentación maloláctica</i> .....	12
5. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
6.1. Cepas.....	15
6.2 Medios y condiciones de cultivo.....	16
6.3. Fermentaciones alcohólicas con levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> .....	17
6.4. Fermentaciones malolácticas con <i>O.oeni</i> .....	18
6.5. Precipitación de polisacáridos.....	19
6.6. Cuantificación de equivalentes de manosa.....	19
6.7. Análisis de parámetros principales de las fermentaciones: .....	20
7. Resultados y discusión .....	20
7.1. Fermentaciones alcohólicas con levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> .....	20
7.1.1 <i>Monitorización de la densidad durante la fermentación alcohólica</i> .....	21
7.1.2 <i>Viabilidad de las levaduras</i> .....	23
7.1.3 <i>Producción de manoproteínas</i> .....	25
7.2 Fermentaciones malolácticas con <i>O.oeni</i> .....	27
7.2.2 <i>Consumo de manosa en la FML</i> .....	31
7.2.3 <i>Componentes principales del vino</i> .....	32
8. CONCLUSIONES .....	35
9. BIBLIOGRAFÍA.....	36
10. AUTOEVALUACIÓN.....	41

## 1. DATOS DEL CENTRO

El siguiente trabajo se ha realizado en el grupo de investigación Biotecnología Enológica de la Universitat Rovira i Virgili. El grupo pertenece al departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Facultad de Enología en el Campus Sescelades en Tarragona. El grupo está ligado a la investigación con *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni*.

## 2. RESUMEN

Las levaduras con fines enológicos han sido seleccionadas para conseguir vinos de mayor calidad y fermentaciones efectivas del mosto de uva. Uno de los tópicos de interés en los últimos años es la capacidad de las levaduras para liberar manoproteínas. El interés en estas moléculas se debe a la estabilidad proteica y tartárica que aportan al vino. Además, su capacidad de detoxificar el medio favorece el crecimiento de las bacterias lácticas (BL) responsables de la fermentación maloláctica (FML). Las interacciones entre manoproteínas y BLs no han sido muy investigadas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la liberación de manoproteínas de diferentes cepas de levaduras durante la fermentación alcohólica (FA), evaluar su potencial efecto sobre la FML de *Oenococcus oeni* y estudiar el cambio en la composición de los vinos tras la FML. Para este objetivo se realizaron FA con levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* de las que se precipitaron los polisacáridos (PS) y se extrajeron las lías que posteriormente fueron adicionadas a FMLs con *O. oeni*. Se identificaron diferencias entre especies en la liberación de manoproteínas. La liberación de manoproteínas en la especie *T. delbrueckii* fue mayor durante la FA y en *S. cerevisiae* fue posterior. Se consiguieron mayores concentraciones de manoproteínas con la cepa *T. delbrueckii* Viniferm. Destacó el efecto potenciador de la FML en las lías de *T. delbrueckii* Biodiva.

## 3. PALABRAS CLAVES

Fermentación maloláctica, interacción levaduras-bacterias lácticas, manoproteínas, *Oenococcus oeni*, vino.

## 4. INTRODUCCIÓN

El vino es el producto de fermentación del mosto de uva. En la elaboración del vino se da la fermentación alcohólica (FA). Seguida, en algunos vinos, de la fermentación maloláctica (FML).

### 4.1 Fermentación alcohólica

Típicamente, la FA es realizada por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Es frecuente el uso de cultivos iniciadores seleccionados para garantizar el desarrollo rápido y controlado de esta fermentación. En los últimos años destaca en la enología la práctica de llevar a cabo FAs combinando la inoculación de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* como *Torulaspora delbrueckii* o *Metschnikowia pulcherrima* (Aniballi Laura, 2019). Diversos estudios han demostrado que a partir de fermentaciones combinadas se pueden obtener vinos con menor concentración de etanol que aquellos obtenidos a partir de monocultivos de *S. cerevisiae* (Jolly *et al.*, 2014). Las levaduras no-*Saccharomyces* han mostrado mejorar el perfil organoléptico de algunos vinos gracias a actividades enzimáticas particulares, como la de  $\beta$ -glucosidasa (Zhang *et al.*, 2021), que catalizan la liberación de aromas de sus precursores no volátiles (Azzolini *et al.*, 2015) Cuando las levaduras no-*Saccharomyces* son inoculadas solas, normalmente, no completan la FA por lo que la fermentación se termina con la inoculación de *Saccharomyces spp.*

### 4.2 Fermentación maloláctica

Una vez la FA ha acabado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) las bacterias lácticas (BL) llevan a cabo la FML en vinos tintos, algunos blancos y algunos blancos espumosos con elevada acidez. En la FML, convierten el ácido L-málico en ácido L-láctico y CO<sub>2</sub> (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). La descarboxilación del ácido málico reduce la acidez del vino. La FML, a su vez, reduce el sabor agrio del ácido málico mejorando la sensación en boca. Además, reduce nutrientes que favorecen el crecimiento microbiano, proporcionando estabilidad al vino antes de ser embotellado (Virdis *et al.*, 2021).

En el vino se pueden encontrar principalmente cuatro géneros de bacterias lácticas: *Lactiplantibacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Lonvaud-Funel, 1995). *Oenococcus oeni* es la especie dominante por su capacidad de crecer en las condiciones

desfavorables que proporciona el propio vino. Para asegurar la finalización de la FML se pueden inocular cultivos iniciadores que contengan *O.oeni* (Lerm *et al.*, 2010).

### **4.3 Interacción levaduras-bacteria lácticas**

Típicamente, la FML tiene lugar después de la FA motivo por el que su desarrollo está directamente influenciado por el metabolismo de las levaduras vínicas (Balmaseda *et al.*, 2018). La selección de cepas de levaduras y BLs compatibles es fundamental para asegurar el correcto desarrollo de la FA y la FML. Ya que, algunas cepas de levaduras han mostrado efectos negativos sobre el crecimiento de BL (Du Plessis *et al.*, 2017).

#### *4.3.1 Interacciones adversas para las bacterias lácticas*

El vino supone un ambiente adverso para la supervivencia de las BLs. La disponibilidad de los nutrientes es limitada y el pH varía entre 3,0 y 4,0 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). El etanol es el producto principal de la FA y resulta un importante inhibidor de la supervivencia de las BLs (Lerm *et al.*, 2010). Además del etanol, el dióxido de azufre, los ácidos grasos de cadena media y determinados metabolitos de naturaleza proteica son productos del metabolismo de la levadura que tienen un efecto inhibitorio en las BLs (Lerm *et al.*, 2010). La temperatura y el potencial de oxidación-reducción también afectan al desarrollo de las BLs y por tanto a la FML (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

El dióxido de azufre se utiliza como aditivo antioxidante y antimicrobiano contra microorganismos, ya que estos pueden ser responsables del deterioro del vino para mantener su calidad (Toit and Pretorius, 2000). El dióxido de azufre se encuentra en varias formas en equilibrio en el vino y su forma depende del pH. A pH bajos, predomina el SO<sub>2</sub> que es la forma que más inhibe el crecimiento de microorganismos (Divol *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la combinación de un pH bajo con altas concentraciones de dióxido de azufre tienen un fuerte efecto inhibitorio para *O.oeni* (Clair Nielsen *et al.*, 1996). Además, el dióxido de azufre puede ser producido por levaduras. Algunas cepas lo pueden producir en cantidades inhibitorias para *O.oeni* (Osborne and Edwards, 2007).

Los ácidos grasos de cadena media producidos por las levaduras inhiben el crecimiento de las BLs mediante la inhibición de la ATPasa. Además, reducen la habilidad de las BL para catabolizar el ácido málico (Alexandre *et al.*, 2004). La composición del mosto tras

la FA está estrechamente relacionada con la especie de la levadura o levaduras elegidas para la vinificación (Du Plessis *et al.*, 2017).

#### 4.3.2 *Interacciones beneficiosas para las bacterias lácticas*

La interacción de levaduras y BLs también tiene efectos potenciadores de la FML (Aniballi Laura, 2019) aunque la estimulación de las BLs por las levaduras vínicas ha sido menos estudiada que la inhibición (Liu *et al.*, 2017) . Los mecanismos específicos que favorecen la FML no se han identificado pero se ha observado que el efecto inhibitorio de las levaduras se reduce cuando las lías se dejan en contacto con el vino tras la FA (Alexandre *et al.*, 2004). La autólisis de las levaduras es el mecanismo principal que ha demostrado tener beneficios para el crecimiento de las BLs. En el proceso de autólisis es liberado contenido de la célula como nucleótidos, aminoácidos, péptidos y lípidos. En este proceso también son liberados los glucanos y las manoproteínas de la pared celular (Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006). Las manoproteínas de levaduras han sido asociadas con la estimulación de BL (Guilloux-Benatier *et al.*, 1995). El efecto beneficioso se ha asociado a la capacidad de estos compuestos de adsorber metabolitos inhibitorios y por mejorar el contenido nutricional del medio (Caridi, 2006).

La inoculación de *T.delburueckii* durante la FA ha mostrado tener un impacto directo en la población de *O.oeni* gracias a la liberación de manoproteínas y la reducción de etanol y SO<sub>2</sub> en el vino (Ferrando *et al.*, 2020). Algunas cepas, a pesar de no influir en la población bacteriana han mostrado mejorar la FML (Balmaseda *et al.*, 2021a).



**Tabla 1.** Resumen de las interacciones levaduras-bacterias lácticas.

Interacciones inhibitorias		
Metabolito	Efecto	Referencia
<b>Etanol</b>	Afecta al crecimiento bacteriano	(Alexandre <i>et al.</i> , 2004)
<b>SO<sub>2</sub></b>	Inhibe el crecimiento bacteriano, efecto potenciado por el bajo pH	(Divol <i>et al.</i> , 2012) (Clair Nielsen <i>et al.</i> , 1996)
<b>Ácidos grasos de cadena media</b>	Inhibe del crecimiento bacteriano y reduce la capacidad de metabolizar el ácido málico	(Alexandre <i>et al.</i> , 2004)

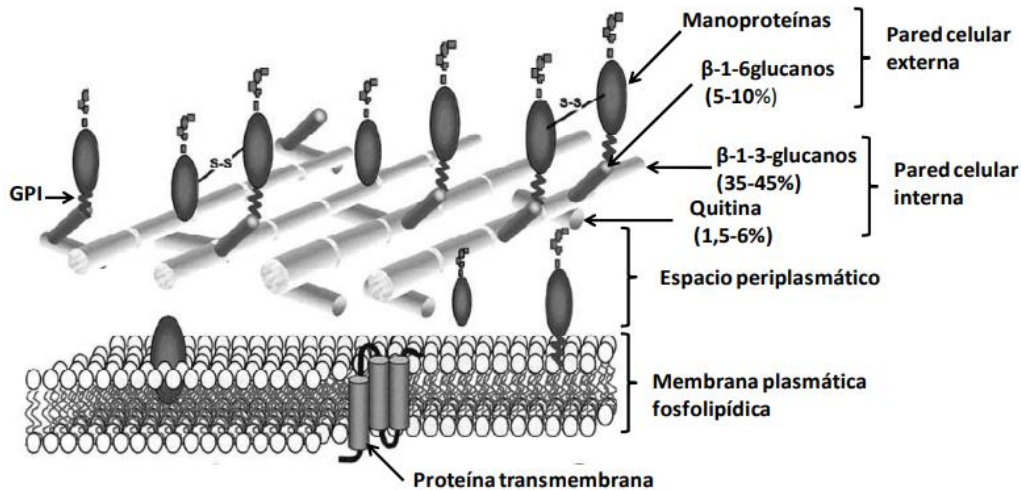
Interacciones beneficiosas

Metabolito	Efecto	Referencia
<b>Producto de autólisis: manoproteínas</b>	Adsorción de compuestos inhibitorios y mejora del contenido nutricional del medio	(Caridi, 2006)

#### 4.4 Manoproteínas

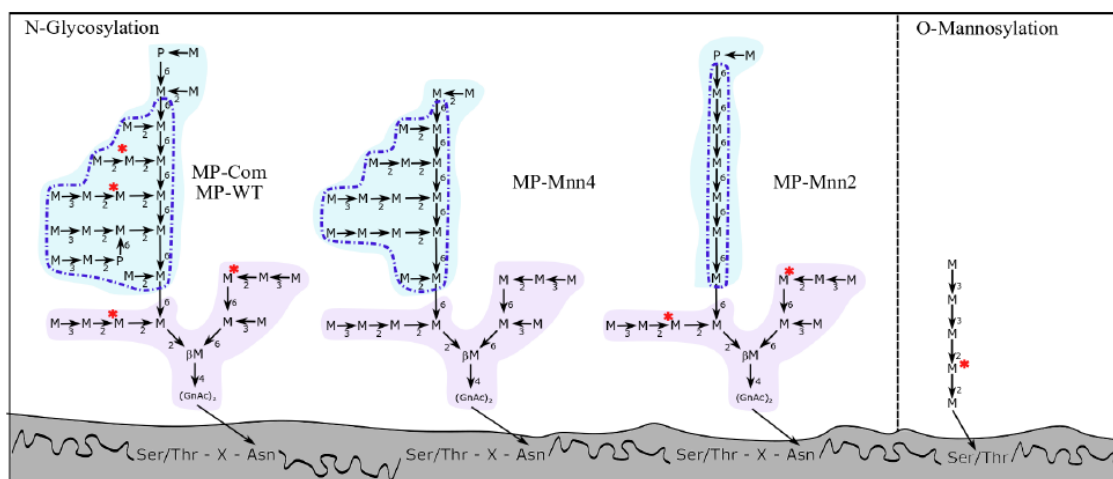
Las manoproteínas son el segundo polisacárido más abundante en los estadios primarios de la fermentación (Domínguez, 2020). En el vino, los polisacáridos (PS) son el grupo de macromoléculas más abundantes. El origen de este tipo de compuestos puede ser de la pared celular de la uva y de la pared celular de las levaduras.

Se pueden distinguir dos partes de la pared celular de las levaduras. En la parte externa encontramos los  $\beta$ -1,6-glucanos y unidos a ellos las manoproteínas. En la parte interna están los  $\beta$ -1,3-glucanos y la quitina (González Royo, 2015).



**Figura 1.** Esquema de la pared celular de las levaduras y porcentaje en peso de cada componente (González Royo, 2015).

Las manoproteínas suponen un 30-50% del peso seco de la pared celular de estas levaduras. Aunque la composición de la pared celular puede variar a medida que las levaduras crecen (González, 2008). Las manoproteínas son proteoglicanos que contienen un 10-15% de proteína y un 85-90% de glucanos (Assunção Bicca *et al.*, 2021). El 98% de los PS son manosa y el 2% restante glucosa. En la parte aminoacídica se encuentran en mayor proporción la serina, la treonina y la asparagina (González, 2008). En estas macromoléculas, las cadenas de manosa están unidas a la proteína a través de enlaces O y N-glucosídicos (Vi' *et al.*, 1995).



**Figura 2.** Representación de manoproteínas con enlaces de las cadenas de manosa O y N-glucosídicos (Assunção Bicca *et al.*, 2021).

La función principal de las manoproteínas es actuar como componente estructural de la pared. Además, son responsables de la permeabilidad de esta (González, 2008). Durante la vinificación, las manoproteínas son liberadas de la pared celular en todas las fases, pero destaca su liberación en el proceso de autólisis. La autólisis se produce en la FA y en etapas más tardías siempre que el vino se mantenga en contacto con las lías de levaduras (Martínez *et al.*, 2016). La liberación en el envejecimiento se da por la acción de las  $\beta$ -1,2-glucanasas de las propias levaduras. Las glucanasas degradan los  $\beta$ -glucanos de la pared celular liberando las manoproteínas ancladas a estos. Las manoproteínas liberadas dependen de la cepa específica de levadura, así como de las condiciones de composición, elaboración y envejecimiento del mosto (González Royo, 2015).

#### 4.4.1 Propiedades enológicas de las manoproteínas

Los vinos con un mayor contenido de PS han mostrado tener un mayor cuerpo. Además, se sugiere que la composición y la estructura de la fracción de PS influye en su capacidad para reducir la astringencia (Vidal *et al.*, 2004) mediante la interacción y limitación de la formación de agregados de taninos (Aniballi Laura, 2019).

En vinos blancos, la presencia de proteínas inestables puede suponer un problema para las condiciones de almacenamiento del vino. Pueden producirse agregaciones y floculaciones de proteínas que cambien su aspecto a uno más turbio (Batista *et al.*, 2009). El tiempo y las altas temperaturas pueden ser causantes de las precipitaciones.

Una de las estrategias que se puede seguir para evitar la agregación de proteínas es la estabilización de las proteínas para evitar malos plegamientos producidos por la temperatura. Diferentes PS, glicoproteínas y proteoglicanos, así como las manoproteínas de las levaduras han mostrado estabilizar las proteínas (Van Sluyter *et al.*, 2015). La parte glucídica de las manoproteínas ha sido relacionada con la estabilidad proteica (Schmidt *et al.*, 2009).

La cristalización de sales de tartárico también afecta a la turbidez del vino. Las manoproteínas pueden contribuir disminuyendo la temperatura de cristalización de forma que mejore la apariencia del vino (Aniballi Laura, 2019).

Las manoproteínas también han mostrado mejorar la espuma de vinos espumosos mediante la formación y la estabilización de ésta (Núñez *et al.*, 2006).

La reducción de compuestos tóxicos como micotoxinas secretadas por hongos que también se encuentran en el vino se ha asociado a las manoproteínas que adsorberían dichos compuestos (Aniballi Laura, 2019).

#### 4.4.2 Manoproteínas y fermentación maloláctica

Se ha demostrado que las macromoléculas liberadas en la autólisis de levaduras pueden ser utilizadas por las bacterias lácticas para crecer en el vino (Guilloux-Benatier *et al.*, 1995). Aunque la dificultad que supone separar y purificar los PS resulta en el menor estudio de estas macromoléculas (Diez *et al.*, 2010), las manoproteínas han mostrado tener un efecto detoxificador en el vino adsorbiendo los ácidos grasos de cadena media y compuestos fenólicos. *O.oeni* posee  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y N-acetil  $\beta$ -glucosamidasa y actividad peptidasa que permite liberar azúcares libres y aminoácidos (Liu *et al.*, 2017). Estas bacterias lácticas son capaces de transportar los diferentes azúcares al interior de la célula gracias al sistema de fosfotransferasa (Jamal *et al.*, 2013). El transporte de azúcares podría ser beneficioso para el crecimiento de BLs y por tanto favorecer la FML (Aniballi Laura, 2019). *O.oeni* ha mostrado ser activado a partir de concentraciones de 200 mg/L de manoproteínas (Diez *et al.*, 2010). A pesar de que no hay estudios al respecto, las bacterias lácticas también podrían utilizar la parte aminoacídica.

#### 4.4.3 Potencial uso de las manoproteínas para mejorar la FML

Se han seguido diferentes estrategias en el laboratorio para conseguir cepas de levaduras que liberen mayor cantidad de manoproteínas. Se han desarrollado mutantes autolíticos y cepas modificadas genéticamente de *S. cerevisiae*. Pero han mostrado liberar componentes inesperados en el vino (Domizio *et al.*, 2014). Además, existen distintos métodos para aislar manoproteínas de la pared de las levaduras entre los que destaca el tratamiento térmico, químico y enzimático (Li and Karboune, 2018). Las levaduras no-*Saccharomyces* han mostrado tener gran capacidad para liberar PS, y entre ellos manoproteínas (Balmaseda *et al.*, 2021c).

Glicocomponentes extraídos de lías de final de FA han mostrado mejoras en la estabilidad tartárica y proteica, así como en propiedades sensoriales de vinos blancos (De Iseppi *et al.*, 2021). Las lías de *T. delbrueckii* adicionada a FMLs han mostrado mayores concentraciones de manoproteínas y FML más rápidas (Balmaseda *et al.*, 2021c).

## 5. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

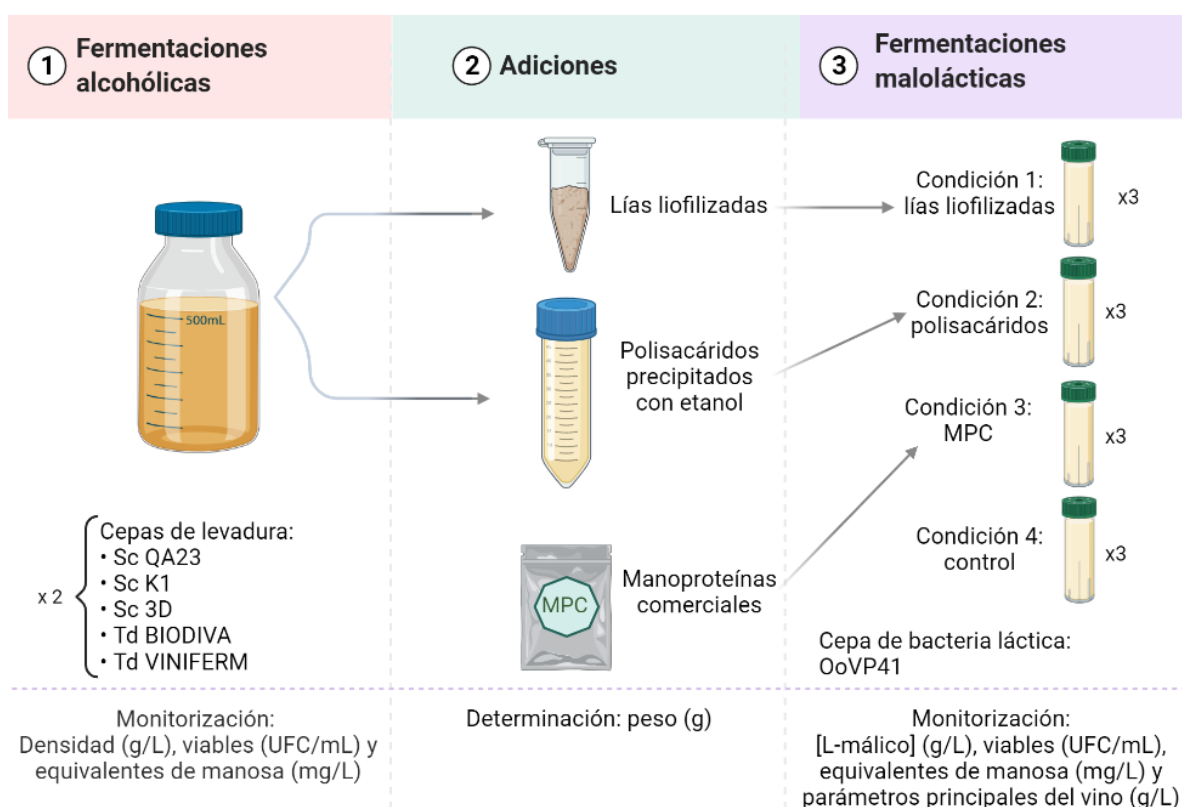
La hipótesis de este trabajo es que los metabolitos producidos por diferentes levaduras, incluyendo las manoproteínas, influyen en *O.oeni* y, como consecuencia, en la FML.

Los objetivos de este estudio son:

- Caracterizar la producción de manoproteínas de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en diferentes puntos de la FA.
- Evaluar el efecto de manoproteínas extraídas de levaduras y compararlo con las lías de las propias levaduras sobre *O.oeni* y la FML.
- Estudiar el cambio en la composición de los vinos tras la FML.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

**Figura 3.** Esquemización del diseño experimental.



## 6.1. Cepas

Se utilizaron 5 cepas de levaduras comerciales para la obtención de lías y manoproteínas que posteriormente se utilizaron para realizar adiciones a FMLs. Las FMLs se realizaron con una cepa de bacteria láctica.

**Tabla 2.** Cepas utilizadas en el trabajo.

Abreviación	Especie	Cepa	Origen
ScQA23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lalvin QA23	Lallemand S.L.
ScK1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lalvin ICV K1	Lallemand S.L.
Sc3D	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Viniferm 3D	Agrovin S.A.
TdBIODIVA	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Biodiva	Lallemand S.L.
TdVINIFERM	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Viniferm NS-TD	Agrovin S.A.
OoVP41	<i>Oenococcus oeni</i>	Lalvin VP41	Lallemand S.L.

El diseño experimental que se ha seguido está representado en la Figura 3.

Para verificar la pureza de los stocks de levaduras utilizados se realizó la identificación a nivel de especie mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del ADN mitocondrial (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Esta técnica permite diferenciar levaduras a nivel de especie en base del tamaño del amplificado de las regiones ribosomales ITS1 e ITS4. La PCR se realizó para las 5 muestras de levaduras. Para la preparación de las muestras se añadió en un tubo para PCR de 0,2 mL 38  $\mu$ L de agua mili-Q estéril, 5  $\mu$ L de tampón de reacción 10x (Biotaq), 3  $\mu$ L de oligonucleótidos, 1  $\mu$ L de primer ITS1, 1  $\mu$ L de primer TIS4, 1  $\mu$ L de dNTPs (Boehringer Mannheim) 1M, 1  $\mu$ L de Biotaq polimerasa (Bioline Reagents, Reino Unido) y se tomó una pequeña porción de una colonia crecida en medio YPD sólido y mezclada en la disolución. La amplificación del DNA se realizó

durante 40 ciclos en ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 52°C y 1 min de 72°C en el Termo Ciclador 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Posteriormente se realizó una electroforesis horizontal en un gel de 100 mL a 1,5% (p/v) de agarosa multipurpose en tampón de migración 1xTBE. En el gel de agarosa de añadieron 4µL de GreenSafe Premium MB13201 (Nzytech, Lisbon, Portugal). En cada pocillo del gel se cargaron 10 µL de DNA amplificado al que se le añadieron 2 µL de colorante azul de bromofenol diluido 1/2. Como marcador de peso molecular se utilizó 5 µL de DNA leader de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania). El gel fue sometido a un voltaje de 60-70 V durante 2 h. Los resultados se muestran en la Figura 1 de Anexos.

## **6.2 Medios y condiciones de cultivo**

Las levaduras se cultivaron en medio YPD estériles con la siguiente composición: 20 g/L glucosa, 20 g/L peptona y 10 g/L extracto de levadura (Panreac, Barcelona, España) disueltos en agua destilada. Para utilizarlo como medio sólido se añadió 20 g/L de agar.

La bacteria OoVP41 fue cultivada en medio MRSmf estéril con la siguiente composición: 52 g/L MRS broth (Difco, Fisher Scientific, Madrid, España), 4 g/L D/L-málico, 5 g/L fructosa disueltos en agua destilada. El pH fue ajustado a 5 con NaOH 10 M. Para utilizarlo como medio sólido se añadió 20 g/L de agar.

Para llevar a cabo las FAs fue utilizado el mosto sintético basado en el medio descrito por Beltran *et al.*, 2004 y con algunas modificaciones de Ruiz-de-Villa *et al.*, 2021. La densidad inicial del mosto sintético fue de 1,088 g/L.

Para las fermentaciones malolácticas fue utilizado un vino sintético (Wine Like Medium, WLM) con la siguiente composición: 1,25 g/L de casaminoácidos, 1,25 g/L de peptona, 0,4/L g de fructosa, 0,25/L g de trehalosa, 2/L g de ácido L-málico, 0,5g/L de ácido cítrico, 2 g/L de ácido L-tartárico, 0,28 g/L de acetato de sodio, 0,6 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,13 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,03 g/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,13 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0,45 g/L KCl, 0,5 g/L de L-cisteína y 5 mL de glicerol, a un pH final de 3,4. Esta disolución fue autoclavada y posteriormente se añadió etanol consiguiendo una concentración del 14 % (v/v).



### 6.3. Fermentaciones alcohólicas con levaduras *Saccharomyces* y no- *Saccharomyces*

Las levaduras secas activas ScQA23, ScK1, TdBiodiva y TdViniferm fueron rehidratadas en un 10% del peso con agua mili-Q estéril. 100  $\mu$ L de la disolución fueron pasados a 5 mL de medio YPD líquido. La cepa *S. cerevisiae* 3D estaba congelada en glicerol. 100  $\mu$ L de la suspensión en glicerol fueron pasados a 5 mL de medio YPD líquido. Las cepas en YPD líquido se dejaron crecer 24-48h a 37 °C. Posteriormente, con el objetivo de conseguir un inóculo puro se cultivaron en estría en medio YPD sólido y se dejaron crecer 24-48h a 37 °C.

Siguiendo el esquema de trabajo de la Figura 3, las fermentaciones alcohólicas se llevaron a cabo en botellas de vidrio de 500 mL que contenían 480 mL de mosto sintético. Se utilizaron tapones de polipropileno que permitían el intercambio de gases al no estar cerrados herméticamente. Las levaduras fueron inoculadas a partir del preinóculo del medio YPD líquido con una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/mL que fue controlada mediante densidad óptica. Todas las fermentaciones se hicieron por duplicado y se llevaron a cabo simultáneamente. Las incubaciones se llevaron a cabo en condiciones estáticas a 20 °C.

Las fermentaciones fueron monitorizadas diariamente mediante medición de densidad de 6 mL de muestra con el densímetro electrónico (Densito 30PX, Mettler Toledo, Hospitalet de Llobregat, España).

Se consideró la densidad 1,040 g/mL como mitad de fermentación y la densidad 0,990 g/mL como final de fermentación. Se determinó el contenido de glucosa/fructosa de final de fermentación mediante análisis enzimático con el multianalizador automático Y15 (Biosystems, Barcelona, España). Se consideraron finalizadas las fermentaciones con un contenido de glucosa/fructosa por debajo de 2 g/L.

Una vez finalizadas las FAs, los vinos se dejaron incubar 15 días más para favorecer el proceso de autólisis. Posteriormente, se recuperaron las lías por centrifugación (en tubos de 50 mL y fueron centrifugados 10 min a 7600 rpm). El sobrenadante se guardó para la precipitación de PS como se explica en el apartado “Precipitación de polisacáridos” que posteriormente fueron adicionados a las FMLs. El pellet con las lías fue resuspendido en 1 mL de agua destilada y posteriormente fueron liofilizado para ser complementadas en

la FML. El contenido de equivalentes de manosa de las lías liofilizadas fue cuantificado como se explica en el apartado “Cuantificación de equivalentes de manosa”.

En los puntos de muestreo inicio de fermentación, mitad de fermentación, final de fermentación y a los 15 días de dar por finalizada la FA se cogieron 45 mL de muestra de cada cepa y se realizó la precipitación de PS como se explica en el apartado “Precipitación de polisacáridos”. Se realizó la cuantificación de equivalentes de manosa de los PS precipitados como se explica en el apartado “Cuantificación de equivalentes de manosa”. En estos puntos de la fermentación también se realizó un control de viables. Se realizaron diluciones seriadas en solución salina del mosto en fermentación y estas diluciones se sembraron en medio YPD sólido. Los cultivos se dejaron crecer 24-48 h a 28°C.

#### **6.4. Fermentaciones malolácticas con *O.oeni***

La cepa VP14 de *O.oeni* fue previamente crecida en 10 mL de MRSmf líquido para conseguir la densidad óptica deseada (0,8-1,2 D.O. a 600 nm) para su inoculación en WLM.

Las FMLs se llevaron a cabo en 10 mL de vino sintético. Se realizaron en las condiciones con las siguientes adiciones: lías liofilizadas en una concentración de 2 g/L (de las cepas ScQA23, ScK1 y TdBiodiva), PS precipitados en una concentración de equivalentes de manosa de 240 mg/L (de las cepas ScQA23, ScK1 y TdBiodiva) y extracto de manoproteína comercial (MPC) en una concentración de 2 g/L. Además, se llevó a cabo una inoculación control para los ensayos de adiciones de cada cepa. Las adiciones de PS fueron calculadas respecto a la concentración de manoproteínas que presentaban los vinos tras la incubación de 15 días. Este cálculo se hizo para conseguir una concentración de manosa que corresponde a 2 g/L de extracto de MPC y así poder evaluar el efecto de concentraciones comparables en los dos formatos (MPC y PS).

Las bacterias fueron inoculadas en una concentración de  $2 \times 10^7$  cel/mL, controlada mediante densidad óptica. Las incubaciones se llevaron a cabo en condiciones estáticas a 20 °C.

La monitorización de la FML se realizó con el contenido de L-málico mediante el analizador automático Y15 (Biosystems) basado en un kit enzimático. Las muestras se cogieron cada 48h.

Cuando se dieron por acabadas las FML se realizó un análisis de los parámetros principales del vino, como se explica en el apartado “Análisis de parámetros principales del vino”. Además, se realizó la cuantificación de equivalentes de manosa como se indica en el apartado “Cuantificación de equivalentes de manosa”

Se realizó un control de viables en el momento de la inoculación y al dar por finalizada la FML. Se realizaron diluciones seriadas del vino en solución salina en cada punto y estas diluciones se sembraron en medio MRS sólido. Posteriormente fueron crecidas durante 7 días a 28°C.

### **6.5. Precipitación de polisacáridos**

La precipitación de PS y posterior cuantificación de equivalentes de manosa se basó en artículos previos (Quirós *et al.*, 2012). Para la precipitación de PS las muestras de mosto recogidas fueron centrifugadas 10 min a 7.600 rpm. A 5 mL del sobrenadante se le añadieron 25 mL de etanol (96% v/v) y se dejó en la nevera toda la noche para precipitar los PS. La disolución fue centrifugada 10 min a 4600 rpm y el sobrenadante fue descartado. Se añadieron 10 mL de etanol (96% v/v) y se centrifugaron 10 min a 4.600 rpm. El sobrenadante fue nuevamente retirado. El pellet fue resuspendido en 1 mL de etanol (96% v/v) y centrifugado 5 min a 8.500 rpm. Se descartó el sobrenadante y en pellet fue secado al vacío a 45° durante 1 hora consiguiendo el precipitado de PS seco.

### **6.6. Cuantificación de equivalentes de manosa**

Para la cuantificación de equivalentes de manosa la matriz sólida (precipitado de PS y lías liofilizada) fue resuspendida en 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 M y los eppendorfs cerrados se pusieron 1 hora a 95° en un baño seco para llevar a cabo la hidrólisis ácida. Después de este tratamiento, se pasaron los eppendorfs a hielo 5 minutos y posteriormente a temperatura ambiente. Para neutralizar las muestras se utilizó 1 mL de NaOH 10 M y después de agitar las muestras se dejaron en reposo 15 mins. Se centrifugaron las muestras 5 min a 8.500 rpm y el sobrenadante se sometió a la medición mediante el kit enzimático K-MANGL D-Manosa/D-Fructosa/D-Glucosa (Megazyme, Wicklow, Irlanda).

### **6.7. Análisis de parámetros principales de las fermentaciones:**

Se analizaron los siguientes componentes químicos mediante el analizador analizador basado en un kit enzimático Y15 (Biosystems): glucosa-fructosa, ácido cítrico, ácido acético, ácido L-málico y ácido D-málico. Además, se midió el pH del vino final.

### **6.8. Análisis estadístico**

Para determinar la producción de manoproteínas en la FA y los componentes principales del vino tras la FML, los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y test Tukey para la comparación de las medias. Todos los análisis se llevaron a cabo usando el programa informático GraphPad Prism 9.3.1. Se consideraron resultados significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1. Fermentaciones alcohólicas con levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces***

Las cepas de levadura elegidas para este trabajo son cultivos iniciadores comerciales. La elección se basó en estudios previos que evaluaron la interacción levadura-BLs y la capacidad de las levaduras para producir manoproteínas.

La cepa ScQA23 fue elegida porque es comúnmente utilizada en la industria y permite un correcto desarrollo de la FML.

La cepa Sc3D está descrita por la empresa proveedora (Agrovin, S.A.) como productora de manoproteínas en concentraciones que pueden superar los 200 mg/L y con alta capacidad autolítica.

La cepa ScK1 posee el factor killer K1 que puede producir la apoptosis de la propia levadura (Reiter *et al.*, 2005). Además, esta cepa ha sido descrita por la empresa proveedora (Lallemand, S.L.) como productora de elevadas concentraciones de SO<sub>2</sub>, por lo que se considera poco favorable para el desarrollo de la FML.

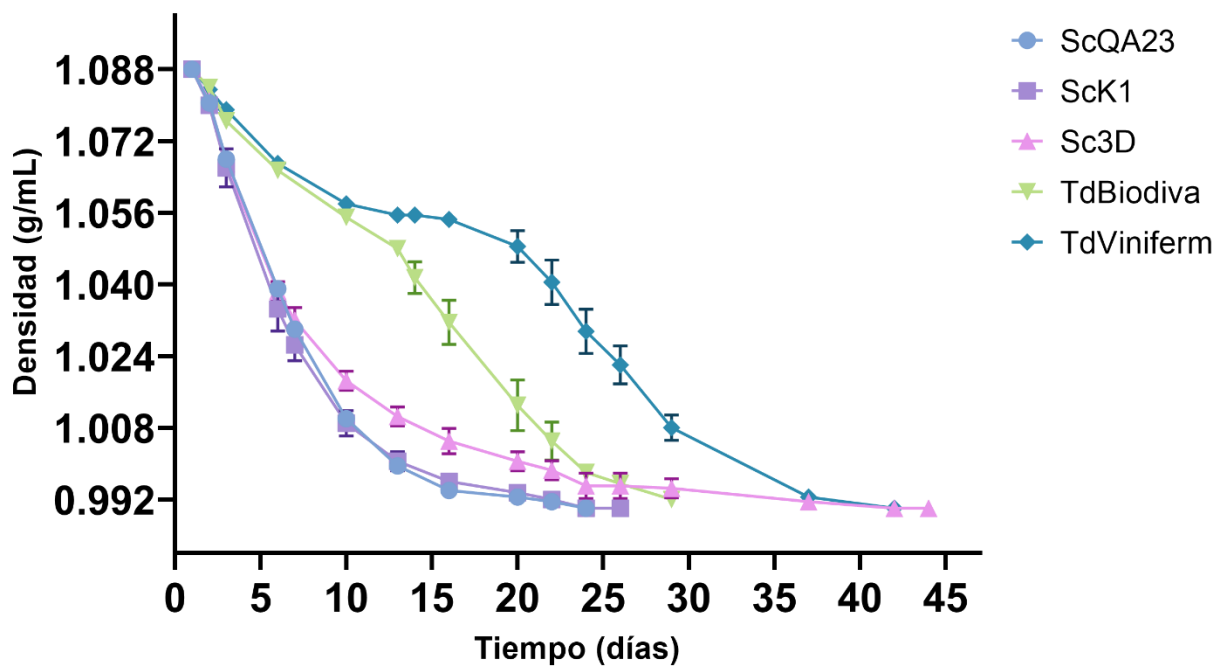
Las cepas TdBiodiva y TdViniferm fueron elegidas porque vinos inoculados con *T. delbrueckii* han mostrado mayor contenido de D-manosa, como medida indirecta del contenido de manoproteínas (Ferrando *et al.*, 2020). Además, la inoculación de *T.*

*delbrueckii* ha mostrado una FML espontánea más rápida que la de *S. cerevisiae* (Balmaseda *et al.*, 2021b).

### 7.1.1 Monitorización de la densidad durante la fermentación alcohólica

Las FAs se llevaron a cabo con el objetivo de evaluar la producción de manoproteínas en diferentes tiempos de fermentación y obtener lías y PS que posteriormente serían adicionados a FMLs.

La monitorización de la FA se realizó mediante la medida de la densidad de los mostos en fermentación. La densidad es una medida aproximada de la cantidad de azúcar presente en el mosto que puede dar directamente el alcohol potencial aproximado. El catabolismo del azúcar durante la fermentación que tiene como producto etanol y CO<sub>2</sub> da como resultado un vino con menor densidad (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). El seguimiento de la densidad durante la FA está representado en la Figura 4.



**Figura 4.** Seguimiento de la densidad del mosto sintético de las FA realizadas por las cepas ScQA23, ScK1, Sc3D, TdBiodiva y TdViniferm en el tiempo.

Todas las FAs acabaron correctamente. Se confirmó el punto final de fermentación midiendo el contenido de glucosa/fructosa del vino mediante análisis enzimático y dándolas por acabadas en valores por debajo de 2 g/L.

Los mostos inoculados con las levaduras ScQA23, Sc k1 llegaron a la densidad 1,040 g/L en 6 días. Completaron la FA en 24 y 26 días respectivamente. Las fermentaciones fueron más lentas de lo que se ha visto en otros estudios en los que ScQA23 acabó la FA en 7 días (Ferrando *et al.*, 2020). Cabe destacar que los ensayos referenciados fueron llevados a cabo en mosto natural que contenía mayor complejidad de nutrientes que el mosto sintético utilizado en este trabajo.

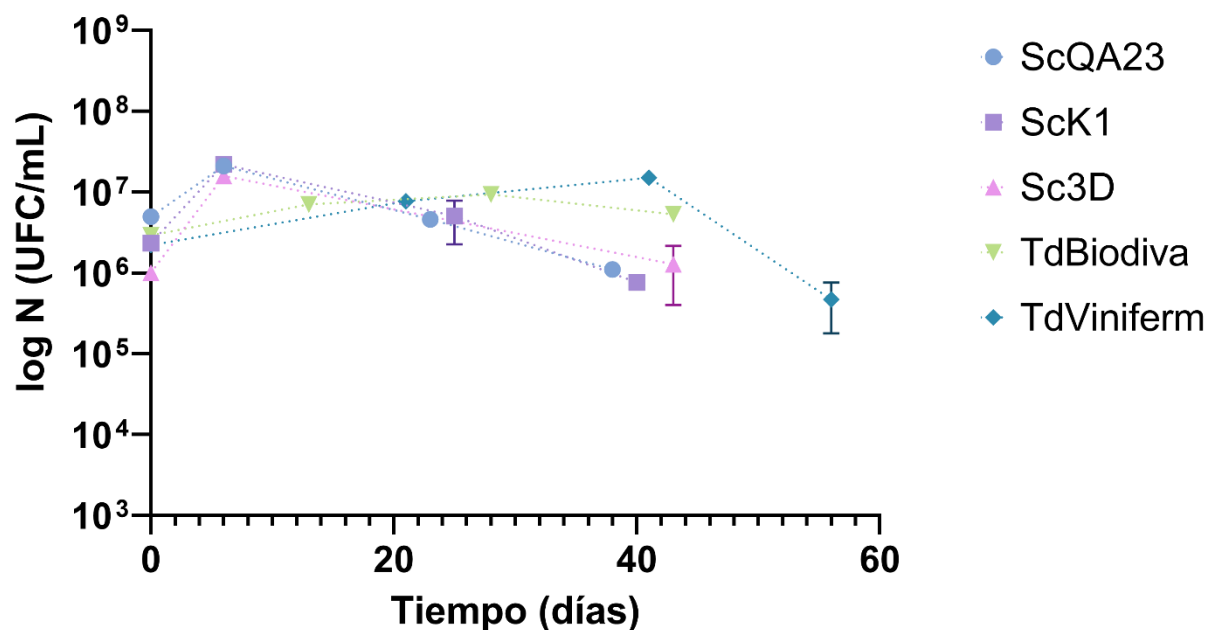
La cepa Sc3D, en cambio, a pesar de que siguió un patrón similar a las demás *S. cerevisiae* cuando llegó al punto mitad de fermentación se ralentizó y tardó 43 días en completar la FA. Esta cepa ha mostrado tener esa cinética de fermentación en estudios anteriores (Aniballi Laura, 2019) y la empresa proveedora la describe como una cepa con elevados requisitos nutricionales.

Las cepas TdBiodiva y TdViniferm tardaron 14 y 22 días, respectivamente, en alcanzar la mitad de fermentación. La cepa TdBiodiva tardó 29 días en finalizar la fermentación y la cepa TdViniferm 44. Estos resultados coinciden con los de estudios previos, en los que *S. cerevisiae* completaba las fermentaciones en 7 días y tardaba hasta 17 cuando era co-inoculada con *T.delbruekii* (Balmaseda *et al.*, 2022).

En conclusión, el mosto sintético utilizado resultó adecuado para el desarrollo de todas las FAs. Puede considerarse un buen modelo para llevar a cabo ensayos con levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.

### 7.1.2 Viabilidad de las levaduras

Se evaluó la viabilidad de las levaduras para ver la evolución de la población microbiana durante la FA y 15 días después de que ésta acabara. Los datos de cinética de crecimiento celular se muestran en la Figura 5.



**Figura 5.** Cinética de crecimiento celular de viables de las levaduras en el tiempo. El dato de Sc3D 15 días después de la FA no se pudo determinar por contaminación.

Se confirmó que la inoculación se había llevado a cabo de forma correcta con el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de las muestras de inicio de la fermentación. Según lo esperado, se detectaron poblaciones de levaduras de entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC/mL.

Las cepas de levaduras *Saccharomyces* tuvieron un comportamiento similar. Como se puede ver en la Figura 5, la viabilidad aumentó en el punto considerado mitad de fermentación alcanzando valores de  $2 \times 10^7$  UFC/mL. Una vez pasada la mitad de fermentación, la viabilidad de estas levaduras disminuyó y tras los 15 días de incubación del vino se observa una disminución de dicha viabilidad. La pérdida de viabilidad estaría relacionada con el inicio del proceso de autólisis de las levaduras.

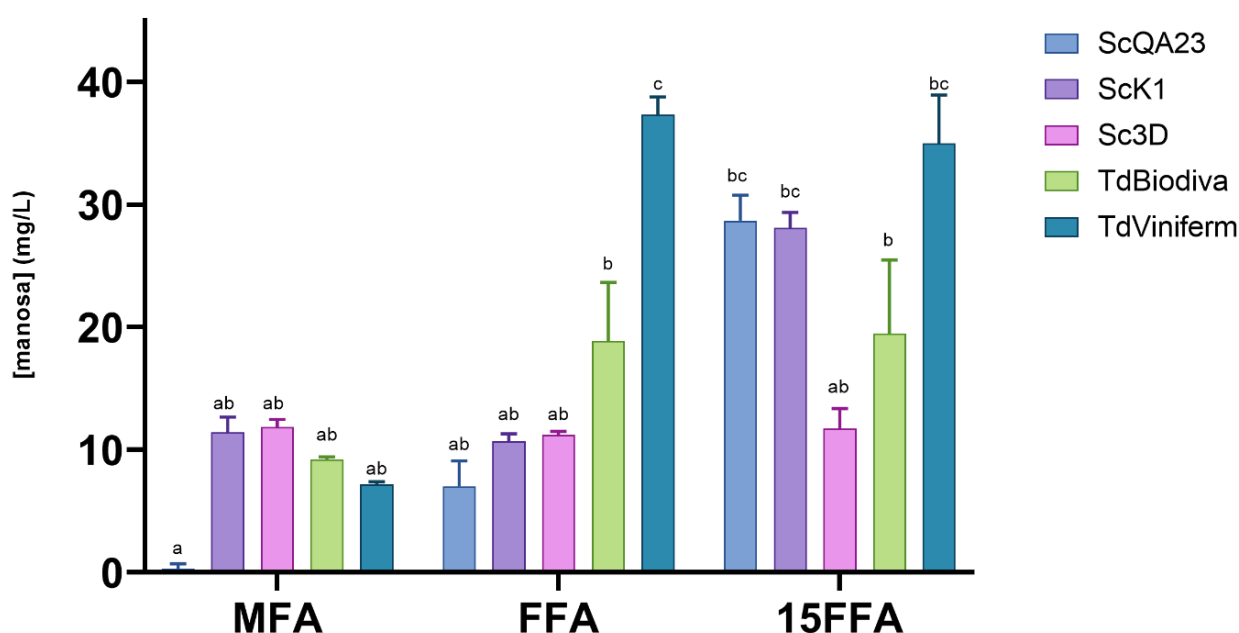
En las cepas no-*Saccharomyces* la viabilidad de las levaduras fue constante durante la FA y se observaron los valores máximos en la segunda mitad de la FA. TdViniferm alcanzó

la densidad celular  $1 \times 10^7$  UFC/mL pero no alcanzaron las poblaciones máximas obtenidas con las cepas *Saccharomyces*. Por otro lado, igual que las cepas *Saccharomyces*, tras los 15 días de incubación del vino la viabilidad disminuyó. Estos resultados coinciden con los de estudios previos en los que la población de *T. delbrueckii* aumenta en los estadios de mitad de fermentación y final de fermentación (Lleixà *et al.*, 2016). En el caso de TdViniferm hasta una población del orden de  $10^5$  UFC/mL. Esta FA fue la que presentó mayor duración, hecho que podría explicar la menor población viable en la etapa final del consumo de azúcares.



### 7.1.3 Producción de manoproteínas

Se determinó la producción de manoproteínas precipitando la fracción de PS totales y cuantificando la concentración de manoproteínas en forma de equivalentes de manosa. El objetivo fue evaluar la liberación de manoproteínas en distintos puntos de la FA. Esta determinación permitió escoger el punto de la FA en el que se liberan más manoproteínas para su precipitación y posterior adición a las FML. Los resultados de cuantificación de manosa se muestran en la Figura 6.



**Figura 6.** Cuantificación de manosa a mitad de fermentación alcohólica (MFA), final de fermentación alcohólica (FFA) y 15 días después del final de la fermentación alcohólica (15FFA).

A mitad de FA no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes cepas de levaduras. Las concentraciones de manosa fueron entrono a 10 mg/L. En este punto de la fermentación, como mostraron las pruebas de viabilidad (Figura 5) las levaduras no estaban sufriendo el proceso de autólisis, por lo que la liberación de manoproteínas fue limitada.

En cambio, a final de FA sí se apreciaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las cepas de la cepa TdViniferm. Ésta alcanzó la concentración de 38 mg/L siendo la concentración

máxima en este punto de muestreo. Las cepas *Saccharomyces* y TdBiodiva, en cambio, no mostraron diferencias significativas respecto a la mitad de fermentación.

En cuanto a los 15 días después del final de fermentación, no se apreciaron diferencias significativas entre cepas. Se pudo apreciar una tendencia a aumentar la liberación de manosa en la incubación del vino en las cepas *Saccharomyces*. Este comportamiento coincidiría con el proceso de autólisis de las levaduras (Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006). En cambio, en la especie *T. delbrueckii* ya habría liberado manoproteínas a final de la fermentación alcohólica, pareciendo que fuera anterior a la liberación observada en las cepas de *Saccharomyces*.

La cepa que mayor contenido de manosa liberó fue TdViniferm. Esto coincide con resultados obtenidos en trabajos anteriores (Belda *et al.*, 2016). En cambio, el comportamiento de Sc3D discrepa de los resultados obtenidos en el trabajo citado, en el que se obtenía una concentración de manosa similar a *T. delbrueckii*. También discrepa de lo esperado de esta cepa que está descrita por la empresa proveedora (Agrovin, S.A.) como productora de manoproteínas.

Los resultados de la cuantificación de manosa en diferentes puntos de muestreo permitieron escoger los vinos con mayor concentración. Se decidió llevar a cabo la precipitación de PS y extracción de las lías de los vinos tras los 15 días de incubación.

## **7.2 Fermentaciones malolácticas con *O.oeni***

Por causa de la falta de tiempo, los resultados que se muestran de las FMLs son los de las adiciones realizadas con productos (PS y lías) de las cepas ScQA23, ScK1 y TdBiodiva.

### *7.2.1 Consumo de ácido L-málico*

Se determinó el consumo de ácido L-málico para de monitorizar las FMLs, ya que este es el sustrato de la fermentación.

Debido a que las FA se alargaron, no dio tiempo a monitorizar el consumo total del ácido L-málico. Se escogieron los valores de consumo de ácido L-málico de 7 días tras la inoculación como referencia para poder comparar la evolución de la FML en las diferentes condiciones.

Como las inoculaciones se llevaron a cabo en días diferentes se realizó una FML control de WLM sin adiciones como condición control para los ensayos de cada cepa. En el caso del control del ensayo con ScQA23 se observó una FML más rápida que en el resto de los controles. Se descartaron fallos en la inoculación siendo la población viable 30 minutos después de la inoculación entre  $2$  y  $4 \times 10^7$  UFC/mL en todos los ensayos control, según lo esperado. En la Tabla 3 se representan los ratios de consumo respecto a los controles propios, para normalizar los datos y poder comparar los diferentes ensayos.

**Tabla 3.** Parámetros relacionados con el consumo de ácido L-málico en las condiciones ensayadas. El porcentaje y ratio de consumo corresponden a 7 días después de la inoculación.

		<b>Velocidad de consumo* (g/L·día)</b>	<b>Porcentaje de consumo**</b>	<b>Ratio de consumo respecto al control</b>
<b>ScQA23</b>	Control	0,12 ± 0,00	53,04 ± 1,43	
	Lías	0,11 ± 0,00	50,22 ± 0,33	0,95 ± 0,03
	PS	0,10 ± 0,01	30,25 ± 2,51	0,57 ± 0,05
<b>ScK1</b>	Control	0,05 ± 0,01	28,31 ± 4,90	
	Lías	0,03 ± 0,01	13,11 ± 2,98	0,50 ± 0,02
	PS	0,00 ± 0,00	2,52 ± 2,37	0,09 ± 0,07
<b>TdBiodiva</b>	Control	0,05 ± 0,00	26,04 ± 0,00	
	Lías	0,09 ± 0,00	48,09 ± 3,36	1,76 ± 0,12
	PS	0,02 ± 0,00	10,40 ± 0,86	0,42 ± 0,03
<b>MPC***</b>		0,12 ± 0,00	55,28 ± 1,37	1,01 ± 0,05

\*Porcentaje calculado respecto a la concentración inicial.

\*\*Para el cálculo de la velocidad solo se consideró el periodo de consumo exponencial.

\*\*\*Los datos están calculados respecto al control de ScQA23.

En todas las fermentaciones se detectó consumo de ácido L-málico excepto en aquella en la que se adicionaron PS de ScK1 en la que se apreció una inhibición total de la FML.

El consumo de ácido L-málico en las adiciones con lías fue, en los tres casos, mayor que el de las adiciones de los PS. Las lías de TdBiodiva presentaron el mayor ratio de consumo respecto al control. Por otro lado, las lías de ScQA23 no mostraron una mejora en la FML. En cambio, en las fermentaciones con las lías de ScK1 el consumo de ácido L-málico fue

menor que su control. Estos resultados coinciden con el efecto neutro que se esperaba de la cepa ScQA23. Por otro lado, el efecto inhibitorio de la FML de la cepa ScK1, tanto el de las lías como el los PS coincide con el efecto inhibitorio para la FML que se esperaba. Estos resultados coinciden con el efecto beneficiosos que *T. delbrueckii* ha mostrado tener en las FML (Balmaseda *et al.*, 2021b). En estudios anteriores también se aprecia que FMLs con lías adicionadas de TdBiodiva resultaban más rápidas que aquellas con lías de ScQA23 (Balmaseda *et al.*, 2021c). Estos resultados posicionan a las lías de TdBiodiva como un producto interesante para el desarrollo de la FML. Además, el hecho de que las lías sean un producto que la industria enológica desecha, las sitúa como un objetivo que estudiar en el futuro.

Por otro lado, se mostró manoproteínas de diferentes tamaños tienen efectos diversos sobre las BLs (Diez *et al.*, 2010). Esto explicaría el efecto diferenciado que tienen las cepas en el desarrollo de la FML. Se debe tener en cuenta que el efecto de las manoproteínas, además de ser dependiente de las cepas de levaduras es fuertemente dependiente de la cepa de BL (Balmaseda *et al.*, 2021c). Por lo que se debería evaluar el efecto de estas levaduras en otras cepas y especies de BL.

En cuanto a las adiciones de los PS, se esperaba una mejora en la FML debido a que la precipitación de PS suponía una adición más pura de manoproteínas. En cambio, el efecto obtenido fue un menor consumo de ácido L-málico respecto al control en todos los ensayos. La solubilidad de los PS fue muy baja y se observó una precipitación importante tras la adición en las diferentes fermentaciones. La baja solubilidad podría estar relacionada con la coprecipitación de sales de tartárico que dificultarían la resuspensión de las manoproteínas y con ello la disponibilidad para *O.oeni*.

El ácido D-tartárico está descrito con un fuerte inhibidor competitivo de la actividad de la enzima maloláctica (Lonvaud-Funel *et al.*, 1982). Es posible, que el problema con la precipitación de sales de tartrato, añadido al contenido inicial de ácido L-tartárico que contenía el WLM (2 g/L), resultase en concentraciones inhibitorias para la FML de dicho ácido. Además, se observó que el pH de los vinos con adiciones de PS fue notablemente más elevado que el del resto de vinos (Tabla 3). Las sales podrían protonarse parcialmente adquiriendo una estructura similar al ácido L-málico y derivando en una inhibición competitiva. Se realizó un pequeño ensayo con adiciones de tartrato de sodio a WLM en cantidades similares a las del precipitado de PS adicionado y se comprobó que el pH subía

con una tendencia similar a la observada en las FMLs (Tabla 3). Aunque no se pudo determinar el contenido de tartárico al no disponer en ese momento del material necesario. Se podría utilizar un método colorimétrico para su determinación. Este fenómeno se podría asociar a la protonación de las sales de tartato, siendo una confirmación de su presencia y respondiendo a la interferencia en el desarrollo de las FMLs.

El ensayo con extracto de manoproteína comercial (MPC) fue llevado a cabo con el objetivo de evaluar el efecto de un preparado soluble de manoproteínas y compararlo con el resto de preparados (precipitados PS y lías). En este estudio la adición del extracto MPC presenta un consumo de ácido L-málico ligeramente superior a su control. Cabe destacar que este efecto positivo sobre la FML fue más evidente en estudios anteriores realizados por el grupo. El tiempo de almacenaje del producto MPC podría haber mermado parcialmente su potencial efecto activador.

A pesar de que no hubo tiempo para realizar el seguimiento del consumo completo de ácido L-málico, se apreció una tendencia al estancamiento en la segunda mitad de las FMLs en todos los casos. Se determinó la viabilidad una vez se detectó la realentización de las FMLs y se observó que las poblaciones habían disminuido, con valores por debajo de  $1 \times 10^4$  UFC/mL, lo que podría explicar el fenómeno observado. Con excepción en los casos del ensayo con MPC en el que se detectaron concentraciones de  $4 \times 10^4$  UFC/mL y en el ensayo con los PS de ScQA23 que detectaron concentraciones de  $3 \times 10^3$  UFC/mL.

### 7.2.2 Consumo de manosa en la FML

El principal metabolismo objeto de estudio en este trabajo fue el de la asimilación de manoproteínas. El objetivo de este análisis era entender el uso que hace *O.oeni* de las manoproteínas. Para ello, se caracterizó, mediante kit enzimático, el contenido de manoproteínas en forma de equivalentes de manosa manosa tras la FML (Tabla 4).

**Tabla 4.** Contenido de manosa en el vino al inicio de la FML (IFML) y al final de la FML (FFML). Para los ensayos con manoproteína comercial (PMC), los PS y las lías de las tres cepas.

	[equivalentes de manosa] (mg/l)	
	IFML	FFML
<b>MPC</b>	240	227,24 ± 101, 27
<b>PS ScQA23</b>	240*	159,45 ± 13,46
<b>PS ScK1</b>	240*	58,27 ± 25,26
<b>PS TdBiodiva</b>	240*	203,66 ± 20,50
<b>Lías ScQA23</b>	153,74 ± 16,15	31,19 ± 15,53
<b>Lías ScK1</b>	110,98 ± 1,66	24,88 ± 3,13
<b>Lías TdBiodiva</b>	68,23 ± 41,83	90,19 ± 2,48

\*Se adicionó la cantidad de precipitado de PS equivalente a 240 mg/L, misma cantidad añadida de MPC.

La cuantificación de equivalentes de manosa en las lías se realizó a partir del material sólido liofilizado que se adicionó a las FMLs. Pero al adicionar las lías, las manoproteínas seguirían unidas covalentemente a la matriz de las lías. La liberación podría darse a lo largo de la FML por acción de las enzimas bacterianas (Liu *et al.*, 2017). Por otro lado, la cuantificación en los PS se realizó a partir del vino centrifugado. Como se ha comentado anteriormente, los precipitados de PS no mostraron una buena solubilidad, por

lo que las manoproteínas se encontraban probablemente con baja disponibilidad para *O.oeni*.

Aunque este balance no se puede establecer con exactitud por las razones anteriormente mencionadas, se puede estimar el consumo de manoproteína en la fermentación con manoproteína comercial (MPC) en la que las manoproteínas sí se solubilizaron totalmente. El consumo en este ensayo fue de 12 mg/L. La variabilidad entre los duplicados de las muestras pudo ser debido al complejo pretratamiento que se le hace a las muestras (precipitación, hidrólisis ácida y secado) previo al análisis de la manosa.

Estudios previos del grupo en las mismas condiciones de fermentación (con la misma adición de manoproteína comercial (MPC)) y misma cepa de *O.oeni* mostraron un consumo máximo de 32 mg/L.

Por estos motivos, el valor que se determina al final de la FML, a partir del sobrenadante del cultivo, será un balance entre la manoproteína liberada y la manoproteína consumida por *O.oeni*. Considerando que los valores de manoproteínas determinados al final de FML son muy superiores al consumo estimado de *O. oeni* antes mencionado (12 mg/L con MPC soluble en este estudio y máximo 32 mg/L en estudios anteriores), estos valores se pueden considerar indicativos del grado de liberación de manoproteínas en cada condición, al menos a nivel cualitativo.

En el caso de las adiciones con PS, el contenido a final de la FML fue mayor que en el caso de las adiciones con lías. Al tratarse de un producto purificado, se podía esperar una mayor liberación de manoproteínas al medio.

Se cuantificó una mayor concentración de manoproteínas, a final de la FML en el ensayo con lías de TdBiodiva en comparación con los ensayos con las lías de las demás cepas. En el ensayo con las lías de ScK1 se cuantificó la menor concentración de manoproteínas. Estos resultados coinciden con el efecto mostrado sobre las FMLs (Tabla 3) en el que TdBiodiva destacó como potenciadora de la FML y ScK1 como inhibidora de esta.

### 7.2.3 Componentes principales del vino

Se caracterizaron algunos de los componentes químicos principales después de la FML para evaluar el efecto de las adiciones en el vino. Las medidas se realizaron mediante análisis enzimático.



**Tabla 5.** Parámetros principales del vino en los ensayos con manoproteína comercial (MPC), lías y PS de las tres cepas. Los valores de consumo y producción respecto a la concentración del WLM. ND corresponde a no detectado.

	Consumo fructosa (g/L)	Consumo ácido cítrico (mg/L)	Producción ácido acético (g/L)	Producción D-láctico (g/L)	Producción ácido L-láctico (g/l)	pH
<b>MPC</b>	ND	330,00 ± 158,01 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,16 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,77 ± 0,01
<b>C ScQA23</b>	ND	254,66 ± 103,76 <sup>ab</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>bc</sup>	1,06 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,75 ± 0,01
<b>C ScK1</b>	ND	ND	ND	0,02 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,47 ± 0,04 <sup>c</sup>	3,65 ± 0,00
<b>C TdBiodiva</b>	ND	242,00 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>cd</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,46 ± 0,00 <sup>c</sup>	3,62 ± 0,00
<b>Lías ScQA23</b>	ND	122,50 ± 0,70 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,74 ± 0,01
<b>Las ScK1</b>	ND	346 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,23 ± 0,05 <sup>d</sup>	3,59 ± 0,01
<b>Lías TdBiodiva</b>	ND	419,50 ± 51,62 <sup>ab</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,86 ± 0,09 <sup>b</sup>	3,67 ± 0,00
<b>PS ScQA23</b>	ND	304,00 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,29 ± 0,01
<b>PS ScK1</b>	ND	241,33 ± 36,95 <sup>ab</sup>	ND	0,01 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,03 ± 0,02 <sup>e</sup>	3,96 ± 0,00
<b>PS TdBiodiva</b>	ND	242,00 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,02 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>d</sup>	4,09 ± 0,01

El pH aumentó en todas las condiciones. A pesar de ello, no todas las subidas de pH se pueden asociar al desarrollo de la FML. En el caso de las adiciones de PS todas aumentaron de 0,45 hasta 0,79 puntos de pH, en el caso de ScQA23. Como se ha mencionado anteriormente, la subida de pH podría estar relacionada con la presencia de sales de tartárico en el preparado de PS que al disolverse en el WLM provocaría el aumento del pH. Las adiciones de PS (ScQA23 200 mg, ScK1 115 mg, TdBiodiva 140mg) coinciden con la diferencia de pH en estos ensayos. Lo que reforzaría la hipótesis del problema de coprecipitación con las sales tartáricas.

En el caso de las adiciones con las lías, el ensayo con ScQA23 y su control presentaron aumento de pH respecto al inicial. A su vez, la producción de ácido L-láctico en ambos ensayos se puede relacionar con el desarrollo de la FML. El ensayo con lías de ScK1 mostró un pH y producción de ácido L-láctico significativamente menor que la del control al final de la FML como se esperaba. Por otro lado, el ensayo con lías de TdBiodiva presentó un aumento de pH respecto al inicial y una producción de ácido L-láctico que duplicó al obtenido en su control. Lo que también se puede relacionar con el desarrollo de la FML.

No se detectó consumo de fructosa en ninguno de los ensayos. La producción de D-láctico también fue baja en todos los ensayos. Por lo que, se puede considerar que no hubo metabolismo de azúcares.

Todos los ensayos excepto el Control de ScK1 presentaron consumo de cítrico. A pesar de eso, la producción acética en moles no correspondió con el consumo cítrico en moles que se esperaría obtener de la primera reacción del metabolismo del citrato realizada por la citrato liasa. La falta de detección acética como en el caso del control de ScK1 y en el ensayo con PS de ScK1 se presupone con un error en la detección.

Cabe destacar que no se detectan en ningún caso valores de acidez volátil que puedan considerarse negativos para la calidad del vino.

## 8. CONCLUSIONES

Como conclusión, la caracterización de manoproteínas en distintos momentos de la FA puso en evidencia que la liberación de manoproteínas es diferente entre especies. Se observó que la liberación de manoproteínas en la especie *T. delbrueckii* fue mayor durante la FA y en *S. cerevisiae* fue posterior. El aumento de la duración de las fermentaciones de *T. delbrueckii* pudo promover la liberación de manoproteínas, como consecuencia del proceso de autólisis. Además, la caracterización de las lías permitió observar diferencias de liberación de manoproteínas en función de la cepa de levadura.

El desarrollo de la FML en los vinos mostró un cambio en su composición sobre todo destacó la subida de pH derivado de la FML. Por otro lado, las lías de determinadas cepas de levaduras pueden ser una fuente de activadores de la FML, como se demostró con TdBiodiva. No se pudo evaluar correctamente el potencial efecto de los PS precipitados debido a la interferencia por la presencia de sales tartáricas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Alexandre, H., Costello, P.J., Remize, F., Guzzo, J., and Guilloux-Benatier, M. (2004) Saccharomyces cerevisiae–Oenococcus oeni interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int J Food Microbiol* **93**: 141–154.

Alexandre, H., and Guilloux-Benatier, M. (2006) Yeast autolysis in sparkling wine – a review. *Aust J Grape Wine Res* **12**: 119–127 Accessed May 20, 2022.

Anibaldi Laura (2019) UNIVERSITÀ degli STUDI di VERONA malolactic fermentation and gene expression of the mannose. .

Assunção Bicca, S., Poncet-Legrand, C., Williams, P., Mekoue Nguela, J., Doco, T., and Vernhet, A. (2021) Structural characteristics of Saccharomyces cerevisiae mannoproteins: Impact of their polysaccharide part. *Carbohydr Polym* **277** Accessed June 5, 2022.

Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., and Zapparoli, G. (2015) Contribution to the aroma of white wines by controlled Torulaspora delbrueckii cultures in association with Saccharomyces cerevisiae. *World J Microbiol Biotechnol* **31**: 277–293 Accessed May 29, 2022.

Balmaseda, A., Bordons, A., Reguant, C., and Bautista-Gallego, J. (2018) Non-Saccharomyces in wine: Effect upon Oenococcus oeni and malolactic fermentation. *Front Microbiol* **9**: 534.

Balmaseda, A., Rozès, N., Bordons, A., and Reguant, C. (2021a) Modulation of a defined community of Oenococcus oeni strains by Torulaspora delbrueckii and its impact on malolactic fermentation. .

Balmaseda, A., Rozès, N., Bordons, A., and Reguant, C. (2021b) Torulaspora delbrueckii promotes malolactic fermentation in high polyphenolic red wines. *LWT* **148**: 111777.

Balmaseda, A., Rozès, N., Bordons, A., and Reguant, C. (2021c) Simulated lees of different yeast species modify the performance of malolactic fermentation by Oenococcus oeni in wine-like medium. *Food Microbiol* **99**.

Balmaseda, A., Rozès, N., Bordons, A., and Reguant, C. (2022) Molecular adaptation

response of *Oenococcus oeni* in non-Saccharomyces fermented wines: A comparative multi-omics approach. *Int J Food Microbiol* **362**: 109490.

Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V.B., Teixeira, A.R., and Ferreira, R.B. (2009) The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chem* **112**: 169–177.

Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderón, F., and Benito, S. (2016) Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast* **33**: 329–338 Accessed June 5, 2022.

Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J.M. (2004) Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res* **4**: 625–632 Accessed June 6, 2022.

Caridi, A. (2006) Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**: 417–422 Accessed May 6, 2022.

Clair Nielsen, J., Prah, C., and Lonvaud-Funel, A. (1996) Malolactic Fermentation in Wine by Direct Inoculation with Freeze-Dried *Leuconostoc oenos* Cultures. .

Diez, L., Guadalupe, Z., Ayestara´n, B.N., Ayestara´n, A., and Ruiz-Larrea, F. (2010) Effect of Yeast Mannoproteins and Grape Polysaccharides on the Growth of Wine Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria. *J Agric Food Chem* **58**: 7731–7739 Accessed May 21, 2022.

Divol, B., Toit, M. Du, and Duckitt, E. (2012) Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**: 601–613 Accessed June 1, 2022.

Domínguez, C. (2020) “Effects of mannoprotein yeast’s on *Oenococcus oeni* and Malolactic Fermentation.” .

Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L.F., and Barile, D. (2014) Use of non-Saccharomyces wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol* **43**: 5–15.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 1**: 329–337 Accessed May 30, 2022.

Ferrando, N., Araque, I., Ortís, A., Thornes, G., Bautista-Gallego, J., Bordons, A., and Reguant, C. (2020) Evaluating the effect of using non-Saccharomyces on Oenococcus oeni and wine malolactic fermentation. *Food Res Int* **138**: 109779.

González Royo, E. (2015) Aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas para compensar los efectos negativos del cambio climático sobre vinos espumosos (Cava) y vinos tintos. *TDX (Tesis Dr en Xarxa)* Accessed May 21, 2022.

González, D. (2008) Desarrollo de cepas vínicas de Saccharomyces cerevisiae superproductoras de manoproteínas mediante técnicas de DNA recombinante , y su aplicación en enología. *Univ Autónoma Madrid* 3–4.

Guilloux-Benatier, M., Guerreau, J., and Feuillat, M. (1995) Influence of Initial Colloid Content on Yeast Macromolecule Production and on the Metabolism of Wine Microorganisms The influence of initial colloid content on macromolecule production by.

Iseppi, A. De, Marangon, M., Vincenzi, S., Lomolino, G., Curioni, A., and Divol, B. (2021) A novel approach for the valorization of wine lees as a source of compounds able to modify wine properties. *LWT* **136**: 110274.

Jamal, Z., Miot-Sertier, C., Thibau, F., Dutilh, L., Lonvaud-Funel, A., Ballestra, P., *et al.* (2013) Distribution and functions of phosphotransferase system genes in the genome of the lactic acid bacterium oenococcus oeni. *Appl Environ Microbiol* **79**: 3371–3379 Accessed May 21, 2022.

Jolly, N.P., Varela, C., and Pretorius, I.S. (2014) Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* **14**: 215–237 Accessed June 1, 2022.

Lerm, E., Engelbrecht, L., and Toit, M. du (2010) Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *South African J Enol Vitic* **31**: 186–212.

Li, J., and Karboune, S. (2018) A comparative study for the isolation and characterization of mannoproteins from Saccharomyces cerevisiae yeast cell wall. Accessed May 28, 2022.

Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-

Kopplin, P., *et al.* (2017) Critical Reviews in Food Science and Nutrition Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions. Accessed May 28, 2022.

Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A., and Portillo, M. del C. (2016) Saccharomyces and non-Saccharomyces competition during microvinification under different sugar and nitrogen conditions. *Front Microbiol* **7**: 1959.

Lonvaud-Funel, A. (1995) Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiol Lett* **126**: 209–214 Accessed June 1, 2022.

Lonvaud-Funel, A., Strasser, A.M., and Saadt, D.E. (1982) Purification and Properties of a Malolactic Enzyme from a Strain of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Grapes. *Appl Environ Microbiol* **43**: 357–361.

Martínez, J.M., Cebrián, G., Álvarez, I., and Raso, J. (2016) Release of Mannoproteins during *Saccharomyces cerevisiae* Autolysis Induced by Pulsed Electric Field. *Front Microbiol* **7** Accessed May 16, 2022.

Núñez, Y.P., Carrascosa, A. V., González, R., Polo, M.C., and Martínez-Rodríguez, A. (2006) Isolation and Characterization of a Thermally Extracted Yeast Cell Wall Fraction Potentially Useful for Improving the Foaming Properties of Sparkling Wines. *J Agric Food Chem* **54**: 7898–7903 Accessed June 7, 2022.

Osborne, J.P., and Edwards, C.G. (2007) Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. Accessed June 6, 2022.

Plessis, H. Du, Toit, M. Du, Nieuwoudt, H., Rijst, M. Van Der, Kidd, M., and Jolly, N. (2017) Effect of saccharomyces, non-saccharomyces yeasts and malolactic fermentation strategies on fermentation kinetics and flavor of Shiraz wines. *Fermentation* **3**.

Quirós, M., Gonzalez, R., and Morales, P. (2012) A simple method for total quantification of mannoprotein content in real wine samples. *Food Chem* **134**: 1205–1210.

Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., and Schmitt, M.J. (2005) Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **168**: 353 Accessed June 2, 2022.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., and Lonvaud, A. (2006) Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2<sup>nd</sup> Edition. 1–497 Accessed June 7, 2022.

Ruiz-de-Villa, C., Bordons, A., Reguant, C., and Rozès, N. (2021) Screening del efecto de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulasporea delbrueckii* sobre *Oenococcus oeni* durante la fermentación maloláctica. In *Reunión de la Red Española de Bacterias Lácticas*. .

Schmidt, S.A., Tan, E.L., Brown, S., Nasution, U.J., Pettolino, F., Macintyre, O.J., *et al.* (2009) Hpf2 glycan structure is critical for protection against protein haze formation in white wine. *J Agric Food Chem* **57**: 3308–3315 Accessed May 21, 2022.

Sluyter, S.C. Van, Mcrae, J.M., Falconer, R.J., Smith, P.A., Bacic, A., Waters, E.J., and Marangon, M. (2015) Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. Accessed May 21, 2022.

Toit, M. du, and Pretorius, I.S. (2000) Microbial Spoilage and Preservation of Wine: Using Weapons from Nature's Own Arsenal -A Review. *South African J Enol Vitic* **21**: 74–96 Accessed June 1, 2022.

Vi', V., Cid, V.J., Dura'n, A., Dura'n, D., Rey, F. Del, Snyder, M.P., *et al.* (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**: 345–386 Accessed May 16, 2022.

Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., and Waters, E. (2004) The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem* **4**: 519–525 Accessed May 10, 2022.

Virdis, C., Sumby, K., Bartowsky, E., and Jiranek, V. (2021) Lactic Acid Bacteria in Wine: Technological Advances and Evaluation of Their Functional Role. *Front Microbiol* **11** Accessed May 10, 2022.

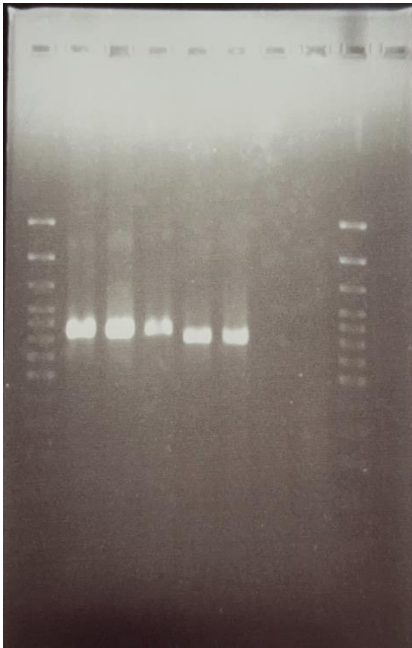
Zhang, P., Zhang, R., Sirisena, S., Gan, R., and Fang, Z. (2021) Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiol* **100**: 103859 Accessed June 1, 2022.



## **10. AUTOEVALUACIÓN**

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a la Dra. Cristina Reguant por la oportunidad de realizar las prácticas para basar el trabajo de fin de grado. Estas prácticas me han permitido interiorizar los conocimientos adquiridos durante la carrera y adquirir muchos otros nuevos. Sobre todo, la manipulación tanto de levaduras como de bacterias. Estas prácticas me han ayudado a acercarme a la ciencia y a conocer cómo se trabaja en un laboratorio. La ayuda de Paloma ha sido fundamental en mi aprendizaje y en la realización de estas prácticas. Y el trabajo coordinado con el resto de las personas del laboratorio me ha ayudado a alcanzar un cierto grado de autonomía en el laboratorio por encima de mis expectativas. Agradezco la oportunidad y la confianza puesta en mí. Por otro lado, la realización del TFG me ha permitido adquirir conocimientos sobre la enología y sobre el tratamiento de datos.

## Anexos



**Anexo Figura 1.** Visualización en gel de agarosa correspondiente a los amplicones de la PCR realizada para la caracterización de levaduras basada en el análisis RFLP-PCR (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

**ANNEX 2**

**FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG**

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Maite Los Arcos Senosiain \_\_\_\_\_

Nom i Cognoms del Tutor/a: Cristina Reguant Miranda \_\_\_\_\_

Data de la entrevista amb l'alumne: S'han realitzat diverses entrevistes al llarg de la realització del treball

Recomanacions durant el seguiment: S'ha realitzat el seguiment del treball de laboratori i de la redacció de la memòria escrita, donant indicacions a l'estudiant sobre els continguts, representació i anàlisi de dades i format.

Observacions: L'estudiant ha realitzat les modificacions que se li han indicat i ha seguit les recomanacions correctament.

Observacions Darrera revisió:

L'estudiant ha seguit les indicacions de la tutora satisfactòriament.

Signatura del Tutor/a



Cristina Reguant  
Miranda - DNI  
39882121Y  
(TCAT)  
2022.05.20  
11:31:02 +02'00'

Signatura del Alumne/a



Tarragona a 20 de maig 2022