



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

**CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS ENOLÓGICOS Y
LEVADURAS COMERCIALES E INACTIVACIÓN DE LEVADURAS
VÍNICAS**

Carmen Valero Llopico

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGIA

Tutor académico: Nicolas Rozès, Profesor Titular de Universidad, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, nicolasrozes@urv.cat

En cooperación con: Grupo de Biotecnología Microbiana de los Alimentos, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, URV

Supervisor: Nicolas Rozès, Profesor Titular de Universidad, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, nicolasrozes@urv.cat

Junio de 2020

Yo, Carmen Valero Llopico, con DNI 53787339E, soy conocedora de la guía de prevención de plagio a la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 8 de junio de 2020

Carmen

ÍNDICE

Datos del centro.....	3
Resumen	4
1. Introducción	5
1.1. Productos enológicos comerciales.....	5
1.2. Las levaduras secas inactivas.....	6
1.3. Inactivación térmica de levaduras e influencia del pH	7
1.4. Principales aplicaciones de los productos enológicos comerciales durante la vinificación.....	7
1.5. Caracterización de productos enológicos y levaduras comerciales	10
2. Hipótesis.....	13
3. Objetivos.....	13
4. Materiales y métodos.....	14
4.1. Productos enológicos y cepas de levaduras	14
4.2. Análisis de los ácidos grasos, esteroides y metaboloma.....	16
4.3. Determinación del nitrógeno amínico excepto la prolina (NOPA)	18
4.4. Análisis estadístico	20
4.5. Inactivación de levaduras.....	20
5. Resultados y discusión	21
5.1. Caracterización de productos enológicos y levaduras comerciales	21
5.2. Inactivación de levaduras.....	33
6. Conclusiones y perspectivas futuras.....	36
7. Bibliografía.....	38
8. Autoevaluación	41
9. Anexos.....	42
9.1. Anexo 1. Tablas medias LS	42
9.2. Anexo 2. Aminoácidos	44
9.3. Anexo 3. Fichas técnicas de los productos enológicos y levaduras utilizadas	45

DATOS DEL CENTRO

Este trabajo final del grado de biotecnología fue realizado durante mi estancia en el Grupo de Biotecnología Microbiana de los Alimentos (BMA), dirigido por Nicolas Rozès. Este grupo forma parte del Departamento de Bioquímica y Biotecnología, ubicado en la Facultad de Enología, formando parte del Campus Sescelades de la Universitat Rovira i Virgili.

El grupo tiene diversas vías de investigación relacionadas con el análisis y control de microorganismos de interés en el sector de la industria alimentaria, principalmente en la respuesta al estrés de las levaduras vínicas durante el secado, la fermentación alcohólica del mosto o la segunda fermentación del vino para elaborar vinos espumosos. Las principales líneas de investigación son las siguientes:

- Fermentación a baja temperatura. Segunda fermentación y paradas en las fermentaciones.
- Composición lipídica de las levaduras vínicas. Deshidratación y rehidratación de las levaduras vínicas.
- Utilización de levaduras no-*Saccharomyces*.
- Identificación y tipificación de bacterias acéticas, lácticas y levaduras en alimentos.
- Elaboración de vinagres, aceitunas de mesa y vinos tranquilos y espumosos.

RESUMEN

Hoy en día, la mayoría de los productos enológicos comerciales son derivados de levaduras inactivas y son utilizados en la industria enológica para mejorar los procesos tecnológicos o las características organolépticas de los vinos. Son comercializados por numerosas compañías biotecnológicas y/o enológicas bajo el nombre de diferentes marcas, pero la información en relación a su uso y su acción concreta es muy escasa. Por ello, se tomaron diversos productos enológicos y levaduras comerciales y se llevó a cabo la caracterización del perfil lipídico (esteroles y ácidos grasos) y metabólico, mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas. También se analizó la fracción de nitrógeno amínico libre mediante la derivatización de los α -aminoácidos con un reactivo (o-ftalaldehído/N-acetil-L-cisteína, (OPA/NAC)). Con este estudio se comprobó si los productos diferían los unos de los otros y si proveían del mismo género o especie de levaduras, o si las diferencias se debían a cambios en las condiciones de cultivo de las levaduras. Finalmente, se comprobó que los productos enológicos estudiados son elaborados a partir de una o varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de cultivo (medio, oxígeno, temperatura, etc.) diferentes, o no.

Se desarrolló también un método para inactivar levaduras comerciales *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (*Metschnikowia pulcherrima*) en función del pH y de la temperatura. Los resultados mostraron que el pH no era un método válido para inactivar la levadura *Saccharomyces*, la cual necesitaba altas temperaturas (80 – 90°C) para su inactivación y la levadura no-*Saccharomyces* presentó inactivación óptima tanto con el pH como con la temperatura (70°C).

Palabras clave: productos enológicos, levaduras vínicas, caracterización, inactivación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRODUCTOS ENOLÓGICOS COMERCIALES

En general, está reconocido que algunas técnicas de vinificación basadas en el envejecimiento del vino con lías pueden mejorar la calidad y las propiedades organolépticas del vino (estabilidad del color y prevenir la degradación de aromas). La razón principal de esta mejora son los compuestos liberados durante la autólisis de la levadura, principalmente péptidos, aminoácidos, esteroides y polisacáridos (manoproteínas). Sin embargo, este método de vinificación es bastante lento, por lo cual, no está exento de riesgo microbiológico. Por esto, en los últimos años, los productos enológicos comerciales han sido utilizados ampliamente en la industria enológica para mejorar los procesos tecnológicos o las características sensoriales de los vinos. Estos productos se obtienen principalmente de la levadura enológica *Saccharomyces cerevisiae* tras su inactivación térmica o enzimática, después de su crecimiento en medios concentrados y ricos en azúcares. Según los diferentes métodos de producción, los productos pueden dividirse en: levaduras inactivas, levaduras autolizadas, cortezas o paredes de levaduras y extractos de levadura.

Las manoproteínas son el componente principal de la pared de *S. cerevisiae* (25 – 50% de peso seco) y han sido ampliamente estudiadas para mejorar la producción del vino y sus características sensoriales. La Unión Europea ha aprobado su uso como aditivo enológico en el proceso de elaboración del vino (Reglamento (UE) nº 2165/2005, 20 de diciembre de 2005). También está autorizado el uso de productos conocidos como “cortezas o paredes de levaduras” (Reglamento (CE) nº 479/2008, 29 de abril de 2008) y en la actualidad diversos productos se comercializan según esta clasificación.

Otro tipo de productos comercializados a base de levaduras inactivas son preparados de composición muy variable, que generalmente incorporan levaduras inactivas y metabolitos procedentes de la autólisis (proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos). Las concentraciones de estos pueden variar por las condiciones de cultivo y además, también suelen contener paredes de levaduras, vitaminas y minerales.

Estos preparados son comercializados por numerosas compañías biotecnológicas y/o enológicas bajo el nombre de diferentes marcas, que afirman aportar diferentes mejoras en la calidad de los vinos. Sin embargo, la información en relación a su uso y su acción concreta es todavía muy escasa. Esto puede causar confusión en los productores sobre qué producto es más adecuado para un problema en particular o sobre los mecanismos que implican mejoras en las propiedades sensoriales del vino. Por tanto, es necesario realizar

estudio científicos para caracterizar estos productos y los cambios que estas preparaciones inducen en los vinos y así establecer mejores criterios para su uso enológico (Pozo-Bayón et al., 2009).

1.2. LAS LEVADURAS SECAS INACTIVAS

Para la obtención de estos productos se parte normalmente de una cepa de levadura vínica *S. cerevisiae*, la cual se hace crecer en un medio rico en azúcares y en condiciones aeróbicas en grandes fermentadores. A continuación, la levadura se concentra y se lava en centrifugadoras para eliminar el azúcar residual, obteniendo así una masa de levadura viscosa y cremosa.

Posteriormente, se lleva a cabo la lisis de las células, donde se produce la degradación de los componentes celulares por la activación de las propias enzimas hidrolíticas de la levadura (bajo condiciones de temperatura y pH óptimos). Para acelerar la disrupción celular se utilizan métodos químicos y bioquímicos que actúan por digestión de la pared celular por enzimas hidrolíticas, induciendo el choque osmótico o precipitando proteínas de la pared celular (Takaloo et al., 2020). Estos métodos se dividen principalmente en hidrólisis y plasmólisis. La plasmólisis se basa en el uso de sales inorgánicas como (cloruro de sodio) o solventes orgánicos (tolueno y etanol). Por otro lado, la hidrólisis ácida/alcalina y enzimática, se basa en un tratamiento con ácido clorhídrico (HCl)/ hidróxido de sodio (NaOH) o enzimas proteolíticas.

Tras la autólisis se pueden obtener tres tipos de productos: autolizados, extractos y cortezas de levadura (Comuzzo et al., 2007). Los autolizados se obtienen tras el secado de todo el lisado, y por tanto, están formados por una fracción soluble, compuesta por la degradación total del contenido citoplasmático (aminoácidos, péptidos, etc.) y una fracción insoluble formada por las paredes y membranas plasmáticas de la levadura. Para obtener los otros productos se lleva a cabo la centrifugación del lisado. La parte soluble, corresponde a los extractos de levadura y la fracción insoluble que se obtiene, corresponde a las cortezas de levaduras. El secado de estos productos se lleva a cabo mediante *roller drying* o *spray-drying* y se comercializan en forma de polvo para que sean fácilmente dosificables en el vino.

Otros productos enológicos como las manoproteínas de levaduras comerciales, se obtienen por tratamientos físico-químicos y/o enzimáticos de las paredes celulares y de las levaduras enteras. Este grupo de preparados tiene una amplia heterogeneidad en relación a su estructura y composición por los procesos empleados.

Algunos de los productos, también incluyen en su composición levaduras inactivas, las cuales se obtienen por inactivación térmica en la que se destruyen las enzimas que intervienen en procesos de autólisis, evitando así este proceso y por tanto, no se produce la degradación de los componentes celulares (Andújar Ortiz, 2011).

1.3. INACTIVACIÓN TÉRMICA DE LEVADURAS E INFLUENCIA DEL PH

Las altas temperaturas pueden producir la inactivación de las levaduras al provocar daños en el sistema reproductivo o en el citoplasma de las mismas. En este último caso, su efecto podría deberse a la coagulación de proteínas, inactivación de enzimas o ruptura de lípidos celulares. La causa determinante de la velocidad de muerte de los organismos celulares no se conoce hoy en día con seguridad, pero existe correlación entre parámetros termodinámicos que relacionan la muerte térmica con la desnaturalización de proteínas y otros biopolímeros como el DNA y el RNA (Cerrutti, 1988).

El pH es uno de los factores más variables del vino, variando entre 2'8 y 4'2 aproximadamente. Las levaduras vínicas soportan un pH entre 3 y 4. Por debajo de 3, su acción disminuirá o incluso se anulará y, por encima de 4, su actividad aumentará. Ante cambios significativos en el pH del medio, los microorganismos ponen en acción mecanismos para mantener la homeostasis en el interior de las células. Las levaduras pueden mantener un pH intracelular constante gracias a que los protones no pueden difundir libremente a través de las envolturas celulares. Sin embargo, en la práctica, el pH pocas veces puede utilizarse como único agente conservante y se utiliza normalmente en combinación con otros factores como la temperatura para inactivar microorganismos.

El pH del medio de calentamiento y el tipo de ácido empleado pueden afectar a la velocidad de inactivación térmica en mohos y levaduras. La influencia del pH normalmente decrece al aumentar la temperatura, resultando su efecto despreciable en células vegetativas termosensibles a temperaturas superiores a los 65°C (Cerrutti, 1988). Aun así, en las levaduras vínicas podría utilizarse el efecto del pH para inactivarlas y reducir el efecto térmico.

1.4. PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS PRODUCTOS ENOLÓGICOS COMERCIALES DURANTE LA VINIFICACIÓN

1.4.1. Efecto en la fermentación

El uso de estos productos para mejorar la fermentación del vino se basa en dos mecanismos. Uno es el efecto protector de estos productos durante la rehidratación de las

levaduras secas-activas (LSA), y el otro está relacionado con su capacidad de estimular la fermentación alcohólica y maloláctica al utilizarse como nutrientes durante la fermentación.

Durante la rehidratación, las levaduras pueden experimentar modificaciones bioquímicas y cambios estructurales que pueden ocasionar daños en la membrana celular. Para repararlos, estos preparados pueden liberar fracciones insolubles de la pared de la levadura en el medio, que pueden formar grupos de esteroides similares a micelas que disminuyen la tensión superficial al actuar como bioemulsificadores y pueden ser incorporados en las membranas de las LSA (Soubeyrand et al., 2005). Además, estudios (Caridi, 2002; Caridi et al., 1999) suponen que los esteroides y ácidos grasos poliinsaturados que liberan estos productos pueden reducir el choque osmótico que sufre la levadura por la alta concentración de azúcares en el mosto, actuando por tanto, como agentes protectores y adaptando el metabolismo a estas nuevas condiciones. Este argumento ha sido utilizado también en productos enológicos como "Go-Ferm Protect" (Lallemand) el cual indica en su hoja técnica (Anexo 3) ser un producto rico en esteroides específicos y ácidos grasos poliinsaturados que refuerzan la membrana de la levadura ante las condiciones de estrés durante la fermentación.

La aplicación más común de este tipo de productos es su uso como activadores de la fermentación alcohólica y maloláctica, ya que permiten corregir las carencias nutricionales y por tanto, promover el crecimiento de los microorganismos para así mejorar la fermentación. En medios deficientes en nitrógeno, estas preparaciones pueden liberar al medio una parte soluble formada por aminoácidos principalmente procedentes del citoplasma de la levadura que aumentan la tasa de fermentación. Una de estas preparaciones es "Nutrient Vit" (Lallemand) (Anexo 3), la cual incluye sales de amonio (nitrógeno inorgánico) y aminoácidos (nitrógeno orgánico), además de vitaminas y minerales para evitar paradas en la fermentación.

Por otro lado, en mostos no deficientes en nitrógeno, la fracción insoluble de los productos puede mejorar la eficiencia de la fermentación por el efecto desintoxicante de las paredes de las levaduras, que pueden absorber metabolitos tóxicos como ácidos grasos de cadena corta y media, que se asocian con fermentaciones lentas o paradas en esta (Andújar-Ortiz et al., 2010). Se comercializan como "Oenolees" (Laffort), "Cortezas de levaduras" (Biospringer) o "Nutriferm Advance" (Enartis), y en sus descripciones indican su acción sobre la eliminación o prevención de sustancias tóxicas (Anexo 3).

Otra razón del aumento en la eficacia de la fermentación tras la adición de estas preparaciones se debe al elevado contenido de esteroides en las mismas. Estos aumentan la permeabilidad de la membrana, mejorando el intercambio de sustancias entre la célula y el

medio (Larue et al., 1980). Además, las levaduras autolizadas suplementan los mostos con ácidos grasos de cadena larga, reduciendo el daño en la membrana de las levaduras y mejorando el transporte de membrana, el cual puede dificultarse por la elevada cantidad de etanol en el medio (González-Marco et al., 2006).

1.4.2. Efecto en la composición y en las características organolépticas de los vinos

El efecto de estos productos en las características sensoriales de los vinos ha despertado un gran interés, pero los mecanismos de acción no están perfectamente detallados.

Existen productos como “Glutastar” o “OptiMUM White” de la casa comercial Lallemand, formados por levaduras inactivas específicas ricas en glutatión, indicados para disminuir fenómenos oxidativos y así proteger el color de los vinos blancos (Anexo 3). El glutatión (GSH) es un tripéptido intracelular no proteico (L- γ -glutamil-L-cisteinil glicina) que actúa como tampón redox en mecanismos de estrés y mantenimiento de la integridad celular. La eficacia de estos productos no ha sido probada, pero se ha comprobado que la adición de GSH antes del embotellado reduce la oxidación, preservando el color y compuestos aromáticos y disminuye la formación de compuestos negativos para el aroma (Lavigne-Cruege et al., 2003).

La estabilidad del color de los vinos tintos depende en parte de los pigmentos tanino-antocianina o antocianina-antocianina. Para incrementar esta estabilidad puede enriquecerse el medio con polisacáridos que pueden actuar como coloides protectores y prevenir la agregación y precipitación de los pigmentos (Escot et al., 2008). Sin embargo, el empleo de productos ricos en polisacáridos destinados a este fin, como “OptiMUM Red” “Booster Rouge” o “Noblesse” de la casa comercial Lallemand (Anexo 3), todavía no ha sido estudiado ampliamente.

Por otro lado, también se ha relacionado la capacidad de los polisacáridos de la levadura (principalmente manoproteínas) de reducir la astringencia de vinos tintos por su capacidad de interactuar con las procianidinas y evitar que interactúen con las proteínas de la saliva (Smith & Noble, 1998).

1.5. CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS ENOLÓGICOS Y LEVADURAS COMERCIALES

1.5.1. Caracterización del perfil lipídico (ácidos grasos y esteroides)

Con el desarrollo de técnicas de espectrometría de masas se pueden diferenciar y clasificar microorganismos mediante la determinación de marcadores químicos como lípidos, proteínas u otros constituyentes celulares. El análisis del perfil lipídico mediante cromatografía de gases permite la identificación y cuantificación de esteroides y ácidos grasos.

La membrana plasmática de las levaduras está formada principalmente por lípidos (fosfolípidos y esteroides principalmente, aunque en menor proporción también tienen esfingolípidos y glicerolípidos) y proteínas.

Algunos factores ambientales (temperatura o presencia de oxígeno), tasa de crecimiento o la presencia de esteroides pueden alterar la composición de las bicapas lipídicas y/o la composición de los ácidos grasos insaturados durante la fermentación alcohólica. Estas modificaciones pueden disminuir la permeabilidad de la membrana, alterar el transporte selectivo de aminoácidos y azúcares, disminuir la resistencia al etanol y en general disminuir la actividad de la levadura.

Los esteroides son esenciales en la construcción y mantenimiento de las membranas eucariotas regulando la permeabilidad y fluidez de estas, y controlando la resistencia al etanol y la actividad ATPasa, siendo el ergosterol el principal esteroide de las membranas de las levaduras (Hidalgo Togados, 2011).

Los ácidos grasos y su grado de insaturación tienen un papel esencial en la fluidez de la membrana. El ácido oleico (C18:1), palmitoléico (C16:1), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) son los principales ácidos grasos de las membranas celulares. *S. cerevisiae* puede sintetizar ácidos grasos saturados y monoinsaturados desde 14 hasta 18 átomos de carbono, pero no puede sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Cuanto menos insaturaciones y mayor longitud de cadena, la membrana es más compacta y ordenada a temperatura baja (temperatura por debajo de la temperatura óptima de crecimiento). Por el contrario, a mayor insaturación del ácido graso, más fluida es la membrana y más fácil es que se adapte a una alta concentración de etanol o a bajas temperaturas (Díaz-Hellín et al., 2014).

En condiciones de anaerobiosis durante la fermentación alcohólica, caso de la vinificación en blanco, se inhibe la síntesis de esteroides y la desaturación de los ácidos

grasos, dificultando la actividad de la levadura y la adaptación a los cambios en el medio que pueden llegar a ocasionar paradas en la fermentación.

Estos problemas pueden solucionarse mediante la adición al medio de fermentación de productos enológicos comerciales ricos en ácidos grasos insaturados y esteroides que pueden aumentar la capacidad de fermentación y el consumo de azúcares al ser asimilados por las levaduras e incorporarse a las membranas.

1.5.2. Caracterización del perfil metabólico

En el caso del metaboloma, su estudio permite identificar y cuantificar metabolitos extracelulares e intracelulares con una masa molecular inferior a 1000 Da (Villas Bôas et al., 2005). Algunos metabolitos identificados son la trehalosa, aminoácidos, fosfato, glicerol y ácidos orgánicos, los cuales tienen un papel fundamental para las levaduras.

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace glicosídico entre sus carbonos anoméricos. Las funciones que desempeña son diversas y dependientes del organismo. En las levaduras ejerce un papel como fuente de energía y tolerancia al estrés. El proceso de obtención de levaduras secas-activas se lleva a cabo en la fase estacionaria del crecimiento, cuando la levadura contiene mayor concentración de trehalosa (Novo et al., 2003). Esta aumenta la viabilidad frente a la desecación por el papel protector que ejerce ante la deshidratación al reemplazar las moléculas de agua de la bicapa lipídica para mantener la fluidez (Eleutherio et al., 2015).

Los aminoácidos son la fuente de nitrógeno asimilable más importante de la levadura. Durante la fermentación, la velocidad de esta dependerá de la calidad y cantidad de aminoácidos presentes en el mosto. Además, los aminoácidos son precursores de la síntesis de alcoholes superiores, aldehídos o ésteres, los cuales tienen un papel fundamental en el perfil aromático del vino. El contenido de aminoácidos de las uvas depende de varios factores como las condiciones climáticas, cultivo, tratamientos del suelo. En referencias bibliográficas como *Giraud et al.* (2006) estipulan que los aminoácidos libres determinados por técnicas cromatográficas son en orden descendente: prolina, alanina, arginina, isoleucina, cisteína y treonina.

El fosfato inorgánico es un nutriente esencial para todos los organismos ya que es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y otros metabolitos celulares implicados en procesos de fosforilación u obtención de energía.

En la fermentación alcohólica, un 8% de los azúcares se transforman en otros compuestos a través de una vía secundaria llamada glicero-pirúvica. El principal producto

de esta vía es el glicerol (Aranda et al., 2011). Se trata de un compuesto no volátil sin propiedades aromáticas que contribuye en la calidad del vino al proporcionar dulzor y cuerpo cuya concentración en el vino varía entre 5 a 20 g/L.

Los ácidos orgánicos junto a los azúcares, son los compuestos más importantes en la pulpa. Los ácidos más importantes son el tartárico, el málico y en menor proporción el cítrico. Influyen en la acidez de los vinos y en la sensación organoléptica (Aranda et al., 2011). Las bacterias lácticas son capaces de metabolizarlos, lo cual mejora las características sensoriales pero en el resto de casos, el desarrollo de estos metabolitos supone la formación de sustancias indeseables que pueden ocasionar enfermedades o alteraciones en los vinos.

1.5.3. Fracción de nitrógeno amínico

La fracción de nitrógeno amínico libre se determina mediante la derivatización de los α -aminoácidos con un reactivo (o-ftalaldehído/N-acetil-L-cisteína, (OPA/NAC)).

Los compuestos nitrogenados son utilizados por las levaduras para sintetizar las proteínas para su desarrollo y crecimiento (producción de biomasa) durante la fermentación alcohólica y para asegurar un número de células suficientes para consumir los azúcares del mosto. Además, la mayoría de fuentes nitrogenadas del mosto (amonio y aminoácidos) son a su vez precursores aromáticos de alcoholes y ésteres, determinando la calidad aromática del vino (Hidalgo Togores, 2011).

Dentro de estos compuestos, las levaduras toman aquellas sustancias más fácilmente asimilables, como el amonio y los α -aminoácidos. Sin embargo, los aminoácidos secundarios como la prolina y la hidroxiprolina no se metabolizan en gran medida en las condiciones habituales de vinificación. También pueden utilizarse péptidos de bajo peso molecular, pero no los de gran peso molecular, pero las proteínas de la uva no pueden utilizarse como fuente de nitrógeno, ya que carecen de una importante actividad proteolítica extracelular (Bell and Henschke, 2005). La fracción de nitrógeno que la levadura puede utilizar se denomina nitrógeno asimilable por la levadura (YAN). Se considera que la concentración en YAN tiene que ser superior a 140 mg N/L para que *Saccharomyces* pueda fermentar completamente el mosto de uva. Esta cantidad dependerá también de la concentración inicial en azúcares del mosto; más el contenido en azúcares del mosto será elevada, más YAN necesitará *Saccharomyces* para acabar sin problema la fermentación.

Generalmente el mosto contiene cantidades suficientes de compuestos nitrogenados asimilables para la realización de la fermentación alcohólica, pero en algunas ocasiones es

necesario añadir estas sustancias en forma de sales amoniacaes, como fosfato diamónico (DAP), sulfito amónico o disulfito amónico que se incluyen en estos productos enológicos.

Esta adición de sales amoniacaes también puede estar indicada en situaciones como en mostos ricos en azúcares que pueden resultar en una fermentación difícil por acumulación de sustancias tóxicas o impermeabilizantes en las paredes celulares de las levaduras, o bien para evitar la formación de compuestos azufrados de olor desagradable (Bell and Henschke, 2005). Sin embargo, la adición excesiva de nitrógeno inorgánico puede causar niveles excesivos de nitrógeno residual, produciendo inestabilidad microbiana y la formación excesiva de carbamato de etilo (Ough, 1991), sustancia limitada en algunas legislaciones por sus propiedades cancerígenas.

2. HIPÓTESIS

Como se ha comentado en la introducción, aunque los productos enológicos comerciales son de uso común en enología, la información sobre su composición y su acción concreta es muy escasa. La hipótesis principal de este proyecto es que la composición de cada producto enológico es diferente en función de su uso y que se elaboran a partir de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en condiciones de cultivo diferentes según el producto.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal es caracterizar el perfil lipídico (esteroles y ácidos grasos), metabolómico y en aminoácidos primarios (NOPA) de productos enológicos y levaduras comerciales. De este modo, se conocerá la composición de cada producto enológico y se comparará en relación a diferentes levaduras, entre ellas *S. cerevisiae*.

En un objetivo secundario se intentará poner a punto un método rápido y fácil de inactivación de células de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (*Metchnikowia pulcherrima*), levaduras comerciales, en función del pH y la temperatura, las cuales podrían utilizarse como productos enológicos en la fermentación

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. PRODUCTOS ENOLÓGICOS Y CEPAS DE LEVADURAS

Se han utilizado 17 productos enológicos y 4 cepas de levaduras. Todos los productos analizados son del año 2019 excepto tres. El producto Go-Ferm es del año 2015 y de los productos OptiMUM White y OptiMUM Red se han utilizado productos de 2015 y de 2019.

Tabla 1. Productos enológicos y cepas de levaduras utilizadas. La mayoría de estos pertenecen a la casa comercial Lallemand, aquellos que pertenecen a otras casas comerciales se indica en las respectivas tablas. En la tabla de nutrientes protectores se indican mediante puntos la concentración relativa de esteroides, aminoácidos y nitrógeno inorgánico de los productos (información proporcionada por la casa comercial Lallemand). Para más información sobre los productos y las levaduras ver (Anexo 3).

Producto	Descripción
Levaduras inactivas específicas	
OptiMUM White	Alta viabilidad y bio-disponibilidad en glutatión reducido y polisacáridos para elaborar vinos mejor protegidos frente a la oxidación.
OptiMUM Red	Alta concentración de polisacáridos parietales altamente reactivos desde el encubado para elaborar vinos estructurados.
Booster Rouge	Alta concentración de polisacáridos reactivos desde el encubado para elaborar vinos estructurados.
Noblesse	Polisacáridos y manoproteínas libres. Aporta volumen, redondez y dulzor en el vino.
Pure-Lees Longevity	Protección frente a la evolución por su alta capacidad para consumir oxígeno disuelto.
Glutastar (GSH+)	Garantiza los niveles de glutatión y protege frente a la oxidación.
Cortezas de levaduras	
Oenolees (Laffort)	Preparado específico de corteza de levadura para eliminar polifenoles relacionados con el amargor y la astringencia.
Cortezas de levaduras (Biospringer)	Estimulan la fermentación alcohólica actuando como factor de supervivencia de las levaduras por su capacidad de absorber sustancias tóxicas como el ácido decanoico.
Manoproteínas (Agrovin)	Polisacáridos altamente reactivos con los taninos del vino.
Nutriferm Advance (Enartis)	Preparado de cortezas de levaduras, fosfato de amonio y celulosa que previene la formación de olores anómalos y fermentaciones lentas o paradas de fermentación.

Producto	Esteroles	Aminoácidos	Nitrógeno inorgánico	Descripción
Nutrientes protectores de las levaduras				
Nutrient Vit	Nutriente de fermentación complejo que corrige las carencias específicas de los mostos con bajos niveles de nitrógeno fácilmente asimilable.
Nutrient Vit Nature	-	Autolizado de levadura que ayuda a obtener una fermentación más regular.
Go-Ferm	-	Protector durante la rehidratación de la levadura para mejorar su viabilidad favoreciendo el final de la fermentación.
Go-Ferm Protect	-	Protector de levadura para condiciones de estrés o difíciles.
Nutristart (Laffort)				Combinación de nutrientes para obtener una población de levaduras suficiente, completar la fermentación alcohólica y prevenir la formación de compuestos no deseables.

Levadura	Nombre	Descripción
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lalvin-QA23	Ofrece seguridad fermentativa y bajas exigencias en nitrógeno asimilable y oxígeno. Revela aromas cítricos en las variedades blancas aromáticas.
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Laktia	Produce ácido L-láctico, permitiendo obtener vinos con una acidez más elevada.
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Biodiva	Obtención de vinos con mayor complejidad aromática favoreciendo la percepción de ésteres.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Flavia	Incrementa la producción de aromas varietales (terpenos y tioles volátiles).

4.2. ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS, ESTEROLES Y METABOLOMA

4.2.1. Procedimiento de extracción

En todos los casos se utilizó el mismo protocolo de extracción en los productos enológicos y en las levaduras secas-activas.

Ácidos grasos. Se siguió una versión modificada del método descrito por *Borrull et al.* (2016) en el cual se determinan los ácidos grasos totales de las células de levaduras, incluyendo los ácidos grasos libres y los esterificados. En un tubo de cristal con un pellet de $1 \cdot 10^8$ células (aproximadamente unos 10 mg de producto), se añadieron 1 mL de HCl (Panreac, Barcelona, España) 1.25 N en metanol y 10 μ L de ácido heptanóico (C7, 1 g/L y ácido heptadecanoico, C17, 4 g/L) (Sigma) utilizado como estándar interno. Se agitó cuidadosamente con el vórtex y se calentaron las muestras en el baño seco (Fisher Bioblock Scientific) a 90°C durante 60 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se añadió 1 mL de agua desionizada y 300 μ L de hexano (Panreac). Se centrifugó a 3000 x g durante 5 min y se recuperó la fase superior orgánica en un microtubo Eppendorf. Finalmente, se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto y se introdujeron las muestras (ca 200 μ L) en los insertos dentro los viales.

Esteroles. Siguiendo el procedimiento descrito por *Quail & Kelly* (1996) a partir de una muestra de $1 \cdot 10^8$ células (aproximadamente unos 10 mg de producto) se añadió para resuspender 1.5 mL de metanol (Sigma) en tubos de cristal. A continuación, se añadieron 1 mL de pirogalol (0,5%, w/v, Sigma) en metanol, 1 mL de KOH (60%, w/v, Panreac) en agua desionizada y 10 μ L de α -colestano (1 g/L, estándar interno, Sigma). Se agitó cuidadosamente con el vórtex y se calentaron las muestras al baño seco (Fisher Bioblock Scientific) 2 horas a 90°C. Una vez las muestras estuvieron a temperatura ambiente se añadió 500 μ L de hexano y se centrifugaron los tubos durante 2 minutos a 3000 x g. Después de esto se recuperó la fase orgánica en microtubos Eppendorf y se secaron en el sistema de vacío de velocidad SC110 (Savant Instruments) durante 15 minutos. Se resuspendieron las muestras con 100 μ L de hexano, se agitó con el vórtex y se introdujeron las muestras (ca 200 μ L) en los insertos dentro los viales.

Metaboloma. Siguiendo el procedimiento descrito por *López-Martínez et al.* (2014) se tomó en un microtubo Eppendorf (Eppendorf Ibérica, Barcelona, España) un pellet de $1 \cdot 10^8$ células (aproximadamente unos 10 mg de producto). Se añadieron 10 μ L de ribitol (1 mg/mL, Sigma, Barcelona, España) utilizado como estándar interno, 200 μ L de agua desionizada y 200 μ L de metanol (Sigma). Se agitó cuidadosamente con el vórtex y se calentaron las muestras en el baño seco (Fisher Bioblock Scientific, Aubagne, Francia) a

90°C durante 5 minutos. Después de enfriar las muestras a temperatura ambiente se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos y se recuperó la fase superior acuosa en un microtubo Eppendorf. A continuación, las muestras se secaron en el sistema de vacío de velocidad SC110 (Savant Instruments, EEUU) durante 90 minutos. El residuo seco se redisolvió y derivó primero en 40 µL de metoxilamina en piridina (20 mg/mL, Sigma) durante 30 min a 70°C en el baño seco (Fisher Bioblock Scientific) y después con 60 µL de *N*-metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA, Sigma) durante 30 min a 70°C en el baño seco (Fisher Bioblock Scientific). Finalmente se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto y se introdujeron las muestras (ca 200 µL) en los insertos dentro los viales.

4.2.2. Análisis de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)

La cromatografía de gases (GC) se realizó utilizando un sistema de GC 6890N de Agilent Technologies Network conectado a un ordenadora HP con el software ChemStation (Agilent Technologies). Los componentes son analizados e identificados utilizando un detector selectivo de masas inerte (MSD, modelo 5975, Agilent Technologies).

Ácidos grasos. Se inyectó 2 µL de muestra en el modo pulsado sin división (*Splitless*, 0.75 min) en el mismo dispositivo y columna que se ha descrito anteriormente. Como gas portador se utilizó el helio con un flujo constante de 1.2 mL/min. El programa de temperatura pasó de 100°C a 240°C (5 min) a 4°C/min. La temperatura del inyector y del detector eran 220°C y 250°C, respectivamente. La abundancia relativa de cada compuesto identificado se calculó según las respectivas alturas de los picos cromatográficos después de la normalización con la altura del pico correspondiente al estándar interno (C7 o C17). Los metabolitos se identificaron utilizando las bibliotecas internas de MS y NIST 2005.

Esteroles. Se inyectó 2 µL de muestra en el modo pulsado sin división (*Splitless*, 70 psi, 0.10 min) en el mismo dispositivo y columna que se ha descrito anteriormente. La temperatura del inyector eran 300°C. La temperatura del horno de la columna se mantuvo inicialmente a 160°C durante 1 minuto y luego aumentó primero a 260°C con una velocidad de 50°C/min y luego a 320°C con una velocidad de 4°C/min, donde se mantuvo durante 1 minuto. El helio se utilizó como gas portador con un flujo constante de 1.4 mL/min. La temperatura de transferencia del MSD era de 300°C. El cuádruplo de MSD y la temperatura de la fuente se mantuvieron a 150°C y 280°C, respectivamente. La abundancia relativa de cada compuesto identificado se calculó según las respectivas alturas de los picos cromatográficos después de la normalización con la altura del pico correspondiente al estándar interno (α -colestano). Los metabolitos se identificaron utilizando las bibliotecas internas de MS y NIST 2005.

Metaboloma. Se inyectó 2 μ L de muestra con una relación de separación (modo de inyección *Split*) 20:1 con un inyector automático (7683B, Agilent Technologies). Se utilizó el helio como gas portador en un flujo constante de 1.0 mL/min. La temperatura del inyector era 200°C. La temperatura del horno de la columna se mantuvo inicialmente a 80°C durante 4 min y luego aumentó primero a 200°C con una velocidad de 5°C/min y luego a 300°C a una tasa de 25°C/min, donde se mantuvo durante 7 min. La temperatura de transferencia del MSD era de 300°C. El cuádruplo de MSD y la temperatura de la fuente se mantuvieron a 180°C y 280°C, respectivamente. Los datos del MSD se adquirieron en modo de escaneo de ionización electrónica a 70 eV dentro del rango de 35-650 amu después de un retraso del solvente de 3 min. La abundancia relativa de cada compuesto identificado se calculó según las respectivas alturas de los picos cromatográficos corregidas con respecto a la altura del pico del estándar interno (Ribitol). Los metabolitos se identificaron utilizando las bibliotecas internas de MS y NIST 2005.

4.3. DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO AMÍNICO EXCEPTO LA PROLINA (NOPA)

Para medir la fracción de nitrógeno amínico (NOPA) se llevó a cabo la derivatización de grupos amino primarios con un reactivo (o-ftalaldehído/N-acetil-L-cisteína, (OPA/NAC)).

4.3.1. Preparación de reactivos OPA/NAC

Para la preparación de las soluciones reactivas se siguió el procedimiento descrito por Dukes y Butzke (1998). Estas soluciones se almacenan en un refrigerador durante un período máximo de dos semanas y al utilizarse, deben de estar a temperatura ambiente.

Solución de reactivo A. Se disolvieron 0.671 g de OPA (Sigma) con etanol (Panreac) al 95% en un volumen final de 100 mL. Esta solución se añadió a un matraz con una solución acuosa de 3.837 g/L de NaOH (Panreac), 8.468 g/L de ácido bórico (Panreac) y 0.816 g/L de NAC (Sigma). La solución se calculó para un volumen de 1 L con agua destilada.

Solución de reactivo B. Se añadieron 100 mL de etanol al 95% de vol a una solución acuosa de 3.837 g/L de NaOH, 8.468 g/L de ácido bórico y 0.816 g/L de NAC. La solución se calculó para un volumen de 1 L con agua destilada.

Se preparó también una solución estándar de isoleucina (Sigma) de 10 mM en agua destilada.

4.3.2. Recta de calibración

Con la solución estándar de isoleucina se realizó una recta de calibración que oscilaba entre los 2 y 10 mM de isoleucina, que corresponde a 28-140 mg de nitrógeno/L. Se preparó según se muestra en la Tabla 2.

La absorbancia de las muestras se midió después de 10 minutos a 335 nm con un espectrofotómetro Thermospectronic Genesys 10 UV (Pracisa + Giral, Madrid, España).

Tabla 2. Recta de calibración

Tubo	Blanco	1	2	3	4	5
10 mM Ile (μ L)	0	10	20	30	40	50
Agua (μ L)	50	40	30	20	10	0
Solución A (mL)	3	3	3	3	3	3
Nitrógeno (mg/L)	0	28	56	84	112	140

4.3.3. Análisis de las muestras

Para llevar a cabo el análisis del NOPA de los productos enológicos y de las levaduras se tomó una muestra de aproximadamente $1 \cdot 10^8$ células (10 mg) y se añadió a un microtubo Eppendorf con 1 mL de agua.

En el caso de las levaduras se rehidrataron durante 10 min a 70°C en el baño seco (Fisher Bioblock Scientific). Para el análisis se tomaron muestras de 100 μ L para que la concentración de nitrógeno se situara dentro del rango de la recta de calibración.

Muestra. Se pipetearon 50 μ L de muestra en una cubeta de acrilato de metilo o cuarzo de grado UV estándar (Fisher Scientific). En algunos productos fue necesaria una dilución de la muestra para que la concentración de nitrógeno se situara dentro del rango de la recta de calibración. Se añadieron 3 mL del reactivo A, se cubrió con cinta (Parafilm) y se homogeneizó. A los 10 minutos se midió la absorbancia a 335 nm.

Blanco de la muestra. Se pipetearon 50 μ L de muestra (diluida si era necesario) en una cubeta. Se añadieron 3 mL del reactivo B, se cubrió con cinta (Parafilm) y se homogeneizó. A los 10 minutos se midió la absorbancia a 335 nm.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada producto enológico y cepa de levadura fue analizado por tres muestras biológicas independientes. El ANOVA (Diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey) y el Análisis de Componentes Principales (PCA) se llevaron a cabo con el paquete de software XLSTAT 2019.4.2 con un nivel de significación de $p < 0.05$ (Addinsoft, USA).

4.5. INACTIVACIÓN DE LEVADURAS

La inactivación se estudió en función de la temperatura y el pH en diferentes tiempos en las levaduras QA23 (*Saccharomyces cerevisiae*) y Flavia (*Metschnikowia pulcherrima*). Los inóculos se prepararon rehidratando $5 \cdot 10^9$ células (500 mg) de las levaduras secas-activas (LSA) durante 30 min a 37°C (QA23) o 30°C (Flavia).

Medio YPDA: 20 g/L de glucosa (Panreac), 20 g/L de peptona (Panreac), 10 g/L de extracto de levadura (Panreac) y 20 g/L de agar (Panreac).

Preparación soluciones pH 1 y pH2. Se prepararon soluciones de un volumen final de 40 mL. Para el pH 1 se preparó una solución de 600 μ L de HCl (12 N, Panreac) y para el pH 2 una solución de 130 μ L de HCl (12 N, Panreac). Se comprobaron los pHs finales con un pH-metro (Crison Instruments, Barcelona, España) y se obtuvo para la solución de pH 1 un valor de pH 1.04 y para la solución de pH 2 un valor de pH 2.06.

4.5.1. Inactivación por pH

Una vez rehidratadas las células se pipetearon 500 μ L y se añadió 4,5 mL de la solución de pH correspondiente en un tubo de cristal. Se sembraron 50 μ L de diluciones decimales seriadas de esta solución en placas de YPDA a diferentes tiempos (10 min, 30 min y 60 min) y se incubó durante 1 o 2 días a 28°C en condiciones aeróbicas. Cada levadura fue analizada por tres muestras biológicas independientes en cada una de las condiciones estudiadas

4.5.2. Inactivación por temperatura

Una vez rehidratadas las células se pipetearon 500 μ L y se añadió 4,5 mL de agua en un tubo de cristal. Las muestras se calentaron en el baño seco (Fisher Bioblock Scientific) a la temperatura de estudio (desde 60 hasta 90°C para QA23 y desde 50 hasta 70°C para Flavia). Se sembraron 50 μ L de diluciones decimales seriadas de esta solución en placas de YPDA a diferentes tiempos (10 min, 30 min y 60 min) y se incubó durante 1 o 2 días a 28°C en condiciones aeróbicas. Cada levadura fue analizada por tres muestras biológicas independientes en cada una de las condiciones estudiadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS ENOLÓGICOS Y LEVADURAS COMERCIALES

Para su análisis los productos se organizaron en diferentes grupos según su función.

Tabla 3. Clasificación de los productos enológicos y levaduras comerciales para el análisis de los resultados.

Grupo	Productos
Optimizadores de la fermentación	OptiMUM White, OptiMUM Red, Booster Rouge, OptiMUM White (2015), OptiMUM Red (2015)
Protectores del vino	Glutastar, Oenolees, Noblesse, Pure-Lees Longevity, Manoproteínas
Nutrientes	Nutrient Vit, Nutriferm Advance, Nutristart, Nutrient Vit Nature
Protectores de las levaduras	Go-Ferm, Go-Ferm Protect, Cortezas de levaduras
Levaduras	QA23, Flavia, Biodiva Laktia

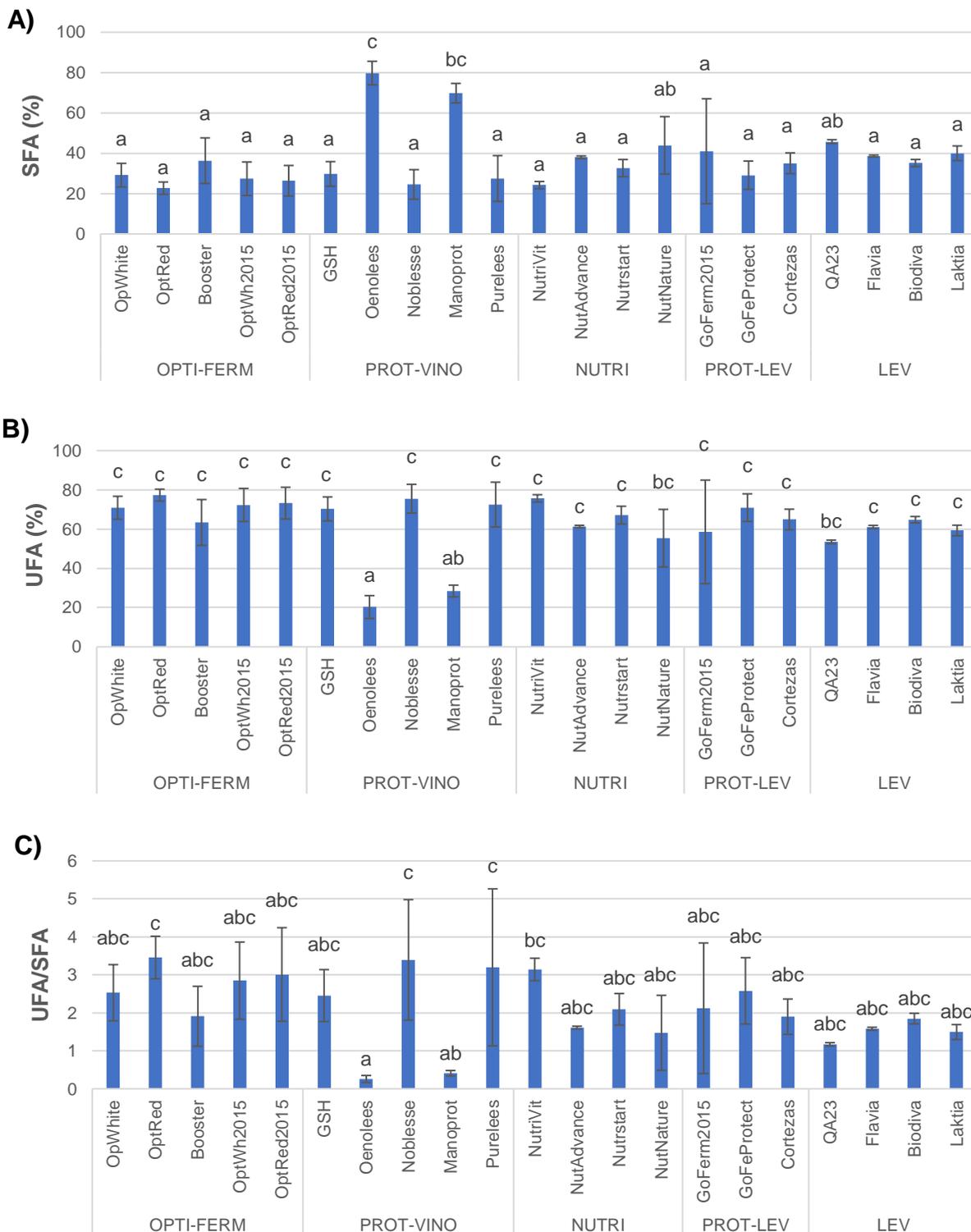
5.1.1. Análisis de los ácidos grasos

Los ácidos grasos identificados por GC-MS fueron ácidos grasos insaturados (UFAs) y ácidos grasos saturados (SFAs) de diferente longitud de cadena (Anexo 1, Tabla A1). Además también se estudió la relación entre estos dos grupos (UFA/SFA) y el grado de insaturación. El grado de insaturación se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Grado de insaturación} = (\text{C14:1} + \text{C16:1} + \text{C18:1}) * (2 * \text{C18:2}) / \text{UFA}$$

Como se observó en la Figura 1, la composición en UFA fue mayor que la de SFA tanto para los diferentes productos como en el caso de las levaduras. Estos resultados coinciden con la composición típica de una levadura como *S. cerevisiae*, la cual presenta mayor porcentaje de UFAs, principalmente ácido palmitoléico (C16:1) y ácido oleico (C18:1) y menor porcentaje de SFAs, los cuales son principalmente el ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) (Díaz-Hellín et al., 2014). La relación entre UFA/SFA (Fig. 1C) fue mayor en los productos (excepto Oenolees y Manoproteínas) que en las levaduras, lo cual puede relacionarse con la importancia de los ácidos grasos insaturados en la fluidez de la membrana y que sería incrementada con la adición de estos productos. En general, los productos, independientemente de su función presentaron un perfil en ácidos grasos muy similar.

En relación al grado de insaturación (Fig. 1D) se observó cómo en los productos se situó alrededor de 1 y, sin embargo, en el caso de las levaduras aumentó hasta el 1,5. Este aumento se debe a una mayor proporción de ácido linoleico (C18:2) en las levaduras, excepto en la QA23 (*S. cerevisiae*) la cual no puede sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).



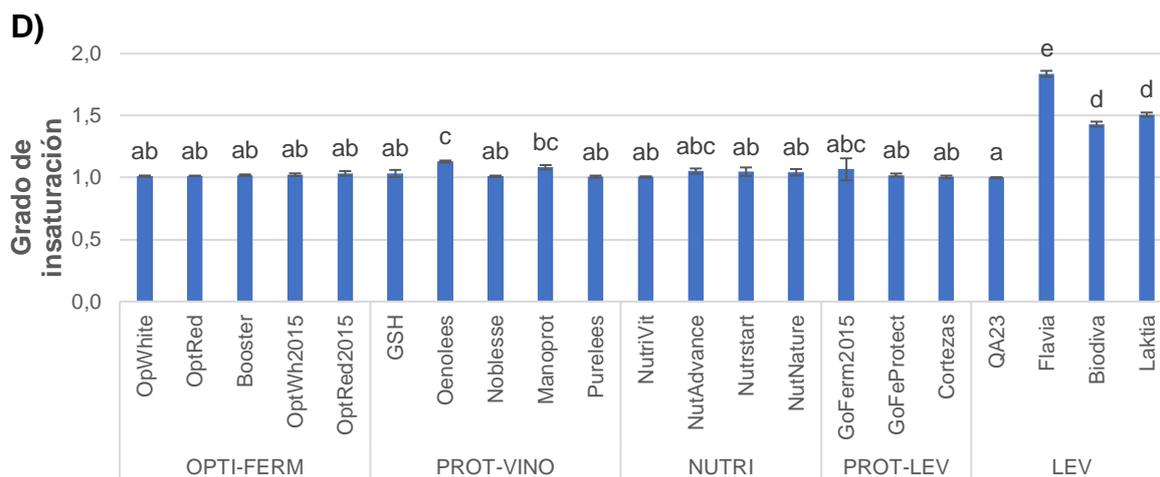


Figura 1. Composición ácidos grasos de los productos enológicos y las levaduras comerciales. Ácidos Grasos Saturados (SFA) (A), Ácidos Grasos Insaturados (UFA) (B), Relación entre la composición de UFA y SFA (UFA/SFA) (C), Grado de insaturación de los ácidos grasos (D). *S. cerevisiae* (QA23), *M. pulcherrima* (Flavia), *T. delbrueckii* (Biodiva) y *L. thermotolerans* (Laktia). Media ± Desviación Estándar (n = 3). Las letras minúsculas indican una diferencia significativa entre productos o especies de levaduras utilizando el Test de Tukey (HSD) a $p < 0.05$.

En conclusión se puede decir que todos los productos analizados son el resultado de la inactivación de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y no de una no-*Saccharomyces* debido a un grado de insaturación igual o inferior a 1. También se detectó la presencia del ácido linoleico (C18:2) en la mayoría de los productos y este resultado indica que seguramente la o las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas pudieron incorporar este ácido desde el medio de cultivo. Por último, comentar que en relación al anuncio de la publicidad de algunos de estos productos (Nutrient Vit o Go-Ferm Protect) (Anexo 3), no se detectaron ácidos grasos poliinsaturados en proporción importante para que puedan jugar un papel notable cuanto a la regulación de la fluidez de las membranas de la cepa que fermenta el mosto de uva; hay más C18:2 en el mosto que en los productos y además es más accesible a las levaduras que fermentan (N. Rozès comunicación personal).

Los resultados del perfil en ácidos grasos de los grupos de productos y las levaduras fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA), mostrado en la Figura 2. El PCA se realizó utilizando los SFA, UFA, la relación UFA/SFA y el grado de insaturación. Se obtuvo un modelo con dos factores que explicaban el 98,31% de la variancia.

Se observó cómo las variables estudiadas se situaban en los ejes a un lado los UFA con la relación estudiada y al otro lado los SFA con el grado de insaturación, siendo por tanto inversamente proporcionales estos grupos. En el caso de las levaduras no-*Saccharomyces* ya se observó alto grado de insaturación y un SFA elevado respecto a *S. cerevisiae*, con un perfil en ácidos grasos más similar al resto de productos. Dentro de cada

grupo de productos no se observó homogeneidad en la relación a las variables, pero en general los productos se situaron más próximos a UFA (mayor proporción), como se representó en la Figura 1B.

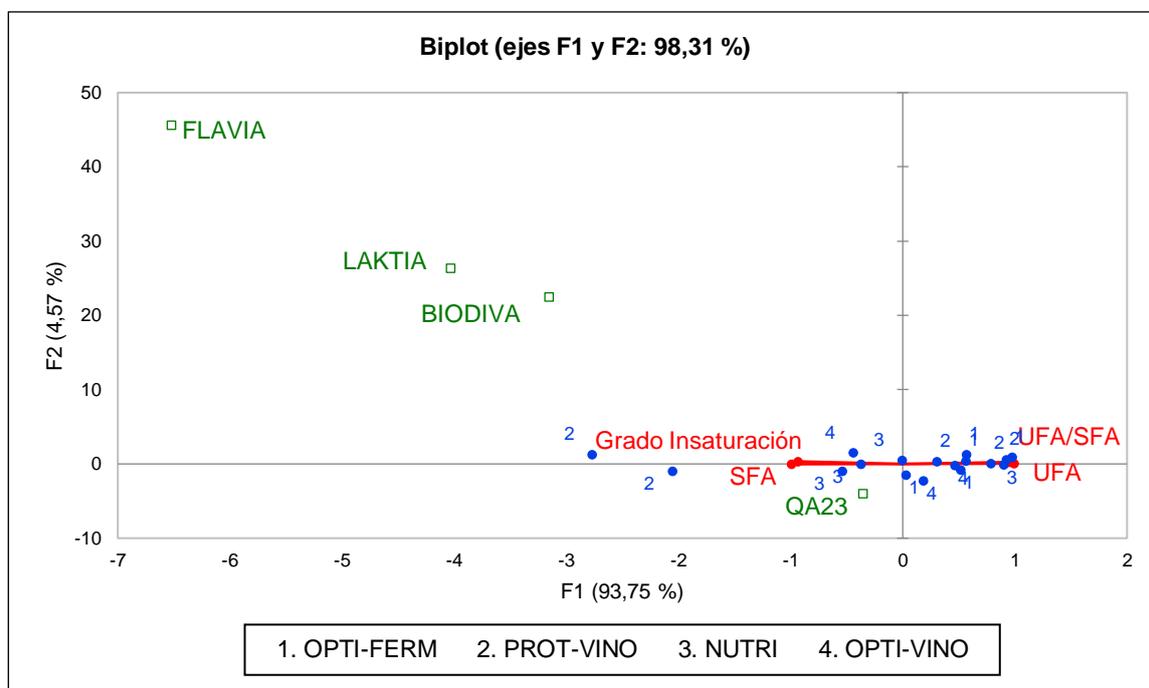


Figura 2. Biplot del Análisis de los Componentes Principales (ACP) utilizando como variables UFA, SFA, UFA/SFA y Grado de insaturación. Como observaciones activas se utilizaron los grupos de productos OPTI-FERM, PROT-VINO, NUTRI y OPTI-VINO. Como observaciones suplementarias se utilizaron las levaduras analizadas: *S. cerevisiae* (QA23), *M. pulcherrima* (Flavia), *T. delbrueckii* (Biodiva) y *L. thermotolerans* (Laktia).

En conclusión puede confirmarse que los productos enológicos estudiados son elaborados a partir de una cepa de *S. cerevisiae* cultivada en un medio en el cual hay ácidos poliinsaturados; no obstante, no puede asegurarse si es la misma cepa y/o las condiciones de cultivo (medio, oxígeno, temperatura, etc.) son significativamente diferentes.

5.1.2. Análisis de los esteroides

El principal esteroide identificado fue el ergosterol, producto final de la vía de biosíntesis de los esteroides en las levaduras y con una gran influencia en el estado de las membranas, regulando la fluidez y permeabilidad (Hidalgo Togores, 2011). También se identificaron esteroides que actúan como precursores e intermediarios en la ruta de biosíntesis del ergosterol, de manera ordenada son el escualeno, lanosterol, zimosterol, fecosterol y episterol (Anexo 2, Tabla A2).

En los productos Oenolees y Manoproteínas, se observó que solo contenían escualeno (Fig. 3A) y el resto de productos comerciales, incluyendo las levaduras, no presentaron altos niveles de este precursor de la ruta. Este resultado puede explicarse porque las cepas de levaduras fueron cultivadas en presencia de oxígeno y algunas reacciones implicadas en la biosíntesis del ergosterol necesitan oxígeno para obtener el producto final, el ergosterol (Daum et al., 1998). Respecto a la presencia única del escualeno en Oenolees y Manoproteínas puede explicarse por el modo de preparación de estos productos. Pueden ser tratados específicamente para obtener solamente las paredes de las levaduras y por consecuencia, eliminar una parte de las membranas de las células ya que no se detecta el ergosterol, principal esteroide de las membranas. No obstante, hay una contaminación de estas preparaciones por el escualeno, que podría haber interactuado de alguna manera con las paredes de las levaduras. También podría incrementarse la cantidad de muestra analizada para comprobar realmente la ausencia de ergosterol, en lugar de 10 mg utilizar unos 50 mg de muestra.

Para el resto de intermediarios de la ruta se comparó su concentración con el ergosterol. Los intermediarios menos abundantes fueron el zimosterol y fecosterol (Fig. 3B) y más abundantes el lanosterol y episterol (Fig. 3C).

En general se observó que los productos clasificados como optimizadores de la fermentación presentaron mayor concentración de esteroides y dentro de este grupo destaca el producto OptiMUM Red. Otros productos destacables son Pure-Lees y Nutrient Vit en referencia al fecosterol y las Cortezas de levadura en referencia al lanosterol.

En las levaduras, QA23 fue la levadura con menor proporción de esteroides y por el contrario, Flavia (*M. pulcherrima*) y Biodiva (*T. delbrueckii*) presentaron niveles más elevados.

Es interesante señalar que la relación entre el ergosterol y el zimosterol fue más elevada en las no-*Saccharomyces* que en QA23 y los productos enológicos. Generalmente, se considera el zimosterol, intermediario de la ruta de biosíntesis de los esteroides, como un esteroide de reserva que se encuentra esterificado con ácidos grasos saturados o insaturados (N. Rozès comunicación personal). Por lo tanto, cuando este ratio Erg/Zim baja en las levaduras, los productos enológicos disponen de una reserva tanto de esteroides como de ácidos grasos. Ahora bien, se desconoce si esta reserva de lípidos puede ser utilizada por las levaduras que fermentan.

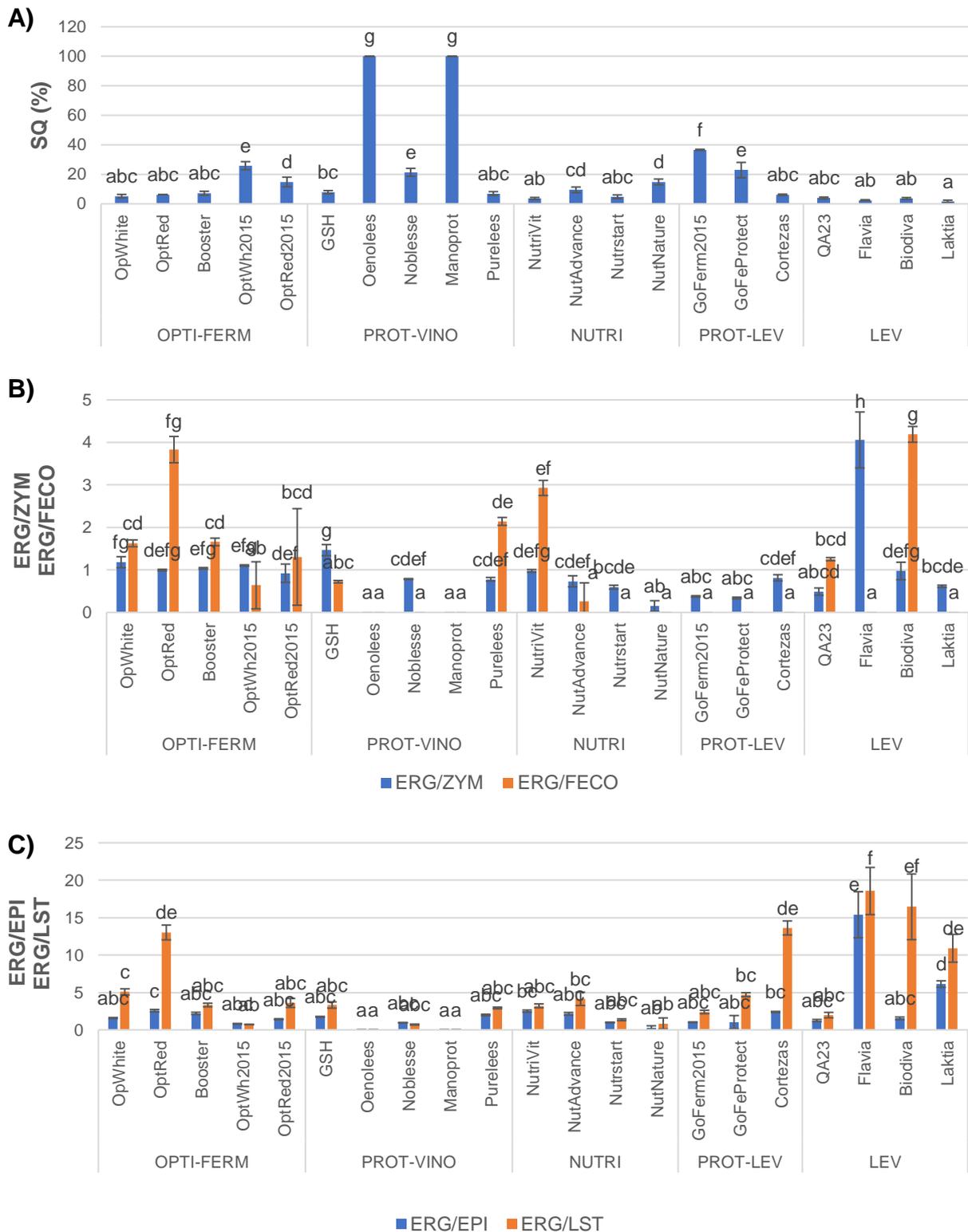


Figura 3. Composición de esteroides de los productos enológicos y las levaduras comerciales. Escualeno (A), relación del ergosterol con el zymosterol (ERG/ZYM) y con el fecosterol (ERG/FECO) (B) y relación del ergosterol con el episterol (ERG/EPI) y con el lanosterol (ERG/LST) (C). *S. cerevisiae* (QA23), *M. pulcherrima* (Flavia), *T. delbrueckii* (Biodiva) y *L. thermotolerans* (Laktia). Media ± Desviación Estándar (n = 3). Las letras minúsculas indican una diferencia significativa entre productos o especies de levaduras utilizando el Test de Tukey (HSD) a p < 0.05.

Los resultados del perfil en esteroides de los grupos de productos y las levaduras fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA), mostrado en la Figura 4. El PCA se realizó utilizando el escualeno y las relaciones del ergosterol con sus precursores. Se obtuvo un modelo con dos factores que explicaban el 80,63% de la variancia.

Se observó cómo las variables estudiadas se situaban a un lado los precursores del ergosterol, y al otro lado el escualeno. Las levaduras Biodiva (*T. delbrueckii*) y Laktia (*L. thermotolerans*) se situaron juntas, Flavia (*M. pulcherrima*) muy alejada del eje central y QA23 (*S. cerevisiae*) en el centro junto a la mayor parte de los productos. Dentro de cada grupo de productos no se observó un mismo patrón, sin embargo, dos productos, OptiMUM Red y Cortezas de levaduras se situaron próximos de levaduras no-*Saccharomyces* (Biodiva y Laktia).

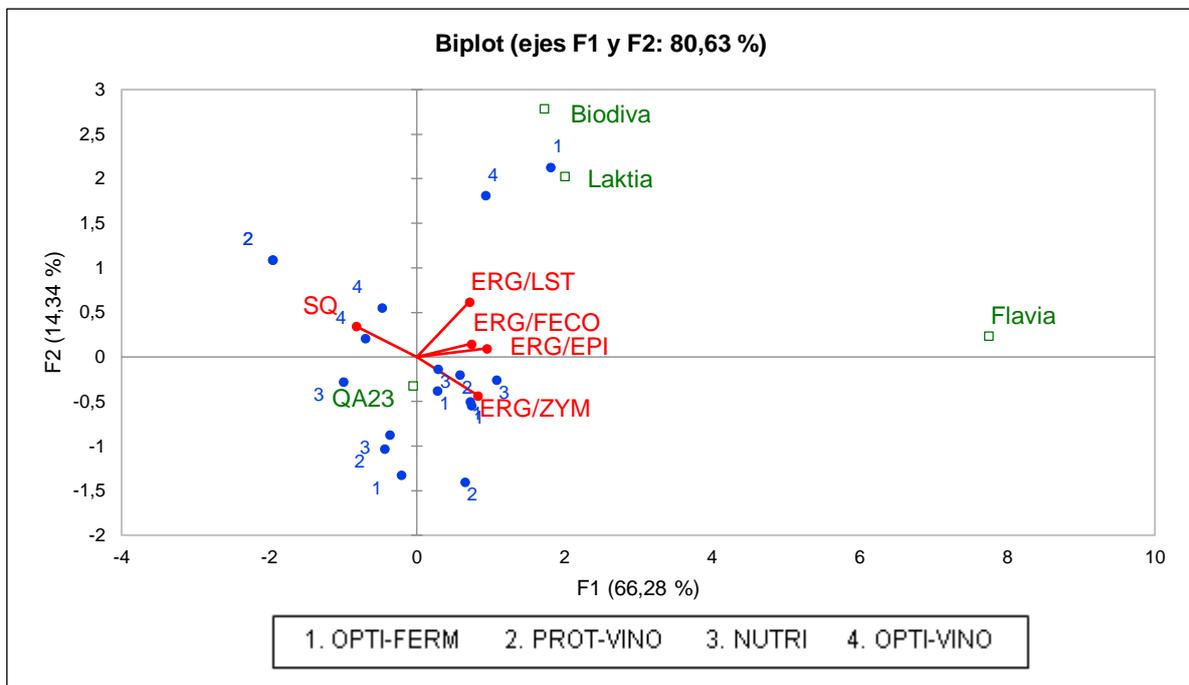


Figura 4. Biplot del Análisis de los Componentes Principales (ACP) utilizando como variables SQ, ERG/ZYM, ERG/FECO, ERG/EPI y ERG/LST. Como observaciones activas se utilizaron los grupos de productos OPTI-FERM, PROT-VINO, NUTRI y OPTI-VINO. Como observaciones suplementarias se utilizaron las levaduras analizadas: *S. cerevisiae* (QA23), *M. pulcherrima* (Flavia), *T. delbrueckii* (Biodiva) y *L. thermotolerans* (Laktia).

En conclusión el PCA confirma que los productos enológicos están elaborados a partir de una o varias cepas de *S. cerevisiae* en condiciones de cultivo idénticas o no.

5.1.3. Análisis del metaboloma

Para el análisis del metaboloma, así como para el resto de análisis, cada producto enológico y cepa de levadura fue analizado por tres muestras biológicas independientes. Sin embargo, debido a la emergencia sanitaria por la COVID-19 y el estado de alarma decretado por el Gobierno de España, solo fue posible analizar un cromatógrafo por muestra de cada producto y cepa, y no pudo realizarse ningún análisis del producto Manoproteínas (Agrovin).

En las muestras analizadas se detectaron múltiples picos pero solo los más destacados se muestran en la Figura 5. En la Figura 5A se muestran los metabolitos con menor proporción en las muestras: ácidos orgánicos (ácidos succínico, málico y cítrico), fosfato y glicerol y en la Figura 5B los metabolitos mayoritarios: aminoácidos (Anexo 2) y trehalosa. Como se ha indicado (4.2.2), en todos los picos identificados se normalizaron las alturas de cada metabolito respecto al ribitol (patrón interno) y después se calcularon los porcentajes correspondientes.

El fosfato, metabolito esencial en procesos de fosforilación u obtención de energía, destacó en la levadura *Flavia* (*M. pulcherrima*) y en productos clasificados como nutrientes (Nutriferm Advance y Nutrient Nature), ambos destinados a evitar paradas en la fermentación, y en el producto Go-Ferm, utilizado para garantizar la viabilidad de la levadura. Además, en la composición de Nutriferm Advance (Anexo 3), el fabricante indica en su prospecto la presencia de fosfato de amonio. Los ácidos orgánicos y el glicerol influyen en las características organolépticas de los vinos, concretamente en el aroma. Destacó en su composición en ácidos orgánicos el producto Nutrient Vit y en el glicerol la levadura *Flavia* y el producto Nutrient Nature. Diversos productos indican su papel en el aroma del vino pero vista la proporción que hay, no tienen ninguna influencia sobre esta característica.

En la Figura 5B se observó en general una elevada concentración de aminoácidos, utilizados principalmente como fuente de nitrógeno orgánico, en los productos clasificados como nutrientes y protectores de levaduras. Sin embargo, en el producto Nutrient Nature, la concentración de aminoácidos es inferior que en los productos Go-Ferm o Go-Ferm Protect, lo cual no concuerda con la información proporcionada por la casa comercial (Anexo 3).

Los productos, pero principalmente las levaduras, mostraron un porcentaje en trehalosa muy elevado, como ya se esperaba, puesto que este metabolito es (i) producido por las levaduras cuando entran en fase estacionaria de crecimiento (Novo et al., 2003) y (ii) almacenado por las levaduras secas-activas para mejorar la viabilidad celular y su actividad

fisiológica durante la rehidratación (Eleutherio et al., 2015). Este resultado puede indicar que los productos enológicos, como hidrolizados de células o levaduras inactivas, están normalmente preparados a partir de células *S. cerevisiae* en fase estacionaria de crecimiento. También es destacable como en los productos OptiMUM de diferentes años (2015 y 2019) no se vio alterada la proporción de trehalosa, mientras que en los productos de la gama Go-Ferm, el producto del año 2015 (Go-Ferm), no presentó este metabolito en su composición, lo cual puede ser debido a la degradación por el paso del tiempo.

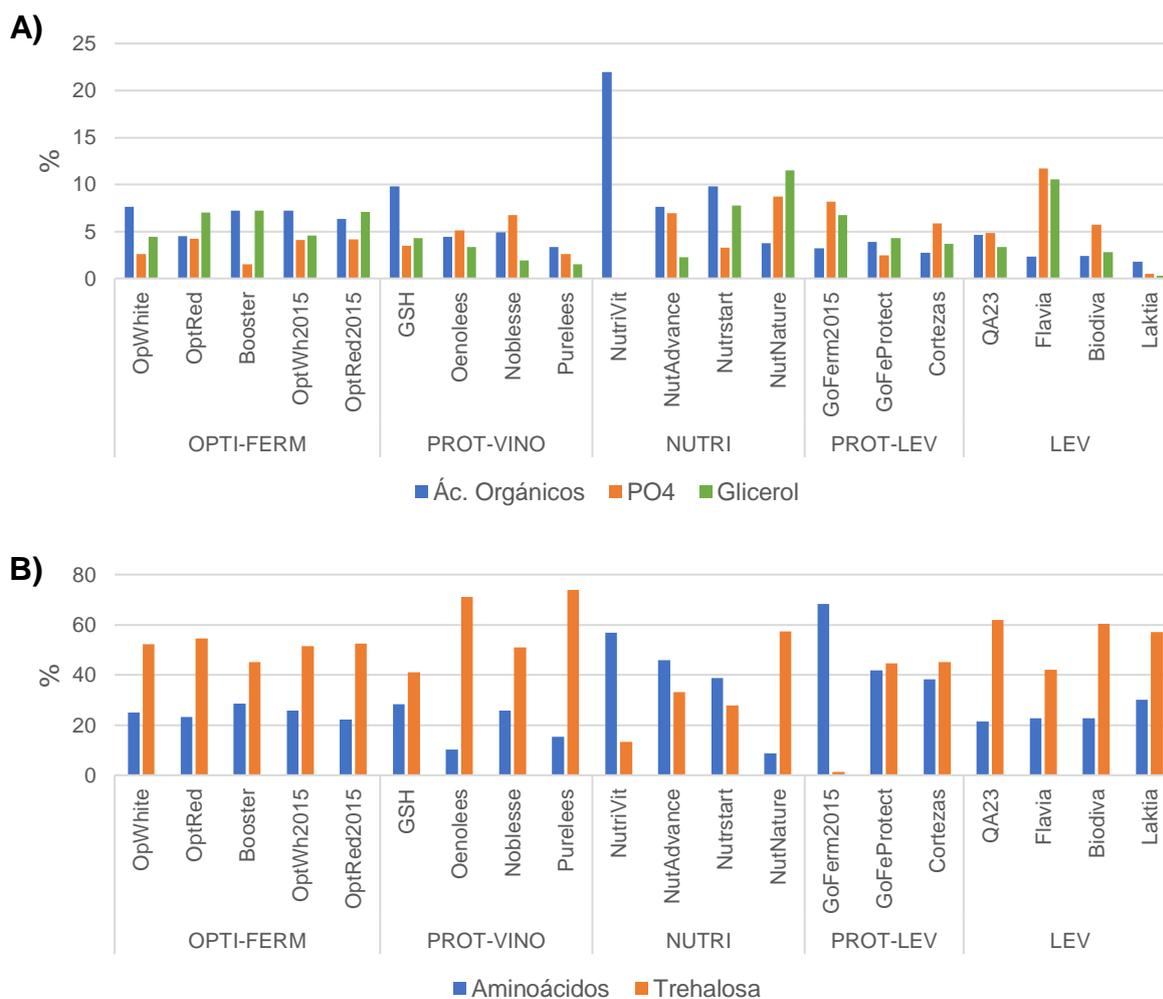


Figura 5. Composición de metabolitos de los productos enológicos y las levaduras comerciales. Ácidos orgánicos (ácidos succínico, málico y cítrico), fosfato y glicerol (A), aminoácidos y trehalosa (B). *S. cerevisiae* (QA23), *M. pulcherrima* (Flavia), *T. delbrueckii* (Biodiva) y *L. thermotolerans* (Laktia). Debido a la emergencia sanitaria por la COVID-19 y el estado de alarma decretado por el Gobierno de España, solo fue posible analizar un cromatógrafo por muestra de cada producto y cepa.

Los resultados del perfil metabólico de los grupos de productos y las levaduras fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA), mostrado en la Figura 6. El PCA se realizó utilizando los aminoácidos, la prolina, el glicerol y la trehalosa. Se obtuvo un modelo con dos factores que explicaban el 89,36% de la variancia.

Se observó cómo las variables estudiadas, aminoácidos y trehalosa se situaban cada uno a un lado del eje, siendo por tanto inversamente proporcionales. La prolina, uno de los aminoácidos más abundantes en las levaduras, siguió una relación diferente al resto de aminoácidos, situándose junto al glicerol.

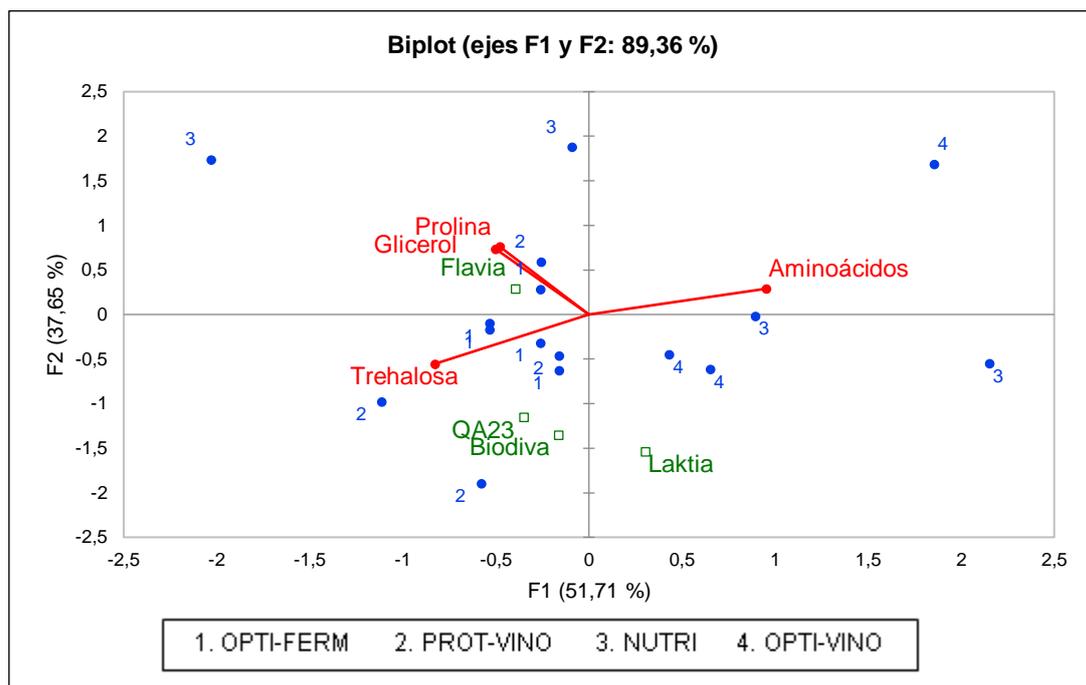


Figura 6. Biplot del Análisis de los Componentes Principales (ACP) utilizando como variables trehalosa, glicerol, prolina y aminoácidos. Como observaciones activas se utilizaron los grupos de productos OPTI-FERM, PROT-VINO, NUTRI y OPTI-VINO. Como observaciones suplementarias se utilizaron las levaduras analizadas: *S. cerevisiae* (QA23), *M. pulcherrima* (Flavia), *T. delbrueckii* (Biodiva) y *L. thermotolerans* (Laktia). Debido a la emergencia sanitaria por la COVID-19 y el estado de alarma decretado por el Gobierno de España, solo fue posible analizar un cromatógrafo por muestra de cada producto y cepa.

Las levaduras Biodiva (*T. delbrueckii*) y QA23 (*S. cerevisiae*) presentaron relación entre ellas, pero tampoco se puede establecer una relación con el resto de productos puesto que estos muestran un patrón muy disperso. Esta dispersión de los productos y cepas es debida a que solo se analizó un cromatógrafo por muestra y sería necesario analizar más muestras para obtener un mejor resultado.

5.1.4. Análisis del nitrógeno amínico

Una vez medida la absorbancia a 335 nm de las muestras de productos y levaduras y del blanco de estas se calculó la absorbancia neta a partir de la siguiente expresión:

Absorbancia neta = Absorbancia de la muestra – Absorbancia del blanco de cada muestra

Esta absorbancia neta se utilizó para calcular la concentración de nitrógeno amínico (NOPA) o nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (YAN), utilizando la ecuación de regresión lineal de la recta de calibración y el factor de dilución de la muestra.

Concentración de N (mg/L) = (Absorbancia neta de la muestra * pendiente de la recta) + intercepción * factor de dilución

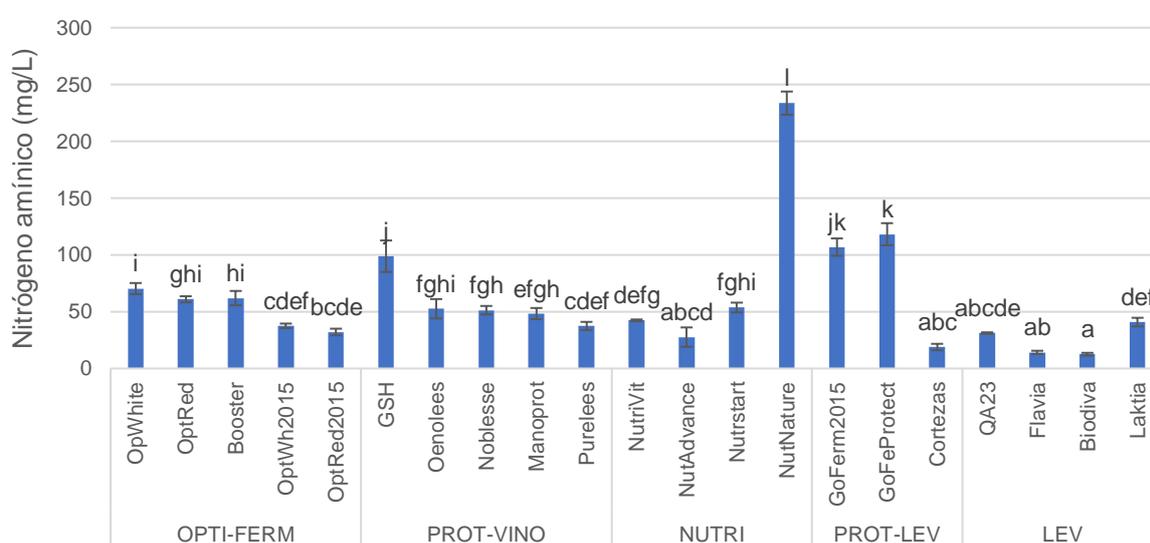


Figura 7. Composición en nitrógeno amínico de los productos enológicos y las levaduras comerciales. *S. cerevisiae* (QA23), *M. pulcherrima* (Flavia), *T. delbrueckii* (Biodiva) y *L. thermotolerans* (Laktia). Media ± Desviación Estándar (n = 3). Las letras minúsculas indican una diferencia significativa entre productos o especies de levaduras utilizando el Test de Tukey (HSD) a p < 0.05. (Anexo 2, Tabla A3)

En general, los productos enológicos presentaron mayor concentración de nitrógeno amínico que las levaduras (Fig. 7). Destacaron los productos Nutrient Nature, Go-Ferm y Go-Ferm Protect, en los cuales ya indicaba su ficha técnica un alto contenido en aminoácidos. Sin embargo, los productos Nutrient Vit y Nutristart indicaban gran aporte de nitrógeno inorgánico para corregir carencias en los mostos, pero como se mostró, su concentración se situó en la media de otros productos (Anexo 3).

Otra fuente de nitrógeno puede ser el glutatión, tripéptido del cual la levadura puede valerse si disminuye la cantidad de nitrógeno en el mosto. Los productos ricos en glutatión

son Glutastar, OptiMUM White, OptiMUM Red y Booster Rouge y como se observó en la Figura 7, presentaron niveles más altos en nitrógeno. No obstante, los productos del año 2015, OptiMUM White y OptiMUM Red tuvieron valores inferiores, que puede significar que se ha mejorado la fórmula de estos productos con el tiempo o que el contenido en NOPA de los productos de 2015 se ha degradado.

5.1.5. Análisis general de los productos enológicos y levaduras

Para estudiar la relación entre diversas variables estudiadas y la disposición de los productos respecto a las diferentes cepas de levaduras, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA), mostrado en la Figura 8. El PCA se realizó utilizando como variables ácidos grasos insaturados (UFA), ácidos grasos saturados (SFA), grado de insaturación, escualeno (SQ); relación del ergosterol con el zimosterol (ERG/ZYM), con el fecosterol (ERG/FECO), con el episterol (ERG/EPI) y con el lanosterol (ERG/LST); nitrógeno amínico (NOPA), trehalosa, glicerol y aminoácidos. Se obtuvo un modelo con dos factores que explicaban el 67,26% de la variancia.

En relación a las variables, se dividieron en dos grupos principalmente. Un grupo formado por los ácidos grasos insaturados y las relaciones del ergosterol con sus precursores y el otro grupo formado por el grado de insaturación, los ácidos grasos saturados, escualeno, nitrógeno amínico y glicerol. Por otro lado, se encuentran más dispersos los aminoácidos y la trehalosa.

Los productos enológicos se situaban dispersos por el PCA, pero en general, más próximos del grupo de los ácidos grasos insaturados y los precursores del ergosterol. Esto posiblemente pueda ser a causa de la concentración de ácidos grasos insaturados y esteroides en las membranas de las levaduras y que estos productos, pueden liberarlos al medio de fermentación para que las levaduras los asimilen e incorporen a sus membranas.

El grupo OPTI-FERM (1), fue el grupo cuyos productos más próximos entre sí. En los grupos PROT-VINO (2) y OPTI-VINO (4) dos productos se encontraban muy alejados, los cuales fueron Oenolees (2) y Go-Ferm 2015 (4). En el caso del Oenolees, su disposición en el PCA se debe a un alto contenido en ácidos grasos saturados (SFA) (Fig. 1A) y en escualeno (SQ) (Fig. 3A). La disposición del producto Go-Ferm 2015 se justifica por, un contenido superior en escualeno (SQ) (Fig. 3A) que en el resto de esteroides (Fig. 3B y 3C) y una elevada proporción en aminoácidos y sin la presencia de trehalosa (Fig. 5B). En el grupo NUTRI (3), el producto Nutrient Nature se situó opuesto al resto de productos de su grupo. Esta disposición se justifica por el análisis del metaboloma, en el cual este producto presentó mayor proporción en glicerol (Fig. 5A) y trehalosa (Fig. 5B) que el resto del grupo.

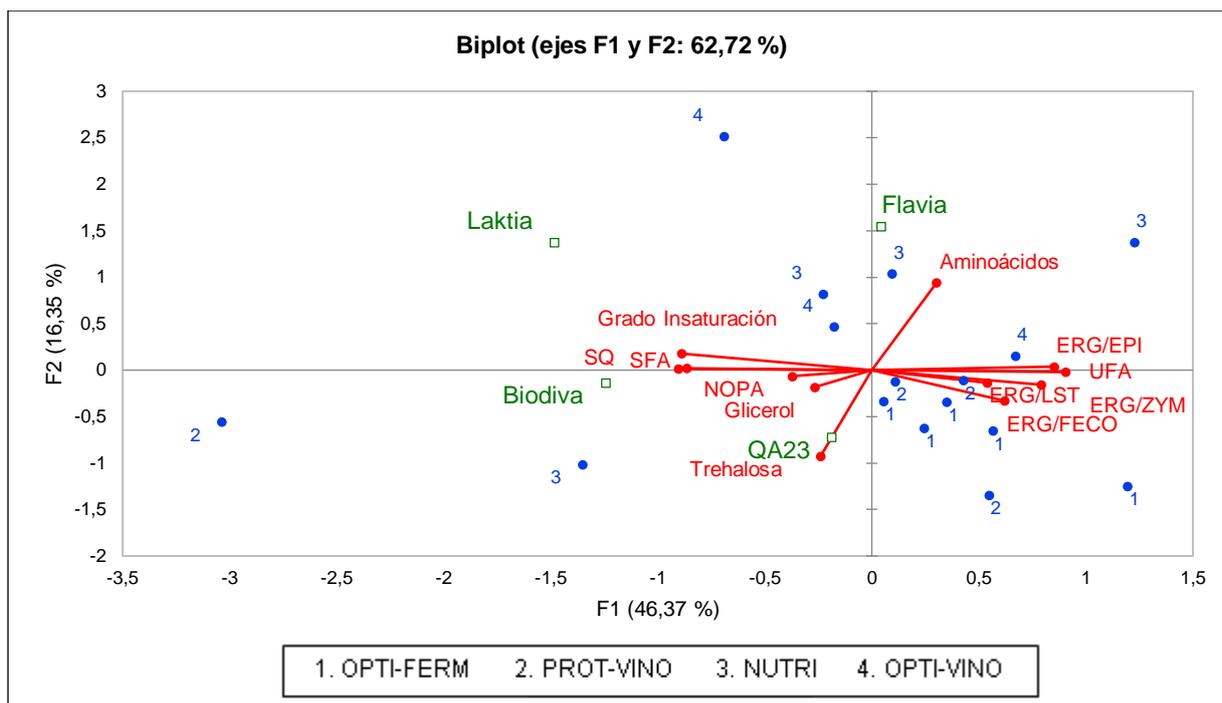


Figura 8. Biplot del Análisis de los Componentes Principales (ACP) utilizando como variables ácidos grasos insaturados (UFA), ácidos grasos saturados (SFA), grado de insaturación, escualeno (SQ); relación del ergosterol con el zimosterol (ERG/ZYM), con el fecosterol (ERG/FECO), con el episterol (ERG/EPI) y con el lanosterol (ERG/LST); nitrógeno amínico (NOPA), trehalosa, glicerol y aminoácidos. Como observaciones activas se utilizaron los grupos de productos OPTI-FERM, PROT-VINO, NUTRI y OPTI-VINO. Como observaciones suplementarias se utilizaron las levaduras analizadas: *S. cerevisiae* (QA23), *M. pulcherrima* (Flavia), *T. delbrueckii* (Biodiva) y *L. thermotolerans* (Laktia). Debido a la emergencia sanitaria por la COVID-19 y el estado de alarma decretado por el Gobierno de España, solo fue posible analizar un cromatógrafo por muestra de cada producto y cepa para las variables trehalosa, glicerol y aminoácidos. El producto Manoproteínas no pudo analizarse para estas variables y por eso no se ha representado en la siguiente figura.

Como se observó en la Figura 8 y en el resto de PCAs analizados (Fig. 2, 4 y 6), la levadura QA23 (*S. cerevisiae*) muestra mayor similitud con los productos estudiados que las levaduras no-*Saccharomyces*, confirmando así que estos productos están elaborados a partir de una o varias cepas de *S. cerevisiae* en condiciones de cultivo idénticas o no.

5.2. INACTIVACIÓN DE LEVADURAS

La inactivación de las levaduras QA23 (*S. cerevisiae*) y Flavia (*M. pulcherrima*) se realizó en función de diferentes temperaturas y soluciones a un pH determinado. El objetivo es inactivar el mayor número de células pero sin que estas pierdan la estructura de su pared celular. El segundo objetivo que no se ha podido realizar debido a la emergencia sanitaria por la COVID-19 y el estado de alarma decretado por el Gobierno de España, era analizar la

liberación de compuestos lipídicos y nitrogenados de células inactivadas y de uno de los productos comerciales en un mosto o vino sintético.

Para observar que no pierden esta estructura, cada muestra se observó al microscopio y se comprobó que en ninguna condición había rotura de la pared celular.

5.2.1. Inactivación por pH

La inactivación se realizó con las soluciones preparadas a pH 1 y pH 2 en diferentes tiempos de estudio (10 min, 30 min y 60 min) y se realizaron siembras directas y diluidas 1/10 de las muestras en YPD sólido (Fig. 9).

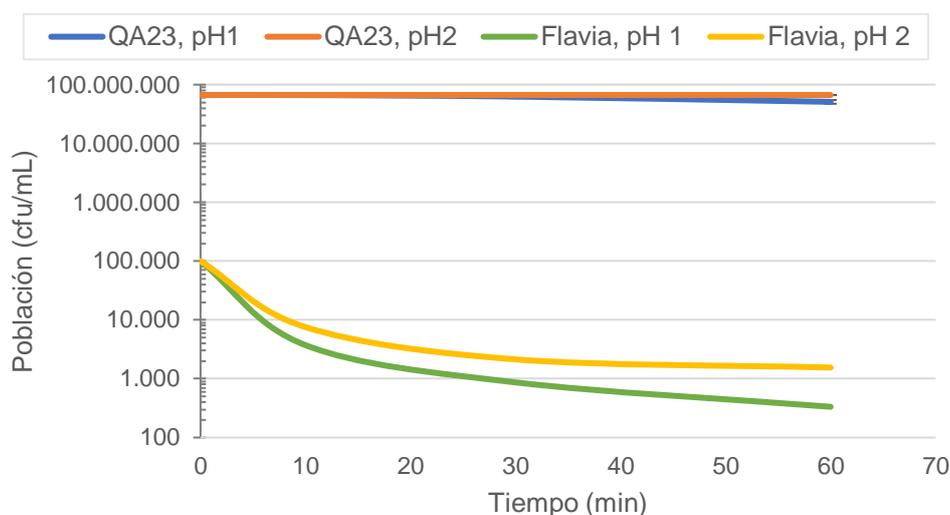


Figura 9. Efecto de la inactivación por pH 1 y pH 2 a diferentes tiempos (10 min, 30 min y 60 min) sobre la población (cfu/mL) de las levaduras QA23 (*S. cerevisiae*) y Flavia (*M. pulcherrima*).

En el caso de la levadura QA23 al día siguiente se observaron las placas y la población cubría toda la superficie. Indicador de que a los tiempos de estudio no se producía inactivación con ninguna de las soluciones de pH preparadas.

Sin embargo, en la levadura Flavia se observó a los dos días muy poco crecimiento de colonias en las placas, lo que indicaba que sí se había producido inactivación por el pH. Esta inactivación se incrementaba al disminuir el pH y al aumentar el tiempo de contacto de las células con las soluciones de pH (Fig. 9).

5.2.2. Inactivación por temperatura

Para la levadura QA23 se estudió la inactivación a la temperatura de 60, 70, 80 y 90°C en diferentes tiempos (10 min, 30 min y 60 min) y se realizaron siembras directas y diluidas 1/10 de las muestras en YPD sólido (Fig. 10). Se observaron las placas a los dos días y en todas las temperaturas la población de células disminuía gradualmente en función

del tiempo. La población fue mayor a los 60°C donde disminuía de manera lineal, mientras que para el resto de temperaturas estudiadas, esta población ya disminuía significativamente a los 10 minutos.

Para la levadura Flavia se estudió la inactivación a 50, 60 y 70°C en diferentes tiempos (10 min, 30 min y 60 min) y se realizaron siembras directas y diluidas 1/10 de las muestras en YPD sólido (Fig. 10). No se estudió a la misma temperatura que la QA23 puesto que 70°C después de los 10 minutos la población de células era muy baja. A los dos días se observó que a 50°C se mantiene la población inicial durante 10 min pero luego disminuye en función del tiempo. A 60°C se observó una disminución de la población siguiendo una tendencia similar a la observada en la levadura QA23.

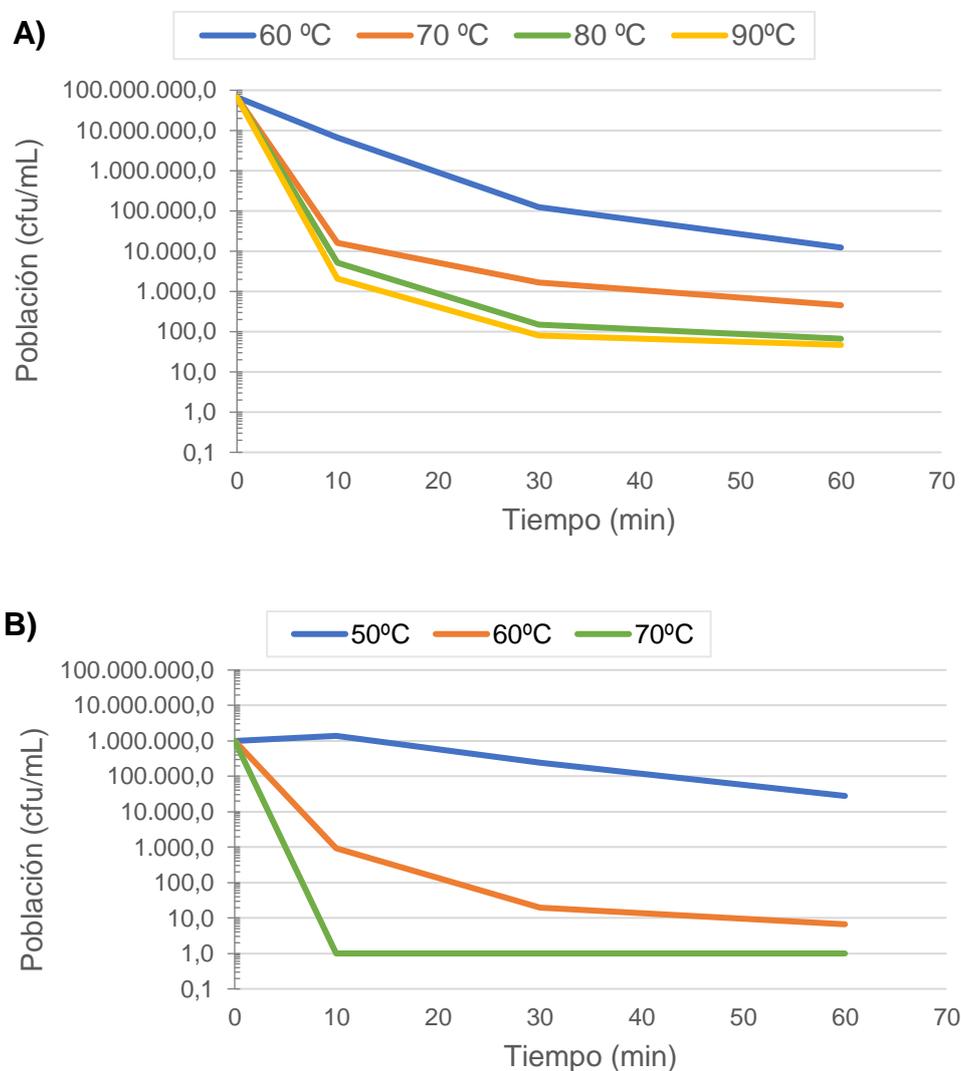


Figura 10. Efecto de la inactivación por temperatura a diferentes tiempos (10 min, 30 min y 60 min) sobre la población (cfu/mL) de las levaduras QA23 (*S. cerevisiae*) (A) y Flavia (*M. pulcherrima*) (B).

Como se observó en la Figura 10A, el pH no es un método válido para inactivar la levadura QA23. En este caso la mejor opción sería la inactivación a la temperatura de 80 o 90°C ya que en ambas se observaron resultados similares.

En la levadura Flavia se observó (Fig. 10B) como su inactivación resultó más sencilla ya que no necesitó condiciones tan extremas. El pH resulta una buena opción para su inactivación y en el caso de la temperatura a 70°C se observó una inactivación total.

Este estudio de la inactivación de temperatura se llevó a cabo en un baño seco (Fisher Bioblock Scientific). Si se hubiera realizado el experimento en un baño maría, la temperatura se habría mantenido más constante y la inactivación podría haber disminuido más con el tiempo utilizando temperaturas menores.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Después de la caracterización del perfil lipídico (esteroles y ácidos grasos), metabolómico y la fracción de nitrógeno amínico (NOPA) de diversos productos enológicos y levaduras comerciales (*Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*) pueden destacarse varias conclusiones.

En el análisis del perfil lipídico se determinó mayor concentración de ácidos grasos insaturados que saturados. Los productos se obtuvieron a partir de una levadura *S. cerevisiae* debido a un grado de insaturación similar. *S. cerevisiae* no puede sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) pero en la mayoría de productos se detectó ácido linoleico (C18:2), el cual pudo ser incorporado por la levadura en el medio de cultivo. Productos como Go-Ferm Protect o Nutrient Vit indican en sus prospectos (Anexo 3) la presencia de PUFAs pero su proporción no fue significativa para que ejerzan un papel importante en la regulación de la membrana de las levaduras durante la vinificación.

En el análisis de los esteroles, se detectó principalmente ergosterol y en menor proporción los precursores de su vía de biosíntesis. En general la proporción de esteroles no fue muy elevada ni en los productos ni en la levadura QA23 (*S. cerevisiae*), solo destacó OptiMUM Red. Por el contrario las levaduras no-*Saccharomyces* presentaron proporciones más elevadas de los precursores del ergosterol.

En el análisis metabolómico, el glicerol y los ácidos orgánicos (ácidos succínico, málico y cítrico) fueron detectados en proporciones muy bajas en los productos por lo que la influencia en el aroma del vino sería relativamente nula. En relación a los aminoácidos, su concentración fue elevada en productos clasificados como nutrientes y protectores de

levaduras. También, como se esperaba, el porcentaje en trehalosa fue muy elevado, principalmente en las levaduras, lo cual puede indicar que los productos enológicos se preparan a partir de células en la fase estacionaria del crecimiento. Es destacable también el producto Go-Ferm del año 2015, que no presentó este metabolito en su composición, posiblemente degradado con el tiempo.

El análisis del nitrógeno amínico indicó mayor fracción de este en los productos, a destacar aquellos con glutatión en su composición. En este análisis también se observó cómo productos OptiMUM de años anteriores (2015) presentaron niveles inferiores a los actuales, o bien por mejora de las fórmulas o por degradación del NOPA.

Finalmente tras los resultados obtenidos y un PCA conjunto de las variables estudiadas (Fig. 8), se confirmó la hipótesis de que los productos enológicos estudiados son elaborados a partir de una o varias cepas de *S. cerevisiae* en diferentes condiciones de cultivo (medio, oxígeno, temperatura, etc.).

Una vez caracterizados estos productos enológicos, en futuras investigaciones podría estudiarse su modo de acción y los componentes que liberan al medio durante la fermentación del vino. Además, este estudio podría completarse con más productos para poder realizar mejores comparaciones y con cepas de *S. cerevisiae* cultivadas en diferentes condiciones.

Por otro lado, también se estudió la inactivación de una levadura *S. cerevisiae* y otra no-*Saccharomyces* (*M. pulcherrima*) a diferentes temperaturas y con soluciones de pH 1 y pH 2. Se determinó que la temperatura es un buen método de inactivación para las dos levaduras. La levadura QA23 (*S. cerevisiae*) mostró inactivación entre 80 y 90°C y la levadura Flavia (*M. pulcherrima*) a 70°C. Sin embargo, el pH no fue un método válido de inactivación para la levadura QA23 pero en cambio, en Flavia sí que se logró su inactivación con las dos soluciones preparadas.

Después del estudio de la inactivación se quería comprobar la liberación de lípidos (esteroles y ácidos grasos) y nutrientes de estas levaduras inactivas en un vino sintético. Sin embargo, a causa de la crisis sanitaria producida por la pandemia de la COVID-19 y el estado de alarma decretado por el Gobierno de España el 14 de marzo, no fue posible este posterior estudio. Este puede llevarse a cabo en futuras investigaciones del grupo de investigación BMA, mejorando también el método de inactivación utilizando otros equipamientos como el baño maría, combinando el efecto de la temperatura y el pH o utilizando otras levaduras.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aranda, A., Matallana, E., & Olmo, M. del. (2011). Saccharomyces Yeasts I: Primary Fermentation. In *Molecular Wine Microbiology* (pp. 1–31). Elsevier Inc.
- Andújar Ortiz, I. (2011). *Preparados enológicos comerciales a base de levaduras secas inactivas: caracterización, modo de acción e influencia en la composición y características sensoriales de los vinos*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
- Andújar-Ortiz, I., Pozo-Bayón, M. A., García-Ruiz, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2010). Role of specific components from commercial inactive dry yeast winemaking preparations on the growth of wine lactic acid bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(14), 8392–8399. <https://doi.org/10.1021/jf101132t>
- Borrull, A., López-Martínez, G., Miró-Abella, E., Salvadó, Z., Poblet, M., Cordero-Otero, R., & Rozès, N. (2016). New insights into the physiological state of *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol acclimation for producing sparkling wines. *Food microbiology*, 54, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.001>
- Bell, S.J., Henschke, P.A., (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res*, 11, 242-295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Caridi, A. (2002). Protective agents used to reverse the metabolic changes induced in wines yeasts by concomitant osmotic and thermal stress. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 98–1001. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01134.x>
- Caridi, A., Crucitti, P., & Ramondino, D. (1999). Winemaking of musts and high osmotic strength by thermotolerant yeasts. *Biotechnology Letters*, 21, 617–620. <https://doi.org/10.1023/A:1005528613379>
- Cerrutti, Patricia. (1988). Efectos combinados de la actividad acuosa, el pH y aditivos en el crecimiento y resistencia térmica de *saccharomyces cerevisiae*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Comuzzo P., Tat I., Liessi A., Battistutta F., Zironi R. (2007) Derivati di lievito: caratteristiche compositive e aspetti pratici legati all'impiego enológico. *Infowine*, 4/3, 1-8.
- Daum G., Lees N.D., Bard M., Dickson R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1471-1510. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199812\)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y)

- Díaz-Hellín, P., Gómez-Alonso, S., Borull, A., Rozès, N., Cordero-Otero, R., & Úbeda, J. (2014). Membrane Lipid Variability in *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strains Rehydrated in the Presence of Metabolic Activators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(34), 8679-8685. <https://doi.org/10.1021/jf500895y>
- Dukes, B & Butzke, C. (1998). Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 125-134.
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., and Magalhães, R. (2015). Revisiting Yeast Trehalose Metabolism. *Current Genetics* 61(3), 263–74. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0450-1>
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., & Charpentier, C. (2008). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 153-159. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00204.x>
- Giraud, M., Vicente, F., Sanchez Tuero, H., Pavesi, R., Markowski, I., Guirin, G., Martínez, S. & Scollo, D. (2006). Estudio de la vinificación en Argentina a partir de los aminoácidos libres en la producción de vino tinto (Merlot) y blanco (Torrontés) utilizando diferentes levaduras (nativa y cultivada). *ACE Rev. Enol* 44, 24-29.
- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N. & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Influence of addition of yeast autolysate on the formation of amines in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2221-2227. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2602>
- Hidalgo Togores, J. (2011). Transformaciones microbianas. Levaduras, bacterias y virus. En *Tratado de enología* (2nd ed., pp. 558-561; 576; 598-602). Mundi-Prensa.
- Larue F., Lafon-Lafourcade, S. & Ribéreau-Gayon P. (1980). Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentative activity in grape must. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 808-811.
- Lavigne-Cruege, V., Pons, A., Chone, X. & Dubourdieu, D. (2003) In: *Oenologie*, Lonvaud-Funel A., de Revel., G., Darriet Ph (Eds.), Editions Tec&Doc, Paris, 385-387
- Novo, M. T., Beltran, G., Torija, M. J., Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00253-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00253-8)

- Ough, C.S. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on ethyl carbamate formation on wine. In: J.M. Rantz (Ed.), Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. *American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA*, 165-171
- Pozo-Bayón, M. Á., Andújar-Ortiz, I., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Res. Int.*, 42(7), 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.004>
- Quail MA, Kelly SL. (1996). The extraction and analysis of sterols from yeast. *Methods Mol Biol*, 53, 123-131. <https://doi.org/10.1385/0-89603-319-8:123>
- Smith, A.K. & Noble, A.C. (1998). Effects of increased viscosity on the sourness and astringency of aluminium sulphate and citric acid. *Food Quality and Preference* 9, 139-144. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(97\)00047-5](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(97)00047-5)
- Soubeyrand, V., Luparia, V., Williams, P., Doco, T., Vernhet, A., Ortiz-Julien, A., et al. (2005). Formation of micella containing solubilized sterols during rehydration of active dry yeasts improves their fermentation capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (20), 8025–8032. <https://doi.org/10.1021/jf050907m>
- Takaloo, Z., Nikkhah, M., Nemati, R., Jalilian, N., & Sajedi, R. H. (2020). Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): a comparative study. *World journal of microbiology & biotechnology*, 36(5), 68. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02840-3>
- Unión Europea. Reglamento (CE) 479/2008 del Consejo, de 29 de abril de 2008, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola, se modifican los Reglamentos (CE) nº 1493/1999, (CE) nº 1782/2003, (CE) nº 1290/2005 y (CE) nº 3/2008 y se derogan los Reglamentos (CEE) nº 2392/86 y (CE) nº 1493/1999. Diario Oficial de la Unión Europea L 148, 6 de junio de 2008.
- Unión Europea. Reglamento (UE) 2165/2005 del Consejo, de 20 de diciembre de 2005, que modifica el Reglamento (CE) nº 1493/1999 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola. Diario Oficial de la Unión Europea L 345, 28 de diciembre de 2005, pp. 1-4.
- Villas-Bôas, S.G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(5), 613– 646. <https://doi.org/10.1002/mas.20032>

8. AUTOEVALUACIÓN

Mi estancia de prácticas en el grupo Biotecnología Microbiana de los Alimentos me ha ayudado a crecer personalmente como futura biotecnóloga y a desarrollarme de manera independiente en un laboratorio. Durante el trabajo realizado he consolidado y ampliado mis conocimientos ya que nunca había realizado cromatografías de gases y mis conocimientos en enología eran muy básicos. Con el tiempo fui mejorando, trabajando individualmente y llevando a cabo diferentes protocolos y técnicas.

Debido a la pandemia por la COVID-19 y al estado de alarma no se pudo completar todos los objetivos planteados inicialmente pero aun así, los resultados obtenidos hasta la fecha, eran suficientes para la redacción de este trabajo.

Mi tutor, Nicolas Rozès, me ha ayudado a ampliar mis conocimientos en enología y a organizar mis prácticas. En la corrección del trabajo ha sido esencial su ayuda para interpretar correctamente los resultados obtenidos en el laboratorio.

Para concluir, considero que esta experiencia en el sector de la investigación ha sido muy positiva aunque a veces ha sido difícil organizar los protocolos y la gran cantidad de resultados obtenidos. Sin embargo, al final, el esfuerzo y el trabajo se ven recompensados.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1. TABLAS MEDIAS LS

Tabla A1. Resumen de las medias de mínimos cuadrados (medias LS) de los ácidos grasos (%). Las letras minúsculas indican una diferencia significativa entre productos o especies de levaduras utilizando el Test de Tukey (HSD) a $p < 0.05$.

	C14:1	C14	C16:1	C16	C18:2	C18:1	C18	SFA	UFA	UFA/SFA	Grado Insaturación
Goferm2015	0,777 a	2,487 bc	27,986 abc	19,391 ab	2,392 a	27,413 ab	19,120 abc	40,999 a	58,567 c	2,120 abc	1,067 abc
Nutenartis	0,310 a	2,993 c	28,865 abc	17,530 ab	3,232 a	28,890 ab	17,483 abc	38,007 a	61,296 c	1,613 abc	1,053 abc
Nutrstart	0,471 a	0,621 abc	43,836 bcd	15,782 a	3,278 a	19,517 ab	16,216 abc	32,619 a	67,102 c	2,093 abc	1,047 ab
Optred2015	0,615 a	0,936 abc	44,051 bcd	13,920 a	2,457 a	26,090 ab	11,498 abc	26,355 a	73,213 c	3,011 abc	1,034 ab
Nutnature	0,408 a	2,267 abc	34,666 abcd	20,712 abc	2,162 a	18,138 ab	20,928 bcd	43,907 ab	55,374 bc	1,474 abc	1,043 ab
GSH	0,517 a	1,483 abc	44,041 bcd	15,537 a	2,238 a	23,466 ab	12,718 abc	29,738 a	70,262 c	2,456 abc	1,033 ab
Optwh2015	0,865 a	1,022 abc	43,771 bcd	14,932 a	1,676 a	25,974 ab	11,406 abc	27,360 a	72,285 c	2,847 abc	1,024 ab
Booster	0,224 a	0,807 abc	46,628 bcd	18,745 ab	1,273 a	15,250 ab	16,756 abc	36,308 a	63,376 c	1,909 abc	1,020 ab
Laktia	1,057 a	0,000 a	28,076 abc	15,526 a	30,153 b	0,000 a	24,461 cd	39,986 a	59,286 c	1,495 abc	1,509 d
Manoprot	0,000 a	2,137 abc	18,626 ab	32,409 cd	2,400 a	7,392 ab	35,219 de	69,765 bc	28,419 ab	0,411 ab	1,083 bc
Biodiva	0,114 a	0,139 ab	35,434 abcd	18,337 ab	27,912 b	1,319 ab	16,669 abc	35,144 a	64,779 c	1,848 abc	1,431 d
Gofeprotect	0,201 a	0,640 abc	32,959 abcd	14,846 a	1,416 a	36,341 ab	13,597 abc	29,083 a	70,917 c	2,578 abc	1,020 ab
Cortezas	0,403 a	0,789 abc	31,820 abcd	18,525 ab	0,416 a	32,262 ab	15,688 abc	35,002 a	64,900 c	1,900 abc	1,006 ab
Oenoleless	0,000 a	0,000 a	8,028 a	35,803 d	2,593 a	9,657 ab	43,920 e	79,723 c	20,277 a	0,259 a	1,129 c
Pureless	0,193 a	0,617 ab	36,276 abcd	14,320 a	0,581 a	35,449 ab	12,530 abc	27,467 a	72,499 c	3,198 c	1,008 ab
Optred	0,244 a	0,487 ab	50,395 cd	12,880 a	1,113 a	25,554 ab	9,325 ab	22,693 a	77,307 c	3,457 c	1,014 ab
Flavia	0,000 a	0,000 a	7,890 a	23,357 abc	51,101 c	2,032 ab	15,259 abc	38,616 a	61,023 c	1,581 abc	1,838 e
Nutrivit	0,325 a	0,600 ab	61,818 d	18,070 ab	0,422 a	13,078 ab	5,514 a	24,185 a	75,643 c	3,142 bc	1,006 ab
QA23	0,998 a	0,000 a	52,463 cd	28,142 bcd	0,000 a	0,000 a	17,590 abc	45,732 ab	53,462 bc	1,170 abc	1,000 a
Opwhite	0,066 a	0,528 ab	30,248 abcd	13,745 a	0,808 a	39,736 b	14,870 abc	29,143 a	70,857 c	2,530 abc	1,012 ab
Noblesse	0,055 a	0,221 ab	35,603 abcd	13,163 a	0,766 a	39,054 b	11,138 abc	24,522 a	75,478 c	3,394 c	1,011 ab

Tabla A2. Resumen de las medias de mínimos cuadrados (medias LS) de los esteroides (%). Las letras minúsculas indican una diferencia significativa entre productos o especies de levaduras utilizando el Test de Tukey (HSD) a $p < 0.05$.

	SQ	ERG	ERG/ZYM	ERG/FECO	ERG/EPI	ERG/LST
Optred	6,257 abc	26,703 i	0,996 defg	3,831 fg	2,556 c	13,014 de
Flavia	2,458 ab	50,127 j	4,057 h	0,000 a	15,383 e	18,555 f
Booster	7,153 abc	20,482 fgh	1,037 efg	1,659 cd	2,199 abc	3,318 abc
Biodiva	3,617 ab	23,551 hi	0,976 defg	4,189 g	1,537 abc	16,445 ef
Opwhite	5,186 abc	21,708 ghi	1,181 fg	1,626 cd	1,581 abc	5,073 c
Nutrivit	3,644 ab	23,915 hi	0,978 defg	2,928 ef	2,507 bc	3,207 abc
Cortezas	6,099 abc	24,683 hi	0,815 cdef	0,000 a	2,391 bc	13,621 de
GHS	7,917 bc	17,302 efg	1,466 g	0,723 abc	1,742 abc	3,317 abc
Optred2015	14,775 d	19,602 fgh	0,922 def	1,305 bcd	1,420 abc	3,594 abc
Pureless	6,974 abc	20,160 fgh	0,779 cdef	2,142 de	1,987 abc	2,923 abc
Nutenartis	9,497 cd	17,953 efg	0,732 cdef	0,255 a	2,144 abc	4,145 bc
Laktia	1,654 a	26,058 i	0,615 bcde	0,000 a	6,113 d	10,903 d
Optwh2015	25,841 e	10,028 bc	1,103 efg	0,638 ab	0,804 abc	0,721 ab
Gofeprotect	22,878 e	10,142 bcd	0,341 abc	0,000 a	1,024 abc	4,694 bc
Goferm2015	36,592 f	10,423 cd	0,377 abc	0,000 a	1,024 abc	2,387 abc
QA23	3,939 abc	12,742 cde	0,490 abcd	1,253 bcd	1,252 abc	1,974 abc
Noblesse	21,364 e	9,938 bc	0,785 cdef	0,000 a	0,952 abc	0,702 ab
Nutrstart	4,843 abc	15,458 def	0,594 bcde	0,000 a	0,979 abc	1,348 abc
Nutnature	14,831 d	4,879 ab	0,147 ab	0,000 a	0,291 ab	0,848 ab
Oenolees	100,000 g	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
Manoprot	100,000 g	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a

Tabla A3. Resumen de las medias de mínimos cuadrados (medias LS) del nitrógeno amínico (NOPA) (%). Las letras minúsculas indican una diferencia significativa entre productos o especies de levaduras utilizando el Test de Tukey (HSD) a $p < 0.05$.

NOPA	
Optred	60,901 ghi
GHS	98,847 j
Booster	61,933 hi
Opwhite	70,334 i
Flavia	14,188 ab
Optred2015	32,120 bcde
Biodiva	12,541 a
Nutrivit	42,353 defg
Purelees	37,463 cdef
Gofeprotect	118,196 k
Goferm2015	106,867 jk
Optwh2015	37,513 cdef
Nutenartis	27,611 abcd
Laktia	40,855 def
Cortezas	18,875 abc
Noblesse	51,306 fgh
Nutnature	233,629 l
Nutrstart	53,695 fghi
MANOPROT	48,345 efgh
Oenolees	52,561 fghi
QA23	31,188 abcde

9.2. ANEXO 2. AMINOÁCIDOS

Tabla A4. Aminoácidos identificados en el metaboloma

Alifáticos	Glicina, alanina, leucina, valina,, isoleucina
Aromáticos	Fenilalanina, triptófano
Hidroxilicos	Serina, treonina, hidroxiprolina
Amídicos	Asparagina
Ácidos	Acido aspártico, ácido glutámico
Básicos	Lisina, histidina
No proteicos	Ácido γ -aminobutírico (GABA), ornitina

9.3. ANEXO 3. FICHAS TÉCNICAS DE LOS PRODUCTOS ENOLÓGICOS Y LEVADURAS UTILIZADAS

Tabla A5. Enlaces a las fichas técnicas de los productos enológicos y levaduras comerciales

Producto	Enlace ficha técnica
Optimizadores de la fermentación	
OptiMUM White (2019 y 2015)	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/siy/docs/e1bc1a75e45e4b1604189f4afa0375124a138f65.pdf
OptiMUM Red (2019 y 2015)	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/siy/docs/922b270d289dd42dd0b4ef734badb5886d890b33.pdf
Booster Rouge	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/siy/docs/873c676f540aeb450ccacf80fb73cbe5f8cc6b34.pdf
Protectores del vino	
Glutastar	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/siy/docs/bf4a5ca4fdca3462027f4164cde368447f1a6ba.pdf
Oenolees	https://laffort.com/wp-content/uploads/FP/FP_ES_Oenolees.pdf
Noblesse	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/siy/docs/18462aec54b40ddad8e44d42cbbb6930a37b138f.pdf
Manoproteinas	https://www.agrovin.com/agrv/pdf/enologia/polisacaridos/es/mannoplus_es.pdf
Pure-Lees Longevity	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/siy/docs/58bae1c2079449cf8d5029331f7f6f188f902dc4.pdf
Nutrientes	
Nutrient Vit	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/nutrient/docs/9bc33e7a22c027681cc5930df27d695c510f2882.pdf
Nutriform Advance	https://www.enartis.com/datasheets/TECHNICAL-DATA-SHEET/ES/TDS-ES-NutriformAdvance.pdf
Nutristart	https://laffort.com/wp-content/uploads/FP/FP_ES_Nutristart.pdf
Nutrient Vit Nature	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/nutrient/docs/2dbf5e5d5071c63b83de881f93cd967894efc6f9.pdf
Protectores de las levaduras	
Go-Ferm	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/nutrient/docs/f7f0af798c10b4277c87442efa0a90c0e99e7cc7.pdf
Go-Ferm Protect	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/nutrient/docs/cafcabe49689eb1592a0aae3299b32ef7090c5ea.pdf
Cortezas de levaduras	http://www.cavatap.com/userfiles/file/activadors%20fal/4_070%20SP%20CORTEZAS%20DE%20LEVADURA.pdf?phpMyAdmin=5ecf1506a6eb371395f9b880b2e32705
Levaduras	
QA23 (<i>S. cerevisiae</i>)	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/yeasts/docs/c2ca8ab180e1ae329ffe5f9913b21068c39acbe7.pdf
Flavia (<i>M. pulcherrima</i>)	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/yeasts/docs/1e35d5290685ebe2521c29c23bb720c56ece63bd.pdf
Biodiva (<i>T. delbrueckii</i>)	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/yeasts/docs/d441f52d43e8c74d0071debbd7ff415c479e1fdf.pdf
Laktia (<i>L. thermotolerans</i>)	https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/yeasts/docs/d73cde822847fab67b535a0a1a3a891a1175c94b.pdf