



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

**INTERACCIONES ENTRE ESPECIES NO-SACCHAROMYCES
EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

José Manuel González Fornell

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGIA



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

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

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

17/01/2020

Índice

1	RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	3
2	INTRODUCCIÓN.....	4
2.1	FERMENTACIÓN.....	4
2.2	EL VINO Y SU MICROBIOLOGÍA	4
2.3	LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES	5
2.4	FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA VS. FERMENTACIÓN INOCULADA.....	5
2.5	<i>TORULASPORA DELBRUECKII</i> Y <i>LACHANCEA THERMOTOLERANS</i>	6
2.6	PROBLEMÁTICA	8
3	HIPÓTESIS	12
4	OBJETIVOS	12
5	METODOLOGÍA	13
5.1	FERMENTACIONES.....	13
5.2	ANÁLISIS.....	15
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
6.1	COMPARACIÓN ENTRE METODOLOGÍAS	19
6.2	COMPARACIÓN DE <i>Lt2+Td5</i> Y <i>Lt2;Td5</i>	21
6.3	COMPARACIÓN DE <i>Td5+Lt2</i> Y <i>Td5;Lt2</i>	25
6.4	COMPARACIÓN DE <i>Lt2+Td5</i> Y <i>Td5+Lt2</i>	29
6.5	COMPARACIÓN DE <i>Lt2;Td5</i> Y <i>Td5;Lt2</i>	33
7	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	37
8	AUTOEVALUACIÓN.....	38
9	BIBLIOGRAFÍA	39
10	ANEXOS.....	44

1 Resumen y palabras clave

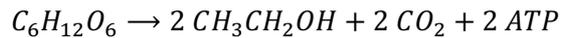
Estudios anteriores han demostrado que una cepa de *Lachancea thermotolerans* (*Lt2*) y una cepa de *Torulaspota delbrueckii* (*Td5*) inhiben la fermentación y limitan el crecimiento de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (*ScR*) durante la fermentación alcohólica. Observada esta inhibición, se quiere comprobar si estas cepas inhiben también la fermentación y el crecimiento de No-*Saccharomyces*. Para ello, se realizaron fermentaciones secuenciales en mosto sintético con *Td5* y *Lt2* variando el orden de la inoculación. En unas de estas fermentaciones se mantenía la primera cepa inoculada al inocular la segunda y en otras se eliminaba esta primera cepa antes de inocular la segunda. Con esta metodología se comprobó si la posible inhibición se daba por contacto célula-célula o por la secreción de alguna molécula. Para llevar el control de las fermentaciones se realizaron diversos análisis, tanto de la cinética del proceso por densidad, como de la evolución de las poblaciones, mediante el uso de diferentes medios diferenciales y por PCR cuantitativa (qPCR) con cebadores específicos. También se estudió la evolución del consumo del nitrógeno presente en el medio. Realizando estos análisis y analizando los resultados obtenidos, se pudo concluir que, en las fermentaciones secuenciales mixtas, tanto *Lt2* como *Td5*, producen una inhibición del crecimiento entre ellas. Sin embargo, se produce una sinergia en la fermentación, acelerándola. Por otro lado, en las fermentaciones secuenciales filtradas, se observó que se producía un efecto inhibitorio en la fermentación, siendo este efecto mayor por parte de *Td5* que de *Lt2*. No obstante, el crecimiento de las levaduras en estas fermentaciones, a pesar de estar afectado, no se inhibía.

Palabras clave: Levaduras, Fermentación, Interacción, No-*Saccharomyces*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii*.

2 Introducción

2.1 Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso llevado a cabo por ciertos microorganismos en condiciones de anaerobiosis. En este proceso, los microorganismos asimilan azúcares, principalmente glucosa y fructosa, y los metabolizan produciendo ATP, etanol y CO₂. Este proceso sigue la siguiente reacción:



Este proceso de fermentación alcohólica es usado en la industria alimentaria para producir ciertos alimentos y bebidas fermentadas, como son la cerveza y el vino. Nos centraremos en el proceso de producción de este último (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2006).

2.2 El vino y su microbiología

El vino es una bebida obtenida tras producirse una fermentación alcohólica usando, como sustrato, mosto de uva y, como organismo fermentador, levaduras (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Las levaduras son organismos unicelulares del reino Fungi. Estos organismos se reproducen mediante reproducción asexual y sexual y pueden realizar tanto respiración aeróbica como fermentación alcohólica. La posibilidad de realizar la fermentación alcohólica es lo que hace interesante industrialmente a las levaduras, ya que permite la fabricación de bebidas y alimentos fermentados tal y como se ha mencionado anteriormente (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Coloquialmente, en la industria enológica, las levaduras se clasifican en 2 grupos: *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces* (Jolly, Varela, & Pretorius, 2014).

Las levaduras *Saccharomyces* pertenecen al grupo de los ascomicetos y se encuentran en sustratos ricos en azúcares. La especie más importante y conocida de este grupo es *Saccharomyces cerevisiae* (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Estas levaduras son muy codiciadas en la industria de los alimentos fermentados debido a su gran capacidad y eficiencia al realizar la fermentación alcohólica y por su tolerancia a altas concentraciones de etanol. Esta segunda característica es la que permite que estas especies se impongan frente a otras a medida que se lleva a cabo una fermentación alcohólica (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Por otro lado, las levaduras No-*Saccharomyces*, son un grupo más heterogéneo debido a que se engloban en este grupo todas las levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces*. Son ascomicetos o basidiomicetos que se reproducen por fisión o por gemación. Se han aislado más de 40 géneros diferentes de estas levaduras del mosto de uva. Las No-*Saccharomyces* tienen menor tolerancia a altas concentraciones de etanol, lo que permite que comiencen la fermentación

alcohólica para la producción del vino, pero generalmente no pueden terminarla (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

2.3 Levaduras No-*Saccharomyces*

Originalmente, la presencia de levaduras No-*Saccharomyces* en el mosto se relacionaba con problemas microbiológicos y con la producción de vinos con defectos. Esto se debía a que ciertas especies de levaduras No-*Saccharomyces* producen acidez volátil y otros compuestos negativos. Este hecho hizo que se tuviera una visión negativa de todas las especies pertenecientes a este grupo. Esta es una de las razones por la que se añadía al mosto de la uva SO₂, ya que las No-*Saccharomyces* son más sensibles a este compuesto que las *Saccharomyces*. El SO₂, junto con el aumento de la concentración de etanol durante la fermentación, eliminaban la presencia de la mayor parte las No-*Saccharomyces* presentes en el mosto. No obstante, estudios recientes (Benito et al., 2015; Jolly et al., 2014) han concluido que algunas especies No-*Saccharomyces* aportan aspectos positivos al vino. Se observó que el uso de No-*Saccharomyces* en la fermentación otorga al vino características deseadas y distintivas de la región, mejorando ciertos aspectos del vino como la complejidad y la integración de los sabores. Se han detectado las mismas especies No-*Saccharomyces* en todo el mundo, aunque lo que varía de un lugar a otro y de una uva a otra son las proporciones en las que se encuentran estas especies. Entre las especies más comunes se encuentran *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia spp.*, *Candida spp.*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum*. Estas especies mencionadas, junto con otras No-*Saccharomyces*, se localizan en mayor concentración en la uva y en el mosto antes de iniciar la fermentación que las levaduras *Saccharomyces* (Jolly et al., 2014).

2.4 Fermentación espontánea vs. Fermentación inoculada

La fermentación se puede realizar de forma espontánea o inoculando el mosto con las levaduras deseadas.

Las fermentaciones espontáneas son aquellas fermentaciones que se producen debido a las especies de levaduras presentes en la uva utilizada para realizar el mosto. Esto produce que la uva sea un factor muy importante a tener en cuenta, no solo por la composición del mosto, sino también porque en su superficie existe una gran variedad de microorganismos fermentadores, mayoritariamente No-*Saccharomyces*. Dependiendo de esta composición de microorganismos, si se realiza este tipo de fermentación, puede variar las características organolépticas del vino producido. La variedad de microorganismos puede verse alterada por daños físicos (golpes o cortes) o daños biológicos (insectos, hongos) en la uva. En estas fermentaciones, al principio del proceso, la población de No-*Saccharomyces* es superior a la población de *Saccharomyces*, sin embargo, a medida que la fermentación avanza, la población de *Saccharomyces* se impone al

resto (Ciani, Comitini, Mannazzu, & Domizio, 2010; Lleixà, Kioroglou, Mas, & Portillo, 2018; Lu, Huang, Lee, & Liu, 2015; Taillandier, Lai, Julien-Ortiz, & Brandam, 2014). Esto es debido a que son menos tolerantes al etanol. A medida que avanza la fermentación, la concentración de azúcares en el mosto disminuye y aumenta la concentración de etanol. Esto hace que se produzca esta imposición. Además, también se ha sugerido que, aparte de esta menor tolerancia al etanol, la población de No-*Saccharomyces* puede disminuir por la síntesis y excreción de alguna molécula producida por *Saccharomyces* que produce amensalismo (Ciani et al., 2010; Taillandier et al., 2014).

Por otro lado, tenemos las fermentaciones inoculadas, donde se inocula una cantidad alta de la levadura deseada en el mosto, de tal forma que, a pesar de existir otras levaduras presentes en el mosto, esta predomine por estar en mayor concentración. Las fermentaciones por inoculación se realizan cuando se busca obtener un vino con unas cualidades muy características. De esta forma, además, se puede obtener un producto más reproducible año tras año que con la fermentación espontánea. Normalmente, solo se inoculaba levaduras *Saccharomyces*, siendo la única levadura usada para la fermentación del mosto. Sin embargo, desde el descubrimiento, ya comentado, de los beneficios que pueden aportar al vino las No-*Saccharomyces*, algunos enólogos coinoculan ambos tipos de levaduras. Para producir vinos mediante fermentación secuencial mixta de levaduras se pueden usar dos metodologías. La primera es coinocular las levaduras No-*Saccharomyces* y las levaduras *Saccharomyces* a la vez en el mosto. De esta forma se simulará el mismo proceso dado en la fermentación espontánea, al principio predominarán las levaduras No-*Saccharomyces*, aunque las *Saccharomyces* acabarán imponiéndose. Algunas bodegas son reacias a esta metodología debido a que se debe medir bien la ratio de inoculación No-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* para obtener un vino con las características deseadas. Por este motivo y por la inhibición y el amensalismo que ejerce las *Saccharomyces* sobre el crecimiento de las No-*Saccharomyces*, prefieren la segunda metodología, la inoculación secuencial. Esta segunda metodología se basa en inocular primero las levaduras No-*Saccharomyces* y, una vez hayan comenzado a fermentar estas levaduras (aproximadamente 48 horas después de la inoculación de la No-*Saccharomyces*), inocular las levaduras *Saccharomyces*. De esta forma, se asegura que las No-*Saccharomyces* inicien la fermentación y doten al vino de las mejoras organolépticas buscadas con estas levaduras. Posteriormente, las *Saccharomyces* acabarán la fermentación porque se terminan imponiendo (Escribano-Viana et al., 2019; Lu et al., 2015; Taillandier et al., 2014).

2.5 *Torulaspota delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans*

De las especies explicadas, dos de las más utilizadas desde un punto de vista comercial son *Torulaspota delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans*.

T. delbrueckii es la especie de levadura más estudiadas de las No-*Saccharomyces*. Esta especie tiene un tamaño un poco menor al de *S. cerevisiae* con la misma forma esférica/elipsoidal. Dentro del género se clasifican las especies por su capacidad de crecer en diferentes sustratos. *T. delbrueckii* se caracteriza por crecer especialmente bien en 2-ceto-D-glucanato y en etanol. Esta levadura se puede reproducir tanto de forma asexual (por gemación) como de forma sexual (formando ascas). *T. delbrueckii* puede aislarse de productos fermentados, del suelo, del zumo de bayas y de la corteza de árboles (Benito, 2018). A pesar de que antes se relacionaba su presencia en el mosto con la producción de un vino defectuoso, actualmente se ha visto que mejora las cualidades organolépticas del vino aumentando la concentración de ciertos ácidos volátiles y reduciendo la concentración de ácido acético y de etanol en el vino, entre otras (Benito, 2018; González-Royo et al., 2015; Lu et al., 2015; Medina-Trujillo et al., 2017). Estas características de *T. delbrueckii* son útiles para producir un vino de mejor calidad con más cuerpo y mejor calidad aromática respetando el carácter inicial de la uva usada para el mosto. Además, ayuda a solventar, en parte, la problemática del cambio climático con respecto al vino. Esto es debido a que el cambio climático acelera la maduración de la uva, acumulándose una mayor concentración de azúcares en la baya, que provoca la producción de vinos con más grado alcohólico. Ciertos estudios (Belda et al., 2017; Jenko & Čuš, 2013; Puertas, Jiménez, Cantos-Villar, Cantoral, & Rodríguez, 2017) han observado que una fermentación secuencial de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* puede reducir entre 0,15 y 0,5% el grado alcohólico comparado con una fermentación realizada únicamente con *S. cerevisiae*. Esta reducción de alcohol se acerca más a las exigencias del mercado enológico que, actualmente, demanda vinos con menor graduación alcohólica. (Benito, 2018).

L. thermotolerans es una especie No-*Saccharomyces* que no ha tenido mucho interés enológico hasta hace pocos años, cuando se descubrió que liberaba ciertas enzimas en el mosto que aportaban una mejora del sabor y del aroma al vino producido. Las levaduras del género *Lachancea sp.* pueden aislarse de muchos nichos ecológicos, entre ellos el suelo, plantas, insectos y el mosto de la uva. De todas las especies del género *Lachancea sp.*, únicamente 3 especies han sido relacionadas con el mosto y su fermentación, estas especies son *L. thermotolerans*, *L. fermentati* y *L. lanzarotensis*. De estas 3 especies, únicamente *L. thermotolerans* ha sido la que ha despertado interés entre los investigadores por su aporte al vino (Porter, Divol, & Setati, 2019). *L. thermotolerans*, si fermenta sola, normalmente no es capaz de acabar la fermentación debido a las altas concentraciones de alcohol producido, es por ello por lo que se suele requerir la presencia de una *Saccharomyces* para acabar la fermentación. En las coinoculaciones, la población de *L. thermotolerans* disminuye a la mitad de la fermentación debido a las altas temperaturas producidas por el carácter exotérmico de la fermentación, a la falta de oxigenación, a la inhibición célula-célula y a la producción de compuestos tóxicos por parte de la otra especie de levadura. Sin embargo, se ha visto que las inoculaciones secuenciales tienen un efecto positivo sobre su

resistencia al alcohol, haciendo que la población resista durante más tiempo (Porter et al., 2019). Diversos estudios (Beckner Whitener et al., 2015; Benito, Calderón, Palomero, & Benito, 2016; Domizio, Liu, Bisson, & Barile, 2014; Gobbi et al., 2013) reportan características organolépticas positivas a las fermentaciones realizadas con *L. thermotolerans*. No obstante, otros estudios (Belda et al., 2016; Hranilovic et al., n.d.; Vilela, 2018) desmienten dichas mejoras. Esto es debido a que los estudios realizados no fueron estandarizados y en cada uno se usaron cepas de *L. thermotolerans* diferentes, uvas diferentes y condiciones diferentes. Por ello, a pesar de que esta especie de levadura tiene mucho potencial para producir vinos de mejor calidad, se requiere todavía mucho estudio en este campo para comprender mejor como aprovechar estas cualidades que nos aporta *L. thermotolerans* (Porter et al., 2019).

2.6 Problemática

Estudios anteriores realizados en el grupo de investigación de Biotecnología Enológica de la URV demostraron que una cepa de *T. delbrueckii Td5* mostraba un comportamiento fuera de lo común. Este comportamiento quedó patente en experimentos realizados con esta cepa *Td5* y con una cepa de *S. cerevisiae ScR*.

El experimento consistía en inocular *Td5* en mosto sintético a 16°C y, tras 48 horas (cuando ya había comenzado la fermentación), se inculaba la cepa *ScR* (*Td5+ScR*). Se observó que *ScR* no se imponía a *Td5* (Figura 1 y 2). Esto es llamativo, puesto que, como se ha comentado anteriormente y como se ha descrito en trabajos como el de Escribano-Viana et al., 2019, *S. cerevisiae* se suele imponer a *T. delbrueckii*.

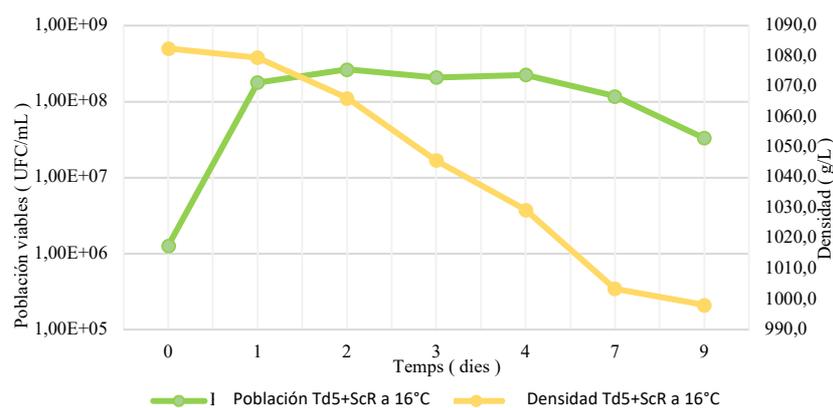


Figura 1. Evolución de la densidad y población viable en una fermentación secuencial mixta secuencial realizada por *Td5* y *ScR* a 16°C.

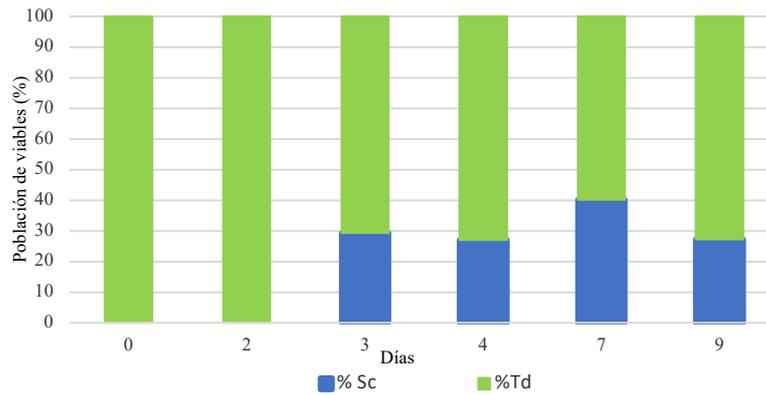


Figura 2. Porcentaje de las poblaciones de Td5 y de ScR en la fermentación secuencial a lo largo de los días.

Una vez vista esta falta de imposición por parte de *ScR*, se plantearon las posibles razones a las cuales se debía este fenómeno de inhibición del crecimiento de *ScR*. Una de las posibilidades planteadas fue que se produjera una inhibición por contacto célula-célula. Para probar este punto se realizó la misma fermentación, pero eliminando *Td5* del mosto antes de inocular *ScR* a las 48 horas (*Td5*; *ScR*). En este experimento se observó que, tras eliminar *Td5* y la posterior inoculación de *ScR*, la fermentación se para y no continúa (Figura 3). Esto confirmó que la falta de imposición *ScR* no se debía a una inhibición de contacto célula-célula.

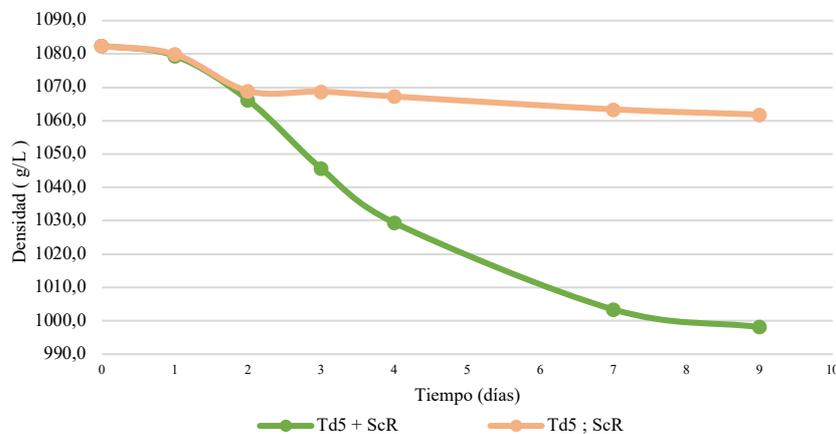


Figura 3. Evolución de las densidades del mosto en las fermentaciones Td5+ScR y Td5;ScR a lo largo del tiempo.

Otro posible motivo de la inhibición del crecimiento de *ScR* era la temperatura. Por ello, se realizaron fermentaciones individuales de ambas cepas a 16°C y a 22°C y se estudió la cinética de estas fermentaciones mediante la densidad. Esta cinética se comparó con la cinética de fermentaciones secuenciales filtradas (inicialmente *Td5* y posteriormente eliminando *Td5* e inoculando *ScR*) realizadas a 22°C y 16°C. En estas fermentaciones se observó que la cinética de las fermentaciones individuales de estas dos cepas es más rápida que la de las fermentaciones

secuenciales filtradas. En todos los casos, como era de esperar, a 22°C la fermentación termina más rápido. Además, *ScR* fermenta mucho más rápido que *Td5*. No obstante, cabe destacar la alta capacidad fermentativa de *Td5*, ya que es capaz de acabar la fermentación sin la necesidad de la adición de una cepa *Saccharomyces*. Por otro lado, en las fermentaciones secuenciales mixtas, la realizada a 22°C se ralentiza notablemente con respecto a las fermentaciones individuales, aunque la fermentación acaba terminando. Sin embargo, la fermentación secuencial mixta a 16°C se para tras la inoculación de *ScR* (Figura 4). Esto nos confirma que *Td5* es la causante de la inhibición de la fermentación por parte de *ScR*. Además, nos indica que la inhibición de este crecimiento es mayor a 16°C que a 22°C, donde puede fermentar, pero con mucha mayor lentitud.

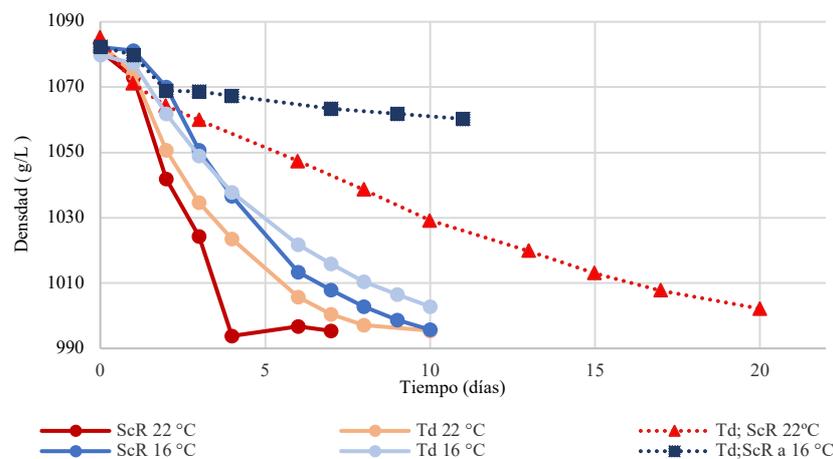


Figura 4. Comparación de las diferentes fermentaciones realizadas por *Td5* y *ScR*, tanto de forma individual como de forma secuencial, inoculando primero *Td5* y, tras 48 h., eliminándola e inoculando *Td5*, a 16°C y a 22°C.

Otra hipótesis planteada para explicar que *ScR* no se impusiese fue la falta de nutrientes. Podría ser que en el momento de inocular *ScR*, faltara algún nutriente necesario para su desarrollo. Por ello, se realizó un experimento donde se añadían diversos nutrientes tras la eliminación de *Td5* y antes de la inoculación de *ScR* para determinar qué tipo de nutriente podría ser el limitante. Como se observa en la Figura 5, solo se consigue una restauración parcial de la fermentación de *ScR* cuando se adicionan todos los nutrientes posibles de encontrarse en déficit. Esto podría indicar que la inhibición no se produce por el déficit de un único nutriente, sino que se produce por un desajuste en la concentración de la matriz de nutrientes completa.

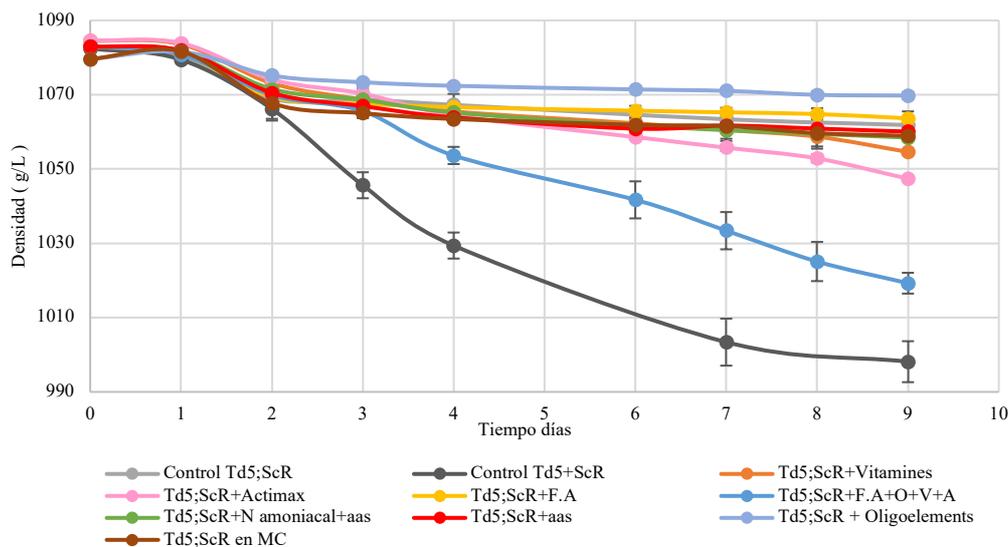


Figura 5. Comparación de diversas fermentaciones secuenciales. A cada una se le ha añadido un nutriente diferente tras la filtración a las 48 horas y antes de la inoculación de *ScR*. Td5;ScR: Fermentación secuencial filtrada. Td5+ScR: Fermentación secuencial mixta. Actimax: mezcla de vitaminas con compuestos orgánicos nitrogenados. Aas: alfa-amínico. MC: mosto concentrado. FA: Factores de anaerobiosis. O: oligoelementos. V: Vitaminas. A: Actimax

Por último, la última hipótesis que se planteó para explicar la inhibición del crecimiento de *ScR* fue la presencia de sustancias inhibitoras sintetizadas por *Td5*. Se han registrado la síntesis de proteínas killer en varias cepas *Saccharomyces* y *No-Saccharomyces*. Esta propiedad es interesante debido a que permite controlar posibles contaminaciones del mosto por parte de otras levaduras. Además, a las cepas *No-Saccharomyces*, les permite ser más competitivas frente a las *Saccharomyces* y poder perdurar más tiempo en la fermentación y, por tanto, tener mayor influencia en las características organolépticas del vino. Entre las especies *No-Saccharomyces* en las que se ha descrito el fenotipo killer, la que presenta un mayor rango de inhibición del crecimiento de especies contaminantes del mosto es *T. delbrueckii* (Ramírez, Velázquez, Maqueda, López-Piñeiro, & Ribas, 2015; Villalba, Susana Sáez, del Monaco, Lopes, & Sangorrín, 2016). Por tanto, una posible explicación sería que la cepa *Td5* secretara una proteína killer que afectara a *ScR* e impidiera el crecimiento de esta última. Sin embargo, esta hipótesis quedó descartada debido a que estudios anteriores de este grupo de investigación confirmaron que *Td5* no mataba a las levaduras *ScR*.

Tras demostrar esta inhibición de *Td5* hacia *ScR*, quisieron saber si estas inhibiciones eran específicas de cepas. Por ello, repitieron estos experimentos usando otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Torulaspora delbrueckii*. Los resultados de estos experimentos fueron similares a los obtenidos con *ScR* y *Td5*. Esto demostró que esta inhibición no es específica de cepa, sino que es común en estas especies. Este hecho agrava el problema planteado, debido a que *T. delbrueckii* es una *No-Saccharomyces* muy utilizada en las fermentaciones vínicas. Si esta especie inhibe el

crecimiento y fermentación de *S. cerevisiae* perderemos eficiencia a la hora de producir vino con fermentaciones secuenciales usando estas levaduras.

Tras observar que estas inhibiciones no eran específicas de cepas, quisieron comprobar si eran específicas de especie, por lo que decidieron realizar una fermentación secuencial con otra No-*Saccharomyces*. De esta forma comprobarían si la inhibición de la fermentación se produce específicamente por *T. delbrueckii* u otras especies No-*Saccharomyces* también la producen, por ello, se repitieron algunos de los experimentos con una cepa de *Lachancea thermotolerans*, *Lt2*. Para realizar este experimento se inoculó *Lt2* en mosto sintético a 16°C y, tras 48 horas, se eliminó *Lt2* y se inoculó *ScR* (*Lt2;ScR*) (Figura 6). Se observó que se producía una inhibición del crecimiento, así como una ralentización de la fermentación, tras la eliminación de *Lt2* y la inoculación de *ScR*, por lo que parecía que *Lt2* también influenciaba negativamente a *ScR*. Por ello, se demostró que la inhibición del crecimiento y de la fermentación de *ScR* no era específica de *Td5*, sino que otras cepas No-*Saccharomyces*, como *Lt2*, también la producían.

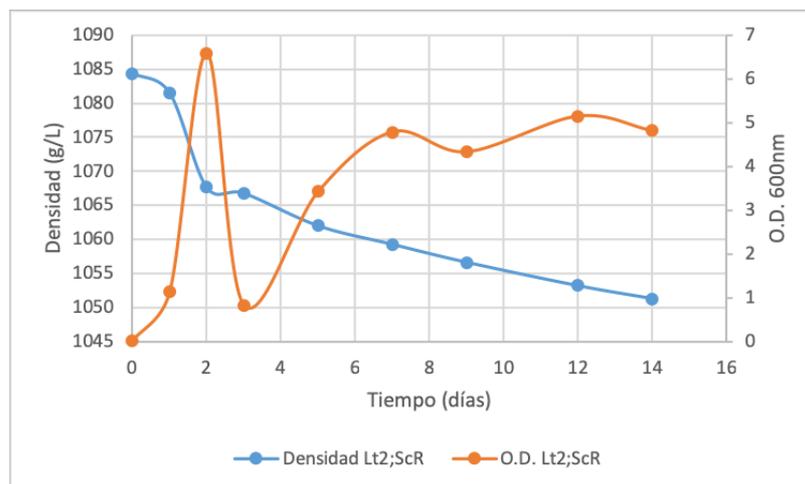


Figura 6. Seguimiento de la fermentación secuencial de *Lt2* y *ScR* a 16°C.

3 Hipótesis

Visto que las cepas *Td5* y *Lt2* son capaces de inhibir cepas de *S. cerevisiae*, la hipótesis de este trabajo es que esta inhibición no es específica contra *S. cerevisiae*, sino que pueden inhibir otras especies de levaduras.

4 Objetivos

El objetivo de este trabajo es comprobar si *Td5* y *Lt2* inhiben el crecimiento y la fermentación entre ellas. De esta forma, se demostrará si la inhibición producida por parte de *Td5* y *Lt2* es específica para *ScR* o afecta a cepas de levaduras No-*Saccharomyces*.

Para ello, se realizarán diversas fermentaciones secuenciales en mosto sintético. Para realizar estas fermentaciones se usarán como organismos fermentadores *Td5* y *Lt2*. El estudio de estas fermentaciones se llevará a cabo mediante el análisis de la cinética de fermentación por densidad del mosto y de la evolución de las poblaciones por densidad óptica, crecimiento en placa con medio diferencial y PCR cuantitativa (qPCR).

5 Metodología

5.1 Fermentaciones

5.1.1 Microorganismos utilizados

Para llevar a cabo las diversas fermentaciones se usaron dos cepas No-*Saccharomyces* específicas. Ambas cepas eran considerablemente buenas fermentadoras porque, a pesar de ser No-*Saccharomyces*, eran capaces de terminar la fermentación. Estas cepas usadas, fueron una cepa de *Torulaspota delbrueckii* (a la cual denominaremos *Td5*) y una cepa de *Lachancea thermotolerans* (que nombraremos como *Lt2*), ambas cepas proporcionadas por Agrovin S.A. (España).

5.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para las fermentaciones fue un mosto sintético a pH=3,3 descrito por Beltran, Novo, Rozès, Mas, & Guillamón, 2004 (Anexo 1).

5.1.3 Fermentaciones

Para realizar el experimento se llevaron a cabo 2 tipos de inoculaciones, cada una con un propósito diferente.

5.1.3.1 *Td5+Lt2* y *Lt2+Td5*

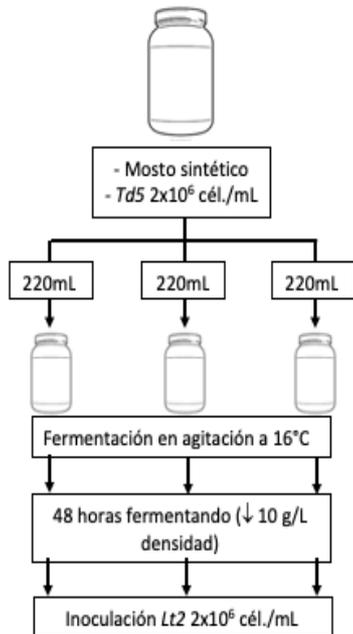


Figura 7. Diagrama de flujo del experimental 1.

Esta metodología permitió observar el comportamiento de las levaduras cuando interactúan entre sí en un mismo medio.

Se prepararon 700 mL de mosto sintético y se inocularon con *Td5* para obtener una concentración de $2 \cdot 10^6$ cél./mL. Después, se repartió en tres fermentadores (220 mL en cada uno) y se incubaron a 16°C en agitación (120 rpm). Se dejó fermentar durante 48 horas bajo estas condiciones para que comenzara la fermentación. Una vez pasado este tiempo, se inoculó *Lt2* en cada fermentador de tal forma que cada uno tuviera una concentración de $2 \cdot 10^6$ cél./mL de esta levadura. Se continuó fermentando el mosto a 16°C en agitación hasta que la concentración de azúcares reductores fuera menor de 2 g/L o hasta que la densidad dejara de disminuir durante varios días, lo que significaba que la fermentación se había parado.

Durante todo el proceso de fermentación se tomaron muestras que fueron analizadas siguiendo varios métodos para determinar la cinética de la fermentación y las poblaciones presentes.

Este proceso se repitió invirtiendo el orden de las cepas. De esta forma se observó tanto el efecto de *Td5* sobre *Lt2*, como el de *Lt2* sobre *Td5*.

5.1.3.2 *Td5;Lt2* y *Lt2;Td5*

Esta metodología permitió comprobar si, en el caso de producirse una interacción entre cepas en *Td5+Lt2* o en *Lt2+Td5*, esta era debida al contacto célula-célula, a la síntesis de algún determinado compuesto o a una competición por los nutrientes del mosto.

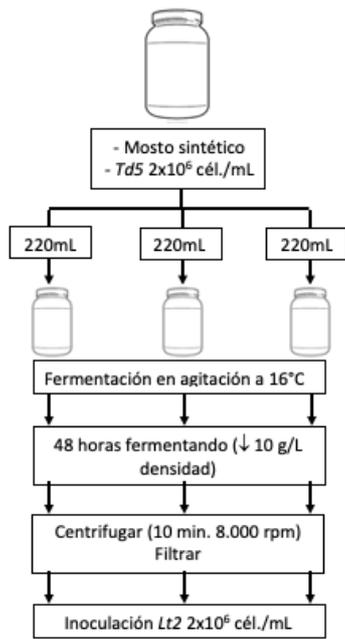


Figura 8. Diagrama de flujo del experimental 2.

Se prepararon 700 mL de mosto sintético y se inocularon con *Td5* para obtener una concentración de 2×10^6 cél./mL. Después, se repartió en tres fermentadores (220 mL en cada uno) y se incubaron a 16°C en agitación (120 rpm). Se dejó fermentar durante 48 horas bajo estas condiciones para que comenzara la fermentación. Una vez pasado este tiempo, el mosto de cada fermentador se centrifugó 10 minutos a 8.000 rpm a 22°C. Posteriormente, el sobrenadante se filtró mediante una filtración al vacío usando filtros S-Pack de poro de 0.22µm (Millipore, ref: GSWG047S). De esta manera se eliminaron las levaduras *Td5* del medio. Una vez eliminada *Td5*, se inoculó *Lt2* en cada fermentador, de tal forma que cada uno tuviera una concentración de 2×10^6 cél./mL de esta levadura. Se continuó fermentando el

mosto a 16°C en agitación hasta que la concentración de azúcares reductores fuera menor de 2 g/L o hasta que la

densidad dejara de disminuir durante varios días, lo que significaba que la fermentación se había parado.

Durante todo el proceso de fermentación se tomaron muestras que fueron analizadas siguiendo varios métodos para determinar la cinética de la fermentación y las poblaciones presentes.

Este proceso se repitió invirtiendo el orden de las cepas. De esta forma se observó tanto el efecto de *Td5* sobre *Lt2*, como el de *Lt2* sobre *Td5*.

5.2 Análisis

Para realizar el análisis de la cinética de las fermentaciones y de las poblaciones presentes en el mosto se usaron diversas técnicas microbiológicas, químicas y bioquímicas.

5.2.1 Toma de muestra

Se llevó a cabo una toma de muestra para realizar los análisis pertinentes cada 24 horas, a excepción de los fines de semana, donde no se tomaban muestras. De cada fermentador se tomaba 10 mL. De estos 10 mL, se tomaba 1 mL para medir la densidad óptica y un 1 mL que era centrifugado 5 min a 12.000 rpm para obtener las levaduras, que se guardaban a -20°C para su posterior análisis por qPCR. También se tomaban 100 µL para realizar las diluciones pertinentes para llevar a cabo la siembra en placa con medio diferencial. Tras tomar todas estas alícuotas, la muestra se centrifugaba 5 min. a 7.800 rpm. Del resultante de esta centrifugación, 1 mL del

sobrenadante se guardaba a -20°C , para posteriormente analizar su composición, y el resto del sobrenadante se usaba para el análisis de la densidad del mosto.

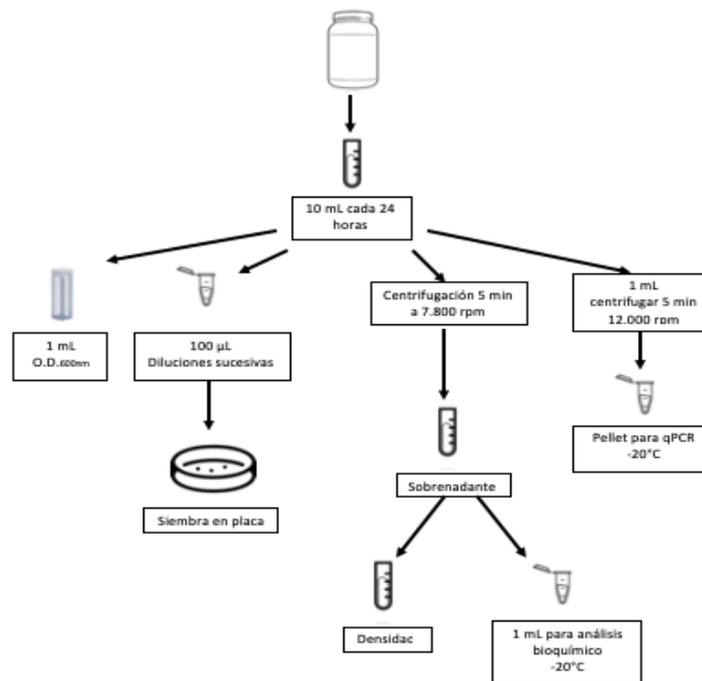


Figura 9. Esquema del proceso de toma de muestra y de su procesado.

5.2.2 Densidad

La densidad es un parámetro que indica el estado de la fermentación. A medida que avanza la fermentación, la densidad del medio disminuye debido al consumo de azúcares y a la producción de etanol. Por este motivo, si la densidad no baja quiere decir que no hay producción de etanol ni consumo de azúcares, lo que significa que la fermentación se ha parado. De esta forma, la densidad inicial del mosto era aproximadamente 1080 g/L y la densidad cuando la fermentación terminaba era aproximadamente 990 g/L.

Para medir la densidad se usó un densímetro electrónico 30 PX, (Mettler Toledo, Hospitalet del Llobregat, España).

5.2.3 Población total

La población total se siguió por densidad óptica. A medida que aumenta la población de levaduras, la densidad óptica aumenta. Para aplicar este método se debe medir la absorbancia de la muestra homogeneizada a una longitud de onda de 600 nm. Se utilizó el espectrofotómetro Thermospectronic Genesys 10 UV, (Pracisa + Giralt, Madrid, España)

5.2.4 Población viable

Para el análisis de la población viable se utilizó el medio de cultivo diferencial Difco WL Nutrient Broth (BD, ref: 247110) (WLN). Cultivar la muestra en este medio permite, no sólo determinar la población de levaduras viables del mosto, sino también diferenciar especies gracias a las diferentes morfologías que pueden presentar las colonias de levaduras. En el caso de las dos cepas tratadas en este trabajo, *Td5* presenta colonias circulares blancas, que cuando se envejecen muestran un color verde claro en el centro, mientras que *Lt2* muestra colonias redondas de un color verde intenso (Figura 10).



Figura 10. Morfología en medio WLN de las dos cepas utilizadas en el estudio (*Td5* y *Lt2*)

Se realizó este análisis para medir de forma cuantitativa las poblaciones viables de las dos cepas presentes en las fermentaciones.

Para la siembra en WLN (preparación del medio en Anexo 2), se realizaron diluciones seriadas de la muestra. Posteriormente se inocularon 100 μ L de la dilución correspondiente y se esparció este inóculo por la placa agitando con pequeñas bolas de cristal autoclavadas. Estas bolas se retiraron posteriormente a la agitación. Una vez sembrada, se dejó la placa en una estufa a 28°C durante 48 horas. Tras estas 48 horas se realizó el recuento de colonias.

5.2.5 PCR cuantitativa (qPCR)

El estudio de la población de las dos especies utilizadas en este trabajo también se realizó por qPCR. Los primers usados en la qPCR son específicos de especie, por ello, debemos hacer una qPCR por cada especie que queramos cuantificar. Estos primers son los siguientes:

Tabla 1. Secuencia de los primers usados en la qPCR para cada una de las especies

Secuencia del primer	Organismo	Nombre	Referencia
5'-CAAAGTCATCCAAGCCAGC-3'	<i>T. delbrueckii</i>	Tods L2	(Zott et al., 2010)
5'-TTCTCAAACAATCATGTTTGGTAG-3'	<i>T. delbrueckii</i>	Tods R2	
5'-CGCTCCTTGTGGGTGGGGAT-3'	<i>L. thermotolerans</i>	LTH2-F	(García, Esteve-Zarzo, Crespo, Cabellos, & Arroyo, 2017)
5'-CTGGGCTATAACGCTTCTCC-3'	<i>L. thermotolerans</i>	LTH2-R	

Para realizar la qPCR se debió realizar anteriormente una extracción de ADN de la muestra. Esta extracción se realizó usando el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ref: 69104) (Anexo 3). Una vez realizada la extracción de ADN, en una placa con 96 pocillos se añadió 2 µL de dicha muestra de ADN extraída y 18 µL del Master Mix realizado con los reactivos comerciales TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNasaH Plus), Bulk (Takara, ref: RR820L) y con los primers específicos de la especie a cuantificar (composición de Master Mix en Anexo 4). Esta placa se insertó en el termociclador QuantStudio 5 Real-Time PCR Instrument, (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) (programa utilizado en Anexo 4). El termociclador aportó las curvas de amplificación producidas. Las curvas de amplificación son la representación del nivel de fluorescencia emitido por el Cyber Green al unirse al ADN bicatenario frente al número de ciclos producidos por el termociclador. Con estas curvas se obtuvieron los Ct. El Ct (umbral de ciclo) es el ciclo donde se produce la intersección entre la curva de amplificación y una línea umbral. Estos Ct se interpolaron a una recta patrón realizada con diluciones de una concentración conocida de ADN de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* (rectas patrones en Anexo 4). Tras esta interpolación, se obtuvo la población total de la levadura analizada.

5.2.6 Análisis bioquímicos

Los azúcares reductores (glucosa y fructosa) así como el nitrógeno, tanto orgánico como inorgánico, se determinaron usando kits enzimáticos. Para la determinación de los azúcares se utilizó el kit de *BioSystems* (*Biosystems* S.A, ref: 12800), mientras que para el análisis de nitrógeno se utilizaron los kits enzimáticos TDI (*Tecnología difusión Ibérica* S.L, nitrógeno amoniacal: Ref. 2407 y nitrógeno α-amínico: Ref. 2408).

Los azúcares reductores se midieron cuando la densidad de la muestra es ≤ 992 g/L. De esta forma se confirmaba si la concentración de azúcares reductores era ≤ 2 g/L y, por tanto, si la fermentación había acabado.

La medición de nitrógeno, tanto orgánico como inorgánico, se realizó en el momento antes de iniciar la fermentación y los 3 días posteriores. Esta medición se efectuó para comprobar si una posible inhibición del crecimiento de la segunda levadura inoculada se producía por una falta de nitrógeno, uno de los nutrientes que pueden limitar el crecimiento de la levadura.

Para realizar la medición de estos nutrientes se debió de centrifugar la muestra 5 minutos a 7.800 rpm. El pellet se descartó y con el sobrenadante se llevaron a cabo los análisis, utilizando el multianalizador automático Miura One, (TDI S.L, Gavà, España).

6 Resultados y discusión

6.1 Comparación entre metodologías

El aumento de la biomasa total se evaluó por la medición de la O.D. a 600 nm. Este análisis permite determinar toda la microbiota presente en la muestra, por tanto, no nos permite determinar si existen contaminaciones. Además, únicamente aporta una visión semi-cuantitativa de este aumento de biomasa. Para obtener una visión cuantitativa, se utilizó el conteo de colonias mediante la siembra en placa y la qPCR. La siembra en placa da información sobre el número de levaduras viables presentes en el mosto. Si el medio sembrado es un medio diferencial, permite conocer el número de las diferentes poblaciones de levaduras. Por otro lado, la qPCR permite detectar y cuantificar de forma simultánea diversas especies de microorganismos. En este estudio se utilizaron primers específicos para cada especie de levadura. El uso de estos primers específicos permitió seguir la cinética poblacional de cada una de las especies estudiadas (Figura 11).

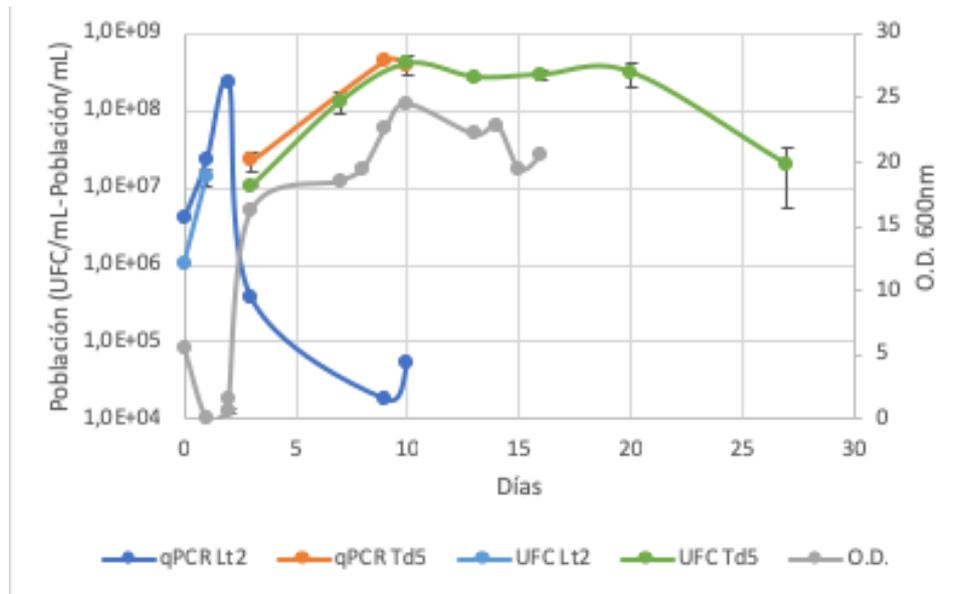


Figura 11. Comparación entre los resultados de la qPCR, la siembra en placa en medio diferencial y la O.D. a 600 nm de la fermentación Lt2;Td5.

Comparando los datos de la qPCR con los datos de la siembra en placa, se aprecia que aportan resultados muy similares. No obstante, los niveles poblacionales aportados por la qPCR suelen ser mayores que los aportados por la siembra en placa. Esto se debe a que en la qPCR se recuentan totales, mientras que la siembra en placa detecta únicamente levaduras viables. Además, la técnica de la qPCR es una técnica más sensible, detectando poblaciones de levaduras menores que la siembra en placa. Esta alta sensibilidad permite detectar *Lt2* tras el día 2 en las fermentaciones secuenciales filtradas. Esto podría indicar que la filtración no ha sido totalmente efectiva o que se ha producido una contaminación posterior al filtrado. Esta detección de la cepa tras el filtrado sucede tanto en *Lt2;Td5* como en *Td5;Lt2*, aunque la población es muy inferior a la población de la cepa inoculada tras el filtrado, por lo que su influencia en el proceso es mínima.

Si los resultados de estas dos técnicas descritas se observan junto con los resultados de la O.D., se puede apreciar una correlación. Es común observar que la O.D. aumenta cuando aumentan las poblaciones de levaduras. Esto demuestra que el aumento de la biomasa se debe al aumento de las levaduras deseadas y no de un agente contaminante. En este caso, se observa además una disminución de la O.D. junto con una disminución de las poblaciones, tanto por qPCR como por placa, el día 2. Este descenso es debido a que dicho día se filtro el mosto y, posteriormente, se volvió a inocular (Figura 11).

Debido a la similitud entre los datos proporcionados por la qPCR y los proporcionados por la siembra en placa y a la mayor información que estos primeros aportan, para comentar el crecimiento poblacional de los resultados posteriores, se usará la O.D. y los datos de la qPCR para evitar redundancias.

6.2 Comparación de *Lt2+Td5* y *Lt2;Td5*

Se compararon las fermentaciones *Lt2+Td5* con las fermentaciones *Lt2;Td5*. Esta comparación permite conocer el efecto de la presencia o ausencia de *Lt2* en el mosto tras la inoculación de *Td5*, habiendo comenzado la fermentación *Lt2*. Estos resultados despejan dudas sobre si la causa de la interacción de *Lt2* con *Td5* se debe a la presencia de *Lt2* o a algún compuesto secretado o consumido por *Lt2*.

6.2.1 Cinética de fermentación

El análisis de la variación de la densidad de un mosto proporciona la cinética de fermentación. A medida que una fermentación avanza, se produce un consumo de azúcares y una producción de etanol, produciendo una disminución de la densidad del medio

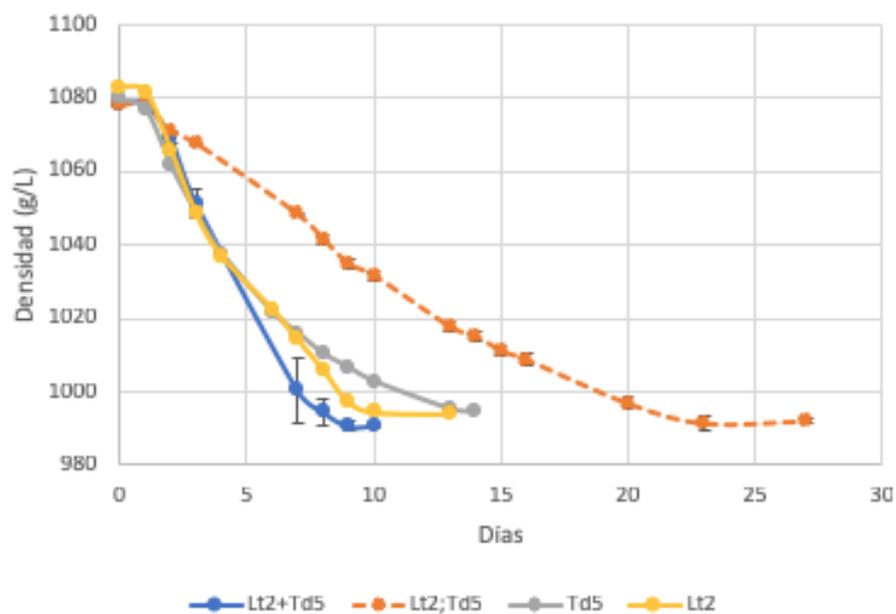


Figura 12. Variación de la densidad de fermentaciones secuenciales mixtas (*Lt2+Td5*), fermentaciones secuenciales filtradas (*Lt2;Td5*) y fermentaciones individuales (*Lt2* y *Td5*).

Como se observa en la Figura 12, hay diferencias entre la cinética de fermentación de la fermentación secuencial mixta y la fermentación secuencial filtrada. Por un lado, en *Lt2+Td5*, la densidad disminuye en pocos días, acabando la fermentación incluso antes que las fermentaciones individuales. Por otro lado, el descenso de la densidad en la fermentación *Lt2;Td5* se ve ralentizado. Esta ralentización comienza tras la filtración y la inoculación de *Td5*. A pesar de que la fermentación acaba, el fin de la fermentación se produce en el día 24, mucho más tarde que las fermentaciones individuales.

Este comportamiento en la cinética de fermentación es destacable y llamativo. Por una parte, que *Lt2+Td5* termine la fermentación antes que las fermentaciones individuales contradice estudios anteriores, donde se demuestra que las fermentaciones secuenciales de *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* tienen una cinética de fermentación más lenta con respecto a las fermentaciones individuales de *S. cerevisiae* (Benito, Calderón, & Benito, 2017; Benito et al., 2016). No obstante, coincide con interacciones descritas entre No-*Saccharomyces* (Benito et al., 2017). Estas interacciones se daban entre *L. thermotolerans* y *S. pombe*. Cuando se inoculaban secuencialmente *L. thermotolerans* y *S. pombe*, la fermentación se aceleraba, acabando antes que una fermentación individual de *S. pombe* (Benito et al., 2017). Esto demuestra que *L. thermotolerans* tiene un efecto negativo sobre *S. cerevisiae*, pero un efecto positivo sobre otras No-*Saccharomyces*. Este efecto se podría dar porque *S. cerevisiae* fermenta bien y puede acabar la fermentación sin problemas y, por tanto, la presencia de otra levadura produce una competición por los nutrientes, disminuyendo la fermentación. Sin embargo, las No-*Saccharomyces*, por lo general, no pueden acabar la fermentación. Por ello, la presencia de otra levadura produciría un aumento de los organismos fermentadores, acelerando la fermentación. No obstante, este no es nuestro caso, debido a que tanto *Lt2* como *Td5* son muy buenos fermentadores y pueden acabar las fermentaciones en pocos días. Además, está el hecho de que en ausencia de *Lt2*, al inocular *Td5*, la fermentación se ralentiza notablemente. Si el aumento de la fermentación en *Lt2+Td5* se debiera a un aumento de los microorganismos fermentadores, *Td5* en *Lt2;Td5* tendría una cinética similar a la fermentación individual de *Td5*. Aunque, también cabe la posibilidad de que *Td5* no fermente igual en esta fermentación secuencial filtrada que en la fermentación individual porque *Lt2* haya consumido los macro y micronutrientes, ralentizando así el crecimiento de *Td5* y, por ende, ralentizando así su fermentación.

Resumiendo, la aceleración de la cinética de fermentación en *Lt2+Td5* podría deberse a un aumento de la biomasa. Por otro lado, la ralentización de la cinética de fermentación de *Lt2;Td5* se puede deber a una ralentización en la cinética de crecimiento poblacional de *Td5*. Esta ralentización podría deberse a un déficit de nutrientes en el mosto en el momento de inocular *Td5*.

6.2.2 Crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional permitirá conocer si realmente la ralentización de la fermentación *Lt2;Td5* se debe a una disminución del crecimiento de *Td5*. Además, aportará información sobre las poblaciones de levaduras de la fermentación *Lt2+Td5*.

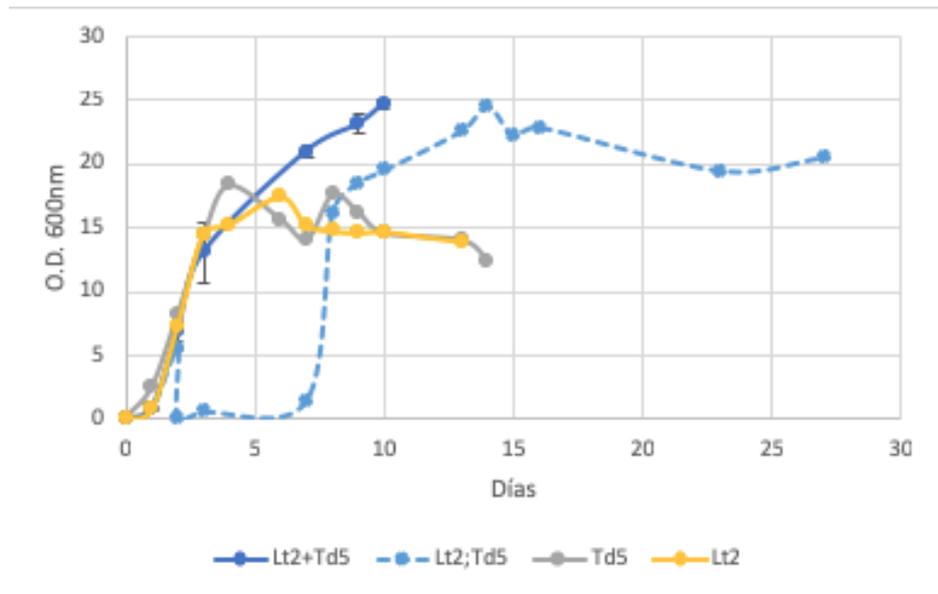


Figura 13. Variación de la O.D. a 600nm de las fermentaciones secuenciales mixtas (Lt2+Td5), las fermentaciones secuenciales filtradas (Lt2;Td5) y fermentaciones individuales (Td5 y Lt2).

Observando la Figura 13 se aprecia como, tanto la fermentación secuencial mixta como la fermentación secuencial filtrada, tienen durante los primeros días una cinética de producción de biomasa similar a las fermentaciones individuales. No obstante, en la fermentación secuencial filtrada, cuando se filtra el mosto y se inocula *Td5*, esta no crece hasta el día 7. Tras este día, la biomasa comienza a aumentar notablemente, alcanzando niveles superiores a las fermentaciones individuales. Por otro lado, la fermentación secuencial mixta, cuando se inocula *Td5*, se produce una variación de la cinética de producción de biomasa con respecto a las fermentaciones individuales. Esta variación produce que la O.D. alcance niveles superiores a las fermentaciones individuales, tal y como ocurre con las fermentaciones secuenciales filtradas. Sin embargo, los niveles de biomasa en esta fermentación alcanzan niveles incluso superiores a los alcanzados por la fermentación secuencial filtrada.

Observando la Figura 14, se corroboran los resultados expuestos por la O.D. Además, se constata que, de la biomasa presente en el mosto de la fermentación secuencial mixta, la mayor parte es *Lt2* y una pequeña parte es *Td5*. En esta fermentación, la cepa *Lt2* alcanza niveles altos en el día 3, sin embargo, el crecimiento de la cepa *Td5* en esta fermentación está inhibido, produciéndose un crecimiento de menos de un orden de magnitud. Esto no ocurre en las fermentaciones secuenciales filtradas, donde *Td5* es capaz de crecer hasta alcanzar poblaciones de 10^8 células/mL.

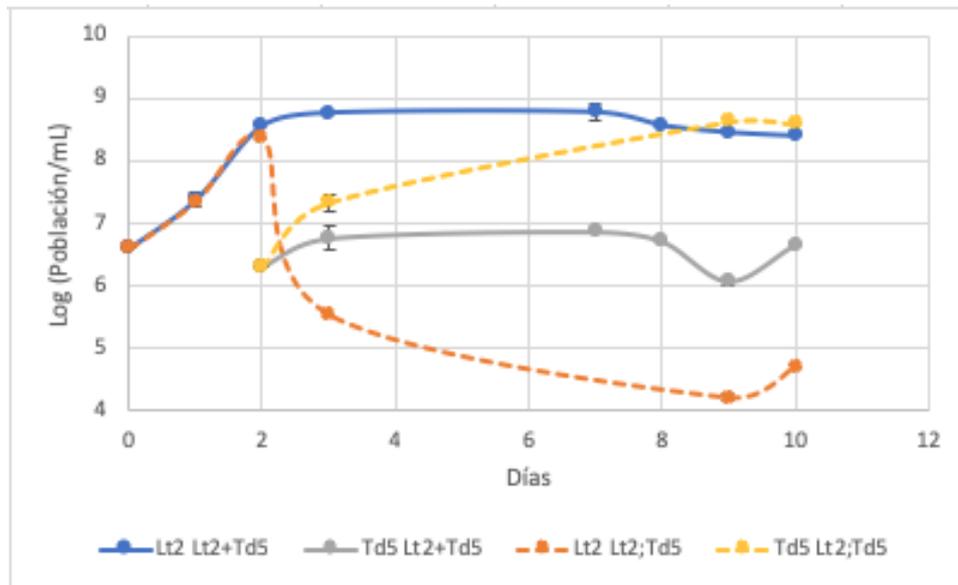


Figura 14. Comparación de la población total (qPCR) de las diferentes especies en las fermentaciones secuenciales filtradas (Lt2;Td5 y Td5;Lt2)

Comparando estos datos con los del apartado anterior se observa que, a pesar de existir una diferencia entre las cinéticas de fermentación de *Lt2+Td5* y de *Lt2;Td5*, no existe tanta diferencia entre la biomasa de ambas cepas.

Por una parte, se observa que, en ausencia de *Lt2*, el crecimiento de *Td5* se retrasa, pero es capaz de crecer hasta los niveles normales. Esto demuestra que *Td5* tiene los nutrientes suficientes para crecer y que, si *Lt2* sintetiza algún componente, este no llega a inhibir completamente el crecimiento de *Td5*. Sin embargo, esto descarta la teoría expuesta en el apartado anterior sobre la ralentización de la fermentación *Lt2;Td5*, ya que *Td5* no tiene problemas para crecer. Si *Td5* crece hasta alcanzar poblaciones normales, *Lt2* debe secretar algo al medio que inhiba la fermentación de *Td5* al ser inoculada. Esto no contradice los resultados obtenidos de la fermentación *Lt2+Td5*, ya que se observa como la población de *Td5* no es significativa en comparación con la población de *Lt2* y, por tanto, *Lt2* podría ser la única levadura que estuviera fermentando. No obstante, el hecho de tener tan poca población de *Td5*, también nos desmiente la teoría del apartado anterior donde se planteaba que la fermentación se acelera por una mayor población de organismos fermentadores. Por este motivo, se podría plantear la producción de una sinergia entre *Lt2* y *Td5*, donde la inoculación a las 48 horas de *Td5* aumenta el rendimiento de la fermentación.

Por otro lado, se observa como la presencia de *Lt2* en el mosto produce una inhibición del crecimiento de *Td5*. Se ha descrito como, en fermentaciones secuenciales de *L. thermotolerans* con *S. cerevisiae* y con otras especies No-*Saccharomyces*, la población de *L. thermotolerans* descendía al inocular estas otras especies (Benito et al., 2017, 2016). Estos estudios achacaban esta disminución a la poca actividad fermentativa de *L. thermotolerans* y a la mayor competencia

de *S. cerevisiae* y de las otras No-*Saccharomyces* fermentando. No obstante, como se ha observado, *Lt2* es una cepa con una alta capacidad fermentativa. Por ello, al inocular *Td5* en una concentración menor en la que se encuentra *Lt2*, *Lt2* puede ser competitiva frente a *Td5*. Por tanto, *Lt2* podría inhibir el crecimiento por contacto célula-célula, debido a que la población de *Lt2* es mucho mayor. Otra posibilidad es que se produzca una competencia por los nutrientes entre *Lt2* y *Td5*, tanto por los macronutrientes como por los micronutrientes. En esta competencia por los nutrientes, *Lt2* estaría favorecida. Este hecho se daría, no solo por la mayor población, sino porque se ha descrito que, en inoculaciones secuenciales, al inocular *S. cerevisiae* tras *L. thermotolerans*, las capacidades fermentativas de algunas cepas de *L. thermotolerans* aumentan, siendo más competentes (Porter et al., 2019).

Por tanto, queda demostrado que *Lt2* no secreta ninguna molécula al medio que impida el crecimiento de *Td5*, aunque es posible que secrete algún compuesto que inhiba su fermentación. Además, en presencia de *Lt2*, el crecimiento de *Td5* está inhibido, posiblemente por un contacto célula-célula o por una competencia por los nutrientes del medio.

Finalmente, cabe destacar que, a pesar de que los resultados de la O.D. muestran una biomasa final en *Lt2;Td5* superior a la biomasa de la fermentación individual de *Td5*, en la qPCR observamos que los niveles poblacionales de *Td5* de esta fermentación son de $3,16 \times 10^8$ cél./mL aproximadamente. Esta población no es una población excesivamente alta, ya que estudios anteriores (Lu et al., 2015; Taillandier et al., 2014) muestran que fermentaciones realizadas por un cultivo puro de *T. delbrueckii* alcanzaban poblaciones máximas de 10^7 y 10^8 células/mL. Por ello, aunque es cierto que *Td5* en *Lt2;Td5* alcanza niveles un poco más altos de lo acostumbrado, estos niveles son normales.

6.3 Comparación de *Td5+Lt2* y *Td5;Lt2*

Tras observar la influencia de *Lt2* en *Td5*, se repite el experimento cambiando el orden de las cepas inoculadas. Con este cambio se observa la influencia de *Td5* en *Lt2*.

6.3.1 Cinética de fermentación

Se estudia la cinética de fermentación para observar el comportamiento de *Td5* y *Lt2* fermentando secuencialmente de forma mixta o filtrando *Td5* tras 48 horas. De esta forma se observa si se produce alguna inhibición o mejora en la fermentación.

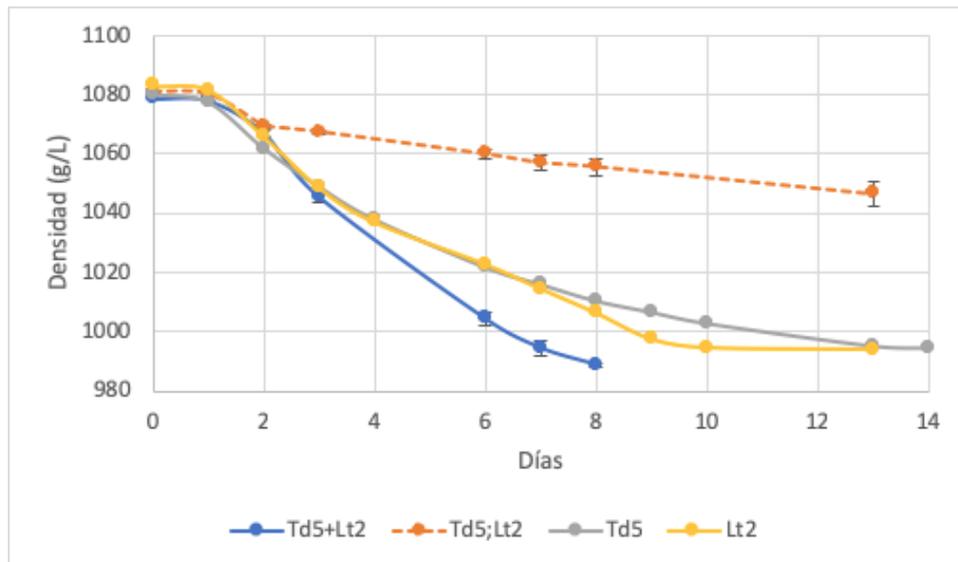


Figura 15. Variación de la densidad de fermentaciones secuenciales mixtas (*Td5+Lt2*), fermentaciones secuenciales filtradas (*Td5;Lt2*) y fermentaciones individuales (*Td5* y *Lt2*).

Con respecto a la densidad, se observa como en la fermentación secuencial mixta disminuye la densidad más rápido que en las fermentaciones individuales, acabando esta fermentación en el día 8. Esto coincide con un estudio anterior (Taillandier et al., 2014). En este estudio se observó como la cinética de fermentación al inocular secuencialmente *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* se aceleraba con respecto a una inoculación pura de *T. delbrueckii*. Este hecho se justificó con el aumento de biomasa. *T. delbrueckii* fermenta peor que *S. cerevisiae*, por lo que al inocular esta segunda al mosto, la participación de *S. cerevisiae* produce la mejora en la fermentación. Esto, unido a que la población de levaduras total aumenta, la fermentación se acelera. Por otro lado, en este estudio se observaba también que esta fermentación secuencial se ralentiza con respecto a una fermentación pura de *S. cerevisiae*. Esto se explicó achacando a que *T. delbrueckii* consumió parte de los nutrientes presentes en el mosto, lo que impedía un correcto crecimiento a *S. cerevisiae* y, por tanto, ralentizaba la fermentación (Taillandier et al., 2014). En nuestro caso, tanto *Td5* como *Lt2* son buenas fermentadoras y capaces de acabar la fermentación, por lo que la aceleración de la fermentación en *Td5+Lt2* puede deberse a un aumento de la población total de levaduras fermentadoras en el mosto. A este hecho se le añade que este aumento de las levaduras presentes en el mosto es debido a la adición de otra levadura que fermenta bien, por lo que es más posible que aumente la velocidad de fermentación. Por otra parte, el consumo de nutrientes por parte de *T. delbrueckii* mencionado anteriormente, explicaría la inhibición de la fermentación en *Td5;Lt2* tras eliminar *Td5* e inocular *Lt2*. Si *Td5* consume los nutrientes presentes en el mosto, *Lt2* no podrá crecer, por lo que la fermentación se para, tal y como se puede observar en la Figura 15.

6.3.2 Crecimiento poblacional

Conociendo la cinética de fermentación y habiendo planteado las hipótesis para explicar este comportamiento, se analiza el crecimiento poblacional de las levaduras. Con estos datos se observará qué poblaciones son las causantes de la fermentación y cómo influye *Td5* en el crecimiento de *Lt2*.

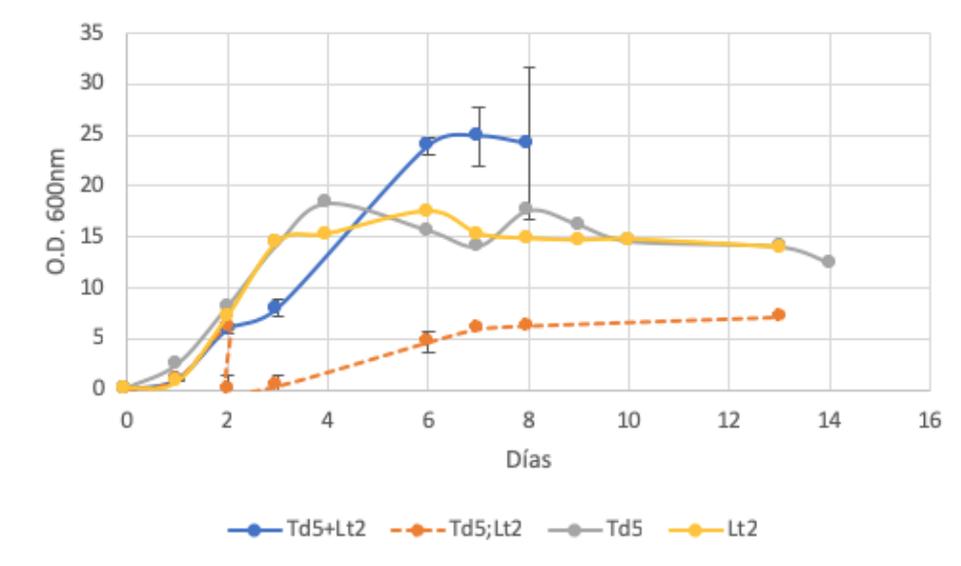


Figura 16. Variación de la O.D. a 600nm de las fermentaciones secuenciales mixtas (*Td5+Lt2*), fermentaciones secuenciales filtradas (*Td5;Lt2*) y fermentaciones individuales (*Td5* y *Lt2*).

Comparando la producción de biomasa de las fermentaciones secuenciales mixtas y filtradas con las fermentaciones individuales, se observa que, en la fermentación secuencial mixta, la producción biomasa es superior. En esta fermentación, los niveles de O.D. alcanzan niveles superiores a los de las fermentaciones individuales. Además, se aprecia que, en *Td5+Lt2*, la cinética de producción de biomasa es similar a la cinética de producción de biomasa de las fermentaciones individuales hasta el día 2. A partir de este día, que es cuando se produce la inoculación de *Lt2*, la cinética varía, habiendo una fase de ralentización del crecimiento en el momento de inocular *Lt2*. Sin embargo, el crecimiento se restablece rápidamente alcanzando poblaciones superiores a la individual (Figura 16).

Aunque *Td5+Lt2* alcance niveles de O.D. superiores a las fermentaciones individuales, en *Td5;Lt2* se produce el caso completamente contrario. La cinética de producción de biomasa de esta fermentación es igual a las fermentaciones individuales hasta el día 2. No obstante, tras la filtración y la inoculación de *Lt2*, los niveles de O.D. máximos alcanzados son muy inferiores los niveles de O.D. de las fermentaciones individuales (Figura 16).

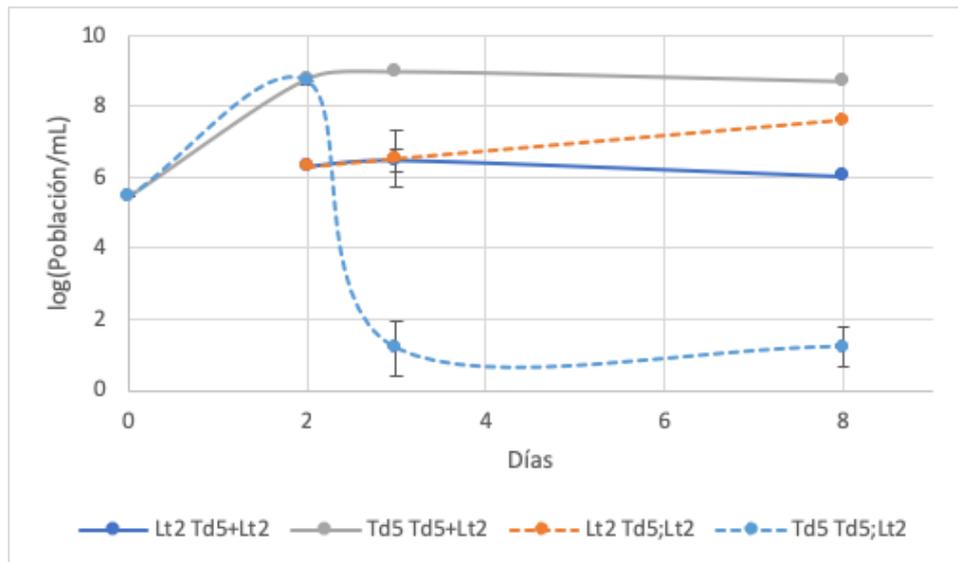


Figura 17. Comparación del análisis por qPCR de fermentaciones secuenciales mixtas (*Td5*+*Lt2*), fermentaciones secuenciales filtradas (*Td5*;*Lt2*).

En los datos obtenidos por la qPCR, se observa que la población de *Lt2* en *Td5*;*Lt2* aumenta, aunque no alcanza niveles tan altos como los de *Td5*. No obstante, como se describe en Lu et al., 2015; Taillandier et al., 2014, los niveles poblacionales de esta cepa están dentro del rango de lo común, a pesar de la variación en la producción de biomasa (Figura 17). Por otro lado, prestando atención a las poblaciones de las fermentaciones secuenciales mixtas, se observa que la población de *Td5* apenas aumenta, terminando por disminuir en el día 8. Por tanto, el incremento de biomasa observado en la Figura 16 se debe mayoritariamente al incremento de la población de *Td5*.

Comparando los datos de la Figura 17 con los mostrados en la Figura 16, se observa una diferencia entre la producción de biomasa (O.D.) y el crecimiento de las poblaciones de levadura (qPCR). La razón de esta podría deberse a floculaciones producidas a la hora de tomar la muestra, lo que podría producir la detección de una menor biomasa.

Estos datos desmienten la teoría expuesta anteriormente para dar explicación al aumento de la velocidad de fermentación de *Td5*+*Lt2*. En esta teoría se hipotizaba sobre un aumento de la población que producía una aceleración de la fermentación. Sin embargo, la población de *Lt2* inoculada no aumenta apenas, lo que hace pensar que la fermentación es llevada a cabo casi exclusivamente por *Td5*. Esto podría llevar a que la presencia de *Td5* produzca una sinergia con *Lt2* que se dé un aumento en la capacidad fermentativa de *Td5*. También, estos datos nos llevan a pensar que *Td5* inhibe el crecimiento de *Lt2* de alguna manera. Esta inhibición se ha observado anteriormente en otros estudios en fermentaciones secuenciales con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* (Liu et al., 2017; Taillandier et al., 2014). En estos estudios se observaba como la población de *S. cerevisiae*, tras ser inoculada 48 horas después de *T. delbrueckii*, no crecía tanto como en las fermentaciones puras. Este hecho se achacaba a la falta de nutrientes, consumidos previamente

por *T. delbrueckii*. Esta explicación podría aplicarse perfectamente a *Td5+Lt2*. No obstante, el crecimiento de *Lt2* en *Td5;Lt2* nos indica que, tras 48h, al inocular *Lt2* todavía hay suficientes nutrientes como para que *Lt2* pueda crecer hasta poblaciones considerables. Por ello, la inhibición del crecimiento de *Lt2* en *Td5+Lt2* podría deberse a una inhibición por contacto célula-célula. Otra posibilidad es que se de una competencia por los nutrientes, en la cual *Td5* estaría favorecida por su mayor población, por lo que *Lt2* no podría captar los nutrientes suficientes para crecer.

Fijando la atención ahora a la fermentación secuencial filtrada, como ya se ha dicho, se observa como *Lt2* crece hasta poblaciones considerables. Este hecho descarta la teoría de que la fermentación *Td5;Lt2* se paraba por una inhibición del crecimiento de *Lt2* por una falta de nutrientes. Por ello, se debe buscar otra explicación a esta inhibición. Una posible explicación es que *Td5* secreta un compuesto al medio que inhiba la fermentación de *Lt2*, aunque no su capacidad de crecimiento.

6.4 Comparación de *Lt2+Td5* y *Td5+Lt2*

Tras comparar las fermentaciones con un mismo orden de inoculación y observar la diferencia de comportamientos entre la fermentación secuencial mixta y la fermentación secuencial filtrada, comparamos las fermentaciones agrupándolas por metodología. Primero comparamos las fermentaciones secuenciales mixtas con diferente orden de inoculación. De esta manera observamos la diferencia de influencia entre *Td5* sobre *Lt2* y *Lt2* sobre *Td5*.

6.4.1 Cinética de fermentación

Inicialmente, se observan las cinéticas de fermentación. Ya se vio que ambas fermentaciones secuenciales mixtas acababan antes que las fermentaciones puras de *Td5* y *Lt2*. Sin embargo, con este estudio se puede comparar cual de las dos acaba antes o cualquier variación destacable entre ambas fermentaciones.

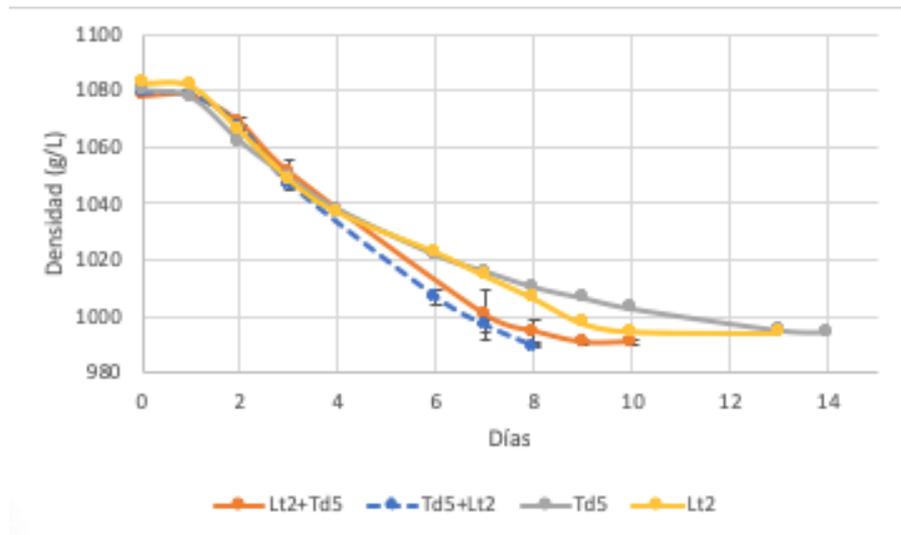


Figura 18. Evolución de la densidad a lo largo de las fermentaciones secuenciales mixtas (*Td5+Lt2* y *Lt2+Td5*).

Como se aprecia en la Figura 18, no existe una gran diferencia entre la cinética de fermentación de *Lt2+Td5* y la de *Td5+Lt2*. Ambas fermentaciones acaban antes que las fermentaciones individuales. Esto podría dar a entender que la sinergia entre *Lt2* y *Td5* que produce una mejora en la capacidad fermentativa se da en ambos sentidos. Siendo de esta forma una característica no específica de cepa. También podría ser que este hecho no se diera en ningún otro caso, por lo que sería una característica específica de estas dos cepas. Además, se observa que *Lt2+Td5* acaba la fermentación después de *Td5+Lt2*. Este hecho también se observa comparando ciertos estudios anteriores, donde la fermentación secuencial de *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* terminan el día 14, mientras que la fermentación secuencial de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* el día 9 (Benito et al., 2016; Taillandier et al., 2014). Esto nos indica que las fermentaciones secuenciales comenzadas por cepas de *T. delbrueckii* terminan antes que las iniciadas por cepas de *L. thermotolerans*. Por tanto, la hipotética sinergia que se produce entre cepas que hace que la fermentación acabe antes, aunque se da tanto en *Td5+Lt2* como en *Lt2+Td5*, se produce de forma equitativa. Es decir, ambas fermentaciones se aceleran, pero la fermentación comenzada por *Td5* termina antes que la comenzada por *Lt2*.

6.4.2 Crecimiento poblacional

Vista la diferencia de interacción entre cepas desde la perspectiva de la densidad, se comparan los crecimientos poblacionales para observar estas interacciones desde la perspectiva del crecimiento de las diversas poblaciones. De esta forma, se puede determinar si ambas cepas inhiben el crecimiento de la misma forma o alguna lo inhibe en mayor medida. Además, se realiza una comparación del consumo de nitrógeno durante los primeros días de la fermentación para correlacionar el crecimiento celular con el consumo de macronutrientes del medio.

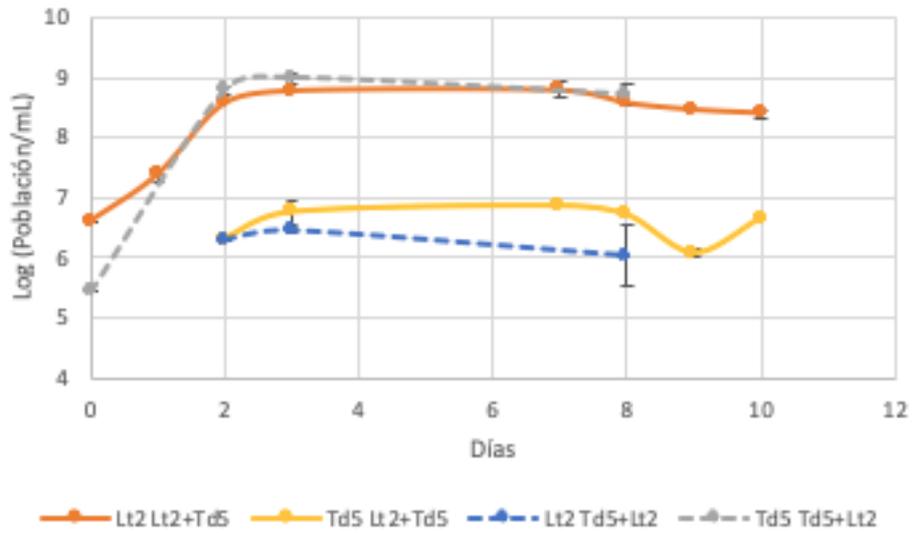


Figura 19. Comparación del análisis por qPCR de fermentaciones secuenciales mixtas (*Lt2*+*Td5* y *Td5*+*Lt2*)

En la Figura 19 se observa como las poblaciones de las primeras cepas inoculadas llegan a niveles similares. Sin embargo, *Td5* tiene un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de *Lt2* que *Lt2* sobre *Td5*. Esto produce que *Lt2*, cuando es inoculada en el día 2, alcance niveles poblacionales menores que cuando se inocula *Td5* en el día 2.

Tabla 2. Contenido de nitrógeno inorgánico (NH₄) y de nitrógeno en orgánico (NH₂) a lo largo de las fermentaciones secuenciales mixtas. Se considera el día 0 el momento antes de iniciar la fermentación.

Fermentación	Días	Nitrógeno inorgánico (mg N/L)	Desviación estándar (mg N/L)	Nitrógeno orgánico (mg N/L)	Desviación estándar (mg N/L)	Nitrógeno total (mg N/L)
<i>Lt2+Td5</i>	0	132,00	0	117,25	0	249,25
	1	120,67	2,31	109,32	2,50	229,99
	2	35,54	8,48	20,41	12,74	55,95
	3	0	0	0	0	0
<i>Td5+Lt2</i>	0	115,00	0	128,17	0	243,17
	1	110,00	3,00	111,25	1,22	221,25
	2	40,33	14,43	33,41	14,55	73,74
	3	0	0	0	0	0

Este menor crecimiento de *Lt2* en *Td5+Lt2* no se refleja en el consumo de nitrógeno expuesto en la Tabla 2, ya que hay mayor concentración de nitrógeno en la fermentación *Td5+Lt2* que en la fermentación *Lt2+Td5* en el día 2. Sin embargo, cabe destacar de esta tabla, que *Lt2* consume más nitrógeno que *Td5* durante su crecimiento, en concreto, consume más cantidad de nitrógeno inorgánico que *Td5*. Esto puede implicar que, a pesar de que el medio de *Td5+Lt2* tenga mayor concentración de nitrógeno, *Lt2* no crezca por una falta de nutrientes. Esta falta de nutrientes se debe a que, como hemos dicho, *Lt2* tiene un mayor requerimiento de nitrógeno que *Td5* durante su crecimiento. Por ello, podría ser que la cantidad de nitrógeno total en el medio de *Td5+Lt2* en el día 2 no sea suficiente para que *Lt2* alcance poblaciones altas. Además, se observa como en el día 3, 24 horas después de inocular la segunda cepa, no queda nitrógeno en el medio. Esto se aprecia en estudios anteriores (Bely, Stoeckle, Masneuf-Pomarède, & Dubourdiou, 2008; Taillandier et al., 2014), donde en fermentaciones puras de *T. delbrueckii* sí que queda nitrógeno asimilable en el medio tras acabar la fermentación, mientras que en fermentaciones secuenciales de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* no queda. En estos artículos explican que *S. cerevisiae* consume más cantidad de nitrógeno que *T. delbrueckii*. En las fermentaciones secuenciales, el nitrógeno residual disminuye a 0 debido a la influencia de *S. cerevisiae*. La competencia por este nitrógeno

y el mayor requerimiento de nitrógeno de *S. cerevisiae* produce que el crecimiento de esta sea menor que en los cultivos puros (Bely et al., 2008; Taillandier et al., 2014). Por este mismo motivo podría ser que la segunda cepa inoculada no crece, debido a que el nitrógeno presente en el momento de la inoculación sea muy bajo. Además, ambas cepas inoculadas compiten por el poco nitrógeno del medio y, la primera cepa inoculada, al tener ya una mayor población, consigue absorber más que la segunda cepa inoculada. Esta competencia se daría hasta el día 3, que es cuando se acaba el nitrógeno. Este hecho produciría que el poco crecimiento dado en la segunda cepa no aumente e incluso que disminuya. Esto queda reflejado en los datos de la qPCR, por lo que es la teoría más plausible que explica la inhibición del crecimiento de la segunda cepa inoculada.

Cabe destacar que esta inhibición del crecimiento poblacional debido a la falta de nutrientes no se da a nivel industrial. Esto es debido a que, por regla general, los kits comerciales con levadura seca activa usados para inocular los mostos, incluyen un suplemento nutricional para aumentar la concentración de nutrientes. De esta forma, los nutrientes se encontrarán en exceso y no se producirá competencia entre las levaduras. Para evitar completamente una inhibición de crecimiento, además de añadir suplementos nutricionales, las cepas contenidas en estos kits están seleccionadas de tal forma que se compenetren bien entre ellas y se produzca una fermentación óptima.

6.5 Comparación de *Lt2;Td5* y *Td5;Lt2*

Tras comparar las fermentaciones secuenciales mixtas, se comparan las fermentaciones secuenciales filtradas. Esta comparación se realiza para observar si la inhibición del crecimiento se produce debido a la competencia de nutrientes, tal y como se ha descrito anteriormente. Además, permitirá comparar las inhibiciones de las fermentaciones producidas por *Lt2* y por *Td5*.

6.5.1 Cinética de fermentación

En apartados anteriores se ha comentado que, en las fermentaciones secuenciales filtradas, la fermentación se ve retardada o, incluso, inhibida. Se comparan las cinéticas de las fermentaciones secuenciales filtradas para observar las diferencias debido al diferente orden de inoculación.

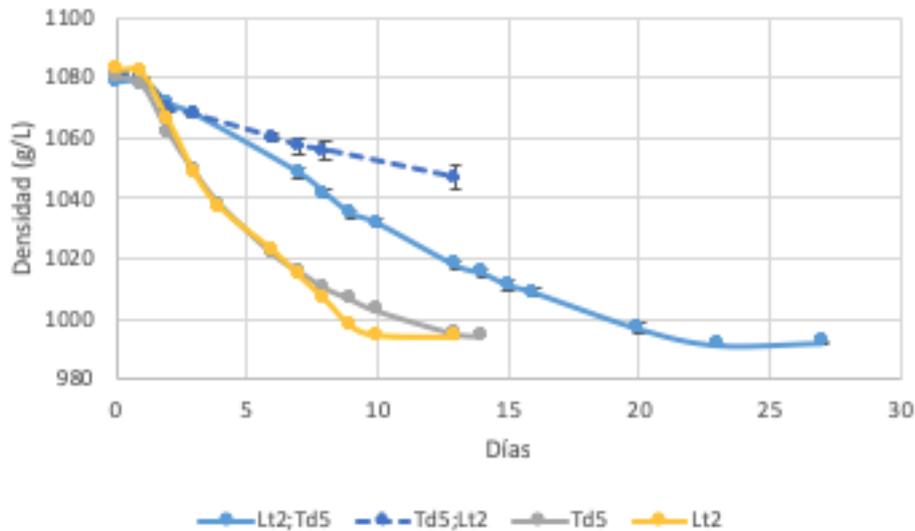


Figura 20. Variación de la densidad en el tiempo de fermentaciones secuenciales filtradas (*Td5;Lt2* y *Lt2;Td5*).

En la Figura 20, se aprecia como, tanto *Lt2;Td5* como *Td5;Lt2*, presentan una ralentización en la fermentación. En ambas fermentaciones, la densidad disminuye más lentamente que en las fermentaciones individuales. Sin embargo, la fermentación *Lt2;Td5* consigue acabar en el día 23, mientras que la fermentación *Td5;Lt2* se para y no consigue acabar. Esto nos demuestra que, en una fermentación secuencial donde la primera levadura es eliminada, *Lt2* produce un efecto negativo sobre *Td5* y viceversa. La influencia de *Td5* sobre *Lt2* en la fermentación es mayor que la de *Lt2* sobre *Td5*, ya que *Td5* impide que *Lt2* acabe la fermentación, mientras que *Lt2* solo produce la disminución de la capacidad fermentativa de *Td5*, ralentizando así la finalización de la fermentación. Esto coincide con lo visto en el apartado anterior y en los estudios comentados en este apartado (Benito et al., 2016; Taillandier et al., 2014). En estos casos, las fermentaciones secuenciales comenzadas por *T. delbrueckii* acaban antes que las comenzadas por *L. thermotolerans*, mostrando que *T. delbrueckii* fermenta mejor que *L. thermotolerans*. En este caso, es *Td5* la que consigue acabar la fermentación, mientras que *Lt2* no. Anteriormente hemos visto que esta inhibición no se debe a una disminución del crecimiento poblacional de las levaduras, ya que pueden alcanzar en ambos casos poblaciones similares. Por ello, esta inhibición puede deberse a la secreción de una molécula que inhiba la fermentación. Esta secreción aparenta ser propia de todas las No-*Saccharomyces*, ya que este efecto se da tanto en *Lt2* y en *Td5* como en otras cepas de *T. delbrueckii* y de *L. thermotolerans*. Sin embargo, observando estos datos, se aprecia que el efecto inhibitorio de la molécula secretada depende de la cepa emisora y de la cepa receptora.

6.5.2 Crecimiento poblacional

Se compara el crecimiento poblacional de las fermentaciones secuenciales filtradas para observar si en ambas fermentaciones el comportamiento de las levaduras es el mismo. Además, se compara el consumo de nitrógeno de los primeros días de fermentación para constatar el crecimiento poblacional con el consumo de nitrógeno y observar si hay alguna correlación.

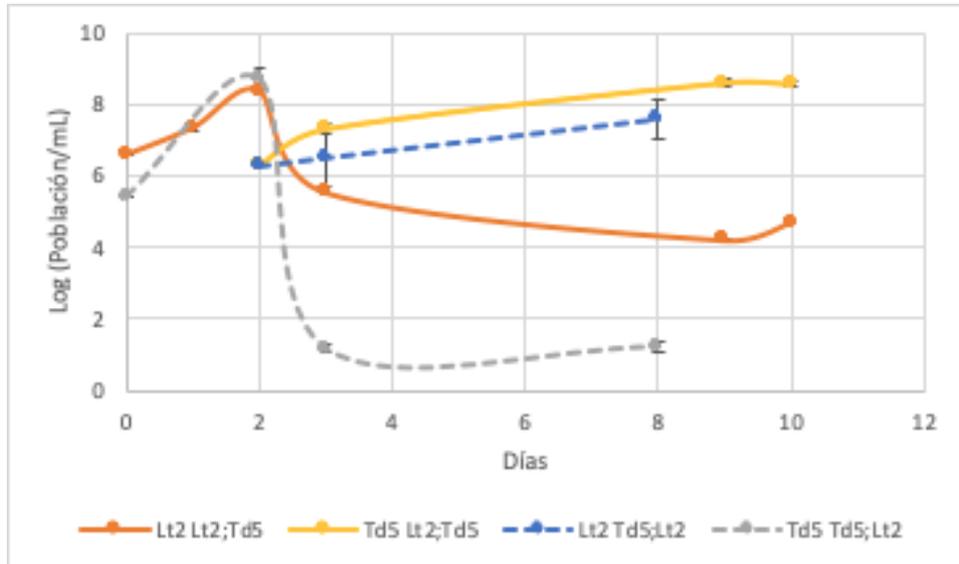


Figura 21. Comparación del análisis por qPCR de fermentaciones secuenciales filtradas (*Td5;Lt2* y *Lt2;Td5*).

Se observa como, al igual que ocurría con las fermentaciones secuenciales mixtas, la población de la primera cepa inoculada aumenta de forma similar tanto en *Lt2;Td5* como en *Td5;Lt2*. Fijando la atención en la segunda cepa inoculada y coincidiendo con el hecho que se daba en las mixtas, se observa que *Lt2 Td5;Lt2* crece menos que *Td5 Lt2;Td5*.

Tabla 3. Contenido de nitrógeno inorgánico (NH_4) y de nitrógeno en orgánico (NH_2) a lo largo de las fermentaciones secuenciales mixtas. Se considera el día 0 el momento antes de iniciar la fermentación.

Fermentación	Días	Nitrógeno inorgánico (mg N/L)	Desviación estándar (mg N/L)	Nitrógeno orgánico (mg N/L)	Desviación estándar (mg N/L)	Nitrógeno total (mg N/L)
<i>Lt2;Td5</i>	0	132,00	0	117,25	0	249,25
	1	117,00	1,73	107,39	0,73	224,39
	2	68,67	6,11	36,88	1,27	105,55
	3	29,67	3,06	20,04	1,56	49,70
<i>Td5;Lt2</i>	0	115,00	0	128,17	0	243,17
	1	108,33	5,51	109,87	5,08	218,21
	2	20,00	9,64	23,20	6,23	43,20
	3	2,67	4,62	12,08	4,92	14,74

Observando la Tabla 3, se aprecia que, en esta ocasión, es *Td5* la cepa que consume más nitrógeno, consumiendo *Lt2* menos nitrógeno y, sobre todo y contradiciendo los datos de las fermentaciones anteriores, menos nitrógeno inorgánico que *Td5*. Esto se da a pesar de que alcance los mismos niveles poblacionales que la fermentación *Lt2+Td5*. Por ello, se demuestra que *Lt2* no siempre tiene mayor requerimiento de nitrógeno para crecer. De la mano de este hecho, estudios anteriores no publicados de este grupo de investigación demostraron que el consumo de nitrógeno de *Lt2* y *Td5* es similar, por lo que esta variación se podría deber a alguna variante casual en las condiciones del experimento. Estas variantes podrían ser variaciones en la preparación del mosto sintético o una mala homogenización del propio mosto durante las fermentaciones, entre otras. Sin embargo, a pesar de esta variación en el consumo de nitrógeno, en ambos casos, los niveles de nitrógenos son muy bajos como para que una levadura crezca, ya que se ha descrito que el requerimiento mínimo de nitrógeno para el crecimiento de *S. cerevisiae* es de 140 mg N/L (Bell & Henschke, 2005). No obstante, estas levaduras crecen, tal como se ha visto. Esto podría deberse al hecho de que las levaduras inoculadas provienen de un precultivo rico en nutrientes. Durante su crecimiento en este precultivo, estas levaduras podrían haber acumulado nitrógeno en su interior. Este nitrógeno acumulado, junto con el poco nitrógeno restante en el medio, podría ser suficiente para su crecimiento. A este hecho se le añade que no existe la presencia de una segunda cepa en el medio que cree competencia por los nutrientes del medio, como ocurría en las

fermentaciones secuenciales mixtas, lo que produce que la disponibilidad de nutrientes sea mayor. Esto explica la diferencia de crecimiento entre *Lt2 Td5;Lt2* y *Td5 Lt2;Td5*. Observando la Tabla 3, se observa como, en el día 2 y 3, en el medio de *Lt2;Td5* queda más nitrógeno que en el medio *Td5;Lt2*, donde el nitrógeno es muy bajo. Comparando esto con los datos de la qPCR, se aprecia que este nitrógeno de *Lt2;Td5* permite a *Td5* crecer más después del 2, mientras que la falta de nitrógeno en *Td5;Lt2* en el día 2 produce un crecimiento menor de *Lt2* que de *Td5*.

Con estos datos, podemos deducir el comportamiento de las cepas en base a los macronutrientes. Sin embargo, el consumo de micronutrientes también afecta al crecimiento poblacional, por lo que la diferencia de micronutrientes presentes en el mosto podría ser otra posibilidad para explicar la diferencia de las poblaciones de *Lt2;Td5* y de *Td5;Lt2*.

7 Conclusiones y perspectivas de futuro

Tras los resultados obtenidos, se confirma nuestra hipótesis de que estas cepas, al igual que hacían sobre cepas de *S. cerevisiae*, también son capaces de inhibirse entre ellas. Más estudios son necesarios para determinar si esta inhibición se da a nivel de especie o es específica entre estas cepas.

Durante las fermentaciones secuenciales, se observa una sinergia entre las cepas que resulta en una aceleración de la fermentación, aunque ésta es debida principalmente a la primera cepa inoculada, ya que el crecimiento de la segunda se encuentra muy limitado. Esta falta de crecimiento puede ser debido por la competencia por los nutrientes (macro y/o micronutrientes) entre las dos cepas, por la secreción de alguna molécula por parte de la primera cepa o por contacto célula-célula

Finalmente, durante las fermentaciones secuenciales en donde la primera cepa inoculada es eliminada antes de la inoculación de la segunda, se produce un efecto inhibitorio sobre el proceso fermentativo, que resulta en una ralentización de proceso (*Lt2;Td5*) o incluso en una parada de fermentación (*Td5;Lt2*). Por tanto, el efecto inhibitorio de *Td5* sobre *Lt2* es mayor que el de *Lt2* sobre *Td5*. Esta inhibición puede ser debida a la falta de algún nutriente esencial o la síntesis por parte de *Td5* de alguna molécula que inhiba la fermentación de *Lt2*. Estos resultados contrastan con la capacidad de crecer de la segunda cepa inoculada, en el primer caso *Td5* puede crecer, aunque de forma más lenta, mientras que, en el segundo caso, *Lt2* también puede crecer, aunque de forma más limitada.

Esto lleva a pensar futuras líneas de investigación para comprender mejor el comportamiento de estas cepas. Por un lado, se podría realizar un experimento donde se coinoculen *Td5* y *Lt2* desde el día 0. De esta forma se observará que cepa se impone y si sigue produciéndose sinergia a la

hora de fermentar y crecer. Otra posible futura línea de investigación podría centrarse en el análisis de los componentes del mosto tras la fermentación de 48 horas de *Td5* y *Lt2*. Con estos resultados, se podría observar si estas interacciones entre *Lt2* y *Td5* se producen por la secreción de algún compuesto concreto. Junto con este análisis, se podría realizar un análisis más detallado sobre el consumo de aminoácidos durante las fermentaciones secuenciales de *Td5* y *Lt2*. De esta forma se arrojaría luz sobre si la segunda cepa inoculada no fermenta debido a la falta de algún aminoácido en concreto. Además de estas investigaciones, se podría repetir este experimento usando otras cepas de *L. thermotolerans* y de *T. delbrueckii*, para observar si se produce las mismas interacciones. Esto permitiría conocer si los efectos observados son específicos de cepa o no. Por último, se podría volver a realizar este experimento, pero inoculando una levadura dentro de un saco de diálisis que se localice en el fermentador y la otra levadura fuera del saco, en el propio fermentador. De esta forma, se podrá observar si la inhibición del crecimiento se produce además por la secreción de alguna molécula durante la fermentación.

8 Autoevaluación

La microbiología es un campo complejo para el cual se requiere experiencia a la hora de trabajar debido a la facilidad de contaminación y a la posible aleatoriedad de comportamiento de los organismos vivos con los que se trabaja. Para mí, estas prácticas han sido mi primera toma de contacto con un experimento microbiológico. Esto ha producido que, al inicio de las prácticas, encontrara ciertas dificultades para mantener la asepsia o para comprender los motivos de ciertos comportamientos de las levaduras con las que trabajé. No obstante, a medida que avanzaba en la investigación, he ido adquiriendo conocimiento y soltura en este campo de la biotecnología. Esto se demuestra viendo la decencia que presentan los resultados expuestos en este trabajo. Las fermentaciones presentadas en este trabajo no son las primeras que realicé, ya que, anteriormente, realicé otras 5 fermentaciones más. De estas 5 fermentaciones anteriores no pude obtener datos coherentes debido a que la levadura *Lt2* usada había mutado y no crecía adecuadamente. Sin embargo, a pesar de no obtener datos, obtuve experiencia, que me permitió realizar las fermentaciones aquí expuestas con mayor afinación en las técnicas utilizadas.

En general, he encontrado el campo de la microbiología, aunque en ocasiones frustrante por no saber dar explicación a ciertos sucesos, muy satisfactorio, sobre todo cuando consigues obtener respuestas coherentes. Además, es interesante y fascinante descubrir un mundo tan extenso invisible a simple vista.

9 Bibliografía

- Beckner Whitener, M. E., Carlin, S., Jacobson, D., Weighill, D., Divol, B., Conterno, L., ... Vrhovsek, U. (2015). Early fermentation volatile metabolite profile of non-*Saccharomyces* yeasts in red and white grape must: A targeted approach. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.018>
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderón, F., & Benito, S. (2016). Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast*, 33(7), 329–338. <https://doi.org/10.1002/yea.3165>
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., ... Santos, A. (2017). Influence of *Torulaspota delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 257(June), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>
- Bell, S. J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.004>
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspota delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2017). The combined use of schizo*Saccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* - Effect on the anthocyanin wine composition. *Molecules*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/molecules22050739>

- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., & Benito, S. (2016). Quality and composition of airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 54(2), 135–144. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.02.16.4220>
- Benito, S. (2018). The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3081–3094. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., ... Rauhut, D. (2015). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Food Research and Technology*, 241(5), 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10(2), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F., & Barile, D. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiology*, 43, 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.005>
- Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., ... González-Arenzana, L. (2019). Effect of the sequential inoculation of non-*Saccharomyces/Saccharomyces* on the anthocyanins and stilbenes composition of tempranillo wines. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00773>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2017). Yeast monitoring of wine mixed or sequential fermentations made by native strains from D.O. “Vinos de Madrid” using real-time quantitative PCR. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02520>

- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33(2), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zaroso, B., Mas, A., ... Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*, 240(5), 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>
- Hranilovic, A., Gambetta, J. M., Schmidtke, L., Boss, P. K., Grbin, P. R., Masneuf-Pomarede, I., ... Sa, A. (n.d.). Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation The Australian Research Council Training Centre for Innovative Wine Production, Adelaide OPEN. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33105-7>
- Jenko, M., & Čuš, F. (2013). The Influence of Yeast Strains on the Composition and Sensory Quality of Gewürztraminer Wine. *Food Technology and Biotechnology*, 51(4), 547–553.
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2017). Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 856–873. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591>
- Lleixà, J., Kioroglou, D., Mas, A., & Portillo, M. del C. (2018). Microbiome dynamics during spontaneous fermentations of sound grapes in comparison with sour rot and

- Botrytis infected grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 281(May), 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.016>
- Lu, Y., Huang, D., Lee, P. R., & Liu, S. Q. (2015). Effects of cofermentation and sequential inoculation of *Saccharomyces bayanus* and *Torulaspora delbrueckii* on durian wine composition. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(12), 2653–2663. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12937>
- Medina-Trujillo, L., González-Royo, E., Sieczkowski, N., Heras, J., Canals, J. M., & Zamora, F. (2017). Effect of sequential inoculation (*Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foaming properties of sparkling wine. *European Food Research and Technology*, 243(4), 681–688. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2781-2>
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*.
- Porter, T. J., Divol, B., & Setati, M. E. (2019). Lachancea yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Research International*, 119(January), 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.003>
- Puertas, B., Jiménez, M. J., Cantos-Villar, E., Cantoral, J. M., & Rodríguez, M. E. (2017). Use of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates. *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), 733–746. <https://doi.org/10.1111/jam.13375>
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñeiro, A., & Ribas, J. C. (2015). A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00983>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology: Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications. Handbook of Enology* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1002/0470010398>

- Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Vilela, A. (2018). *Lachancea thermotolerans*, the Non-*Saccharomyces* Yeast that Reduces the Volatile Acidity of Wines. *Fermentation*, 4(3), 56. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030056>
- Villalba, M. L., Susana Sáez, J., del Monaco, S., Lopes, C. A., & Sangorrín, M. P. (2016). TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.006>
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., & Masneuf-Pomarede, I. (2010). Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology*, 27(5), 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.01.006>

10 Anexos

10.1 Anexo 1: Mosto sintético

Cantidades de reactivo del mosto sintético

Tabla 4. Componentes del mosto sintético

Reactivo	Cantidad (g/L)
Glucosa	100
Fructosa	100
Ácido málico	5
Ácido cítrico	0,5
Ácido tartárico	3
KH₂PO₄	0,75
K₂SO₄	0,5
MgSO₄ · 7H₂O	0,25
CaCl₂ · 2H₂O	0,16
NaCl	0,2
NH₄Cl	0,46

Reactivo	Cantidad (mL/L)
Oligoelementos	1
Vitaminas	10
Factores de anaerobiosis	1
Aminoácidos	6,25

Tabla 5. Oligoelementos y vitaminas del mosto sintético

Oligoelementos	Cantidad (g/L)
MnSO₄ H₂O	4
ZnSO₄ 7H₂O	4
CuSO₄ 5H₂O	1
KI	1
CoCl₂ 6H₂O	0,4
H₃BO₃	1
(NH₄)₆ Mo₇O₂₄ 4H₂O	1

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

Tabla 6. Aminoácidos y factores de anaerobiosis del mosto sintético

Aminoácidos	Cantidad (g/L)
Asp	4,42
Glu	22,96
Ser	7,8
Gln	49,92
His	3,38
Gly	1,82
Thr	7,54
Arg	36,79
Ala	14,56
Tyr	1,95
Cis	2,08
Val	4,42
Met	3,12
Trp	17,42
Phe	3,77
Ile	3,25
Leu	4,81
Lys	1,69
Pro	59,93

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

Protocolo de preparación del mosto sintético:

1. Pesar los componentes de la Tabla 4, excepto los oligoelementos, las vitaminas, los factores de anaerobiosis y los aminoácidos, y agregarlos a agua destilada (menos de 200 o 300 mL del volumen final deseado).
2. Autoclavar.
3. Pasar a un vaso de precipitado y agregar los oligoelementos, las vitaminas, los factores de anaerobiosis y los aminoácidos.
4. Ajustar a pH=3,3 (añadiendo NaOH)
5. Enrasar con agua destilada.
6. Filtrar al vacío usando filtros S-Pack de poro de 0.22 μ m (Millipore, ref:GSWG047S).

10.2 Anexo 2: Protocolo medio Difco WL Nutrient Broth (BD, ref: 247110)

1. Disolver 60 g del polvo en 1 L de agua purificada.
2. Añadir 20 g de Agar, Bacteriological American Type (Ingredient) for microbiology (ITW Reagents, ref: 402303.1210).
3. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
4. Repartir en placas de Petri.
5. Dejar secar las placas.

10.3 Anexo 3: Protocolo DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ref: 69104)

1. Resuspender el pellet en 1 mL de H₂O destilada y autoclavada.
2. Centrifugar 5 minutos a 13.300 rpm.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender de el pellet en 700 μ L de "AP1 buffer".
4. Verter esta solución en un eppendorf con pequeñas bolas de cristal.
5. Programar 1 minuto en la Mini-beadbeater-24, BioSpec, Bartlesville (Estados Unidos) y, posteriormente, incubar un 1 minuto en hielo. Repetir este paso 3 veces.
6. Centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm.
7. Tomar 400 μ L del sobrenadante y verter en un eppendorf nuevo.
8. Añadir 4 μ L de "RNAsa", invertir el eppendorf e incubar 10 minutos a 65 °C. Invertir a los 5 minutos de la incubación.
9. Añadir 130 μ L de "P3 buffer", realizar el mix con la pipeta e incubar 5 minutos en hielo.
10. Centrifugar 5 minutos a 13.300 rpm.
11. Tomar 500 μ L del sobrenadante y verter en una columna lila.
12. Centrifugar 2 minutos a 13.300 rpm.

13. De la parte filtrada por la columna, tomar una alícuota de 450 μL en un eppendorf nuevo y añadir 675 μL de "AW1 buffer". Realizar el mix con la pipeta.
14. Poner 650 μL de esta solución en una columna blanca. Centrifugar 1 minuto a 8.000 rpm. Repetir este paso 2 veces quitando el líquido filtrado.
15. Retirar el líquido filtrado y añadir a la columna 500 μL de "AW2 buffer". Centrifugar 2 minutos a 14.000 rpm. Repetir este paso 2 veces.
16. Colocar la columna en un eppendorf nuevo.
17. Añadir a la columna 50 μL "AE buffer". Incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 1 minuto a 8.000 rpm. Repetir este paso 2 veces.
18. Guardar a -20°C .

10.4 Anexo 4: qPCR

Composición del Master Mix

Tabla 7. Composición de reactivos del Master Mix de la qPCR

Reactivo	TB Green Premix Ex Taq II	Primer Forward	Primer Reverse	Rox II	H ₂ O Mili Q estéril
$\mu\text{L}/$ muestra	10	0,8	0,8	0,08	6,32

Programa

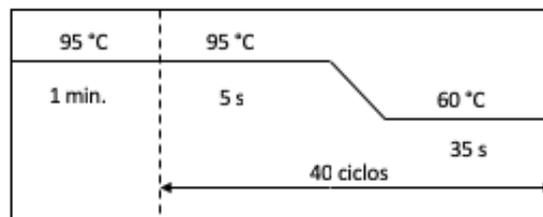
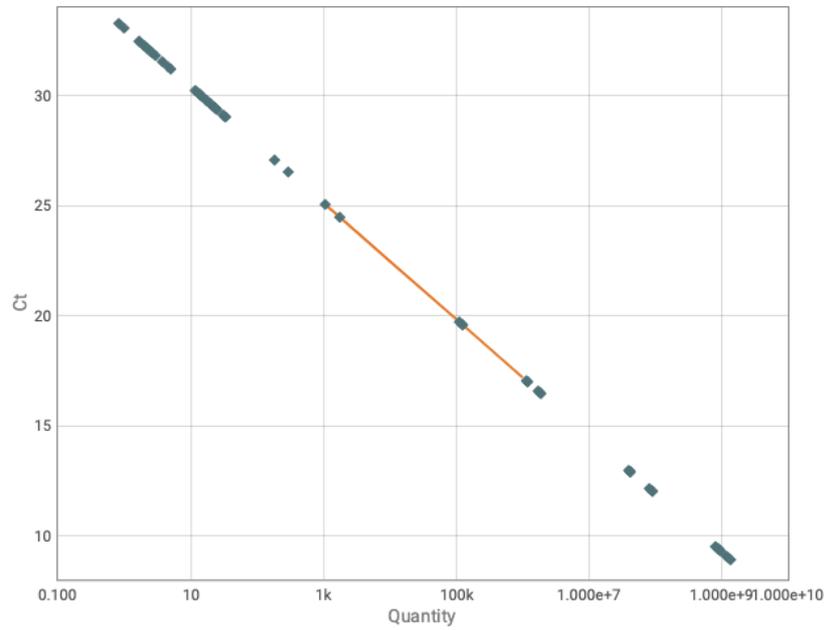


Figura 22. Programa usado para llevar a cabo la qPCR.

Rectas Patrones

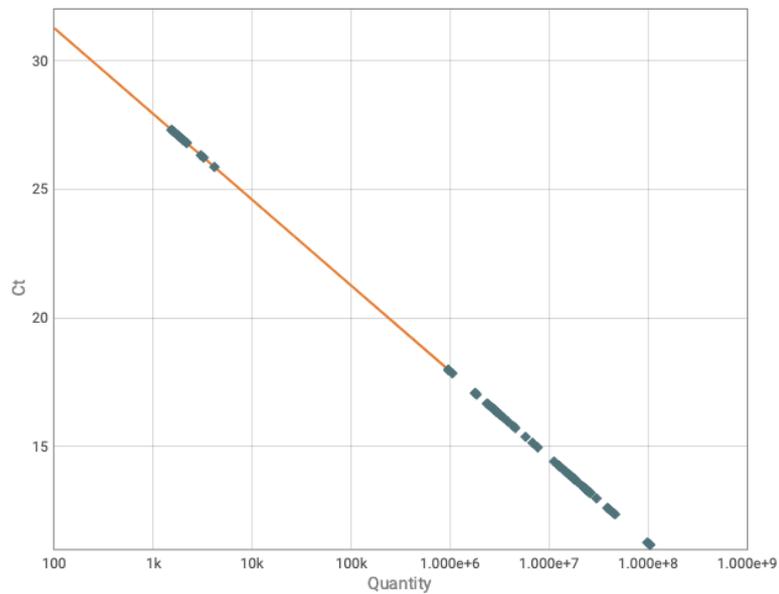
- **Td5**



Target: Td5 Slope: -2.644 Y-Inter: 33.052 R²: 0.979 Eff%: 138.931 Error: 0.095

Figura 23. Recta patrón usada para la cuantificación de Td5 por qPCR.

- **Lt2**



Target: Lt2 Slope: -3.339 Y-Inter: 37.952 R²: 0.998 Eff%: 99.292 Error: 0.040

Figura 24. Recta patrón usada para la cuantificación de Lt2 por qPCR.