

# OT15 - ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA ACLIMATACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* AL ETANOL PARA LA PRODUCCIÓN DE VINOS ESPUMOSOS

**A. Borrull, G. López-Martínez, M. Poblet, R. Cordero-Otero y N. Rozès**

Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología, Universidad Rovira y Virgili, Campus Sescelades, 43007 Tarragona  
[nicolasrozes@urv.cat](mailto:nicolasrozes@urv.cat)

## RESUMEN:

Se ha realizado el seguimiento de la segunda fermentación de los vinos base según el método tradicional o *Champenois* a partir de una levadura tipo *Saccharomyces cerevisiae* aclimatada al etanol. Aunque existan protocolos industriales muy bien definidos para este proceso, se conoce poco de la idoneidad de la presencia de oxígeno y azúcares durante este proceso de aclimatación. Este trabajo muestra que, según la disponibilidad de estos dos factores, *S. cerevisiae* presenta diferentes respuestas en cuanto a la expresión diferenciada de sus genes (transcriptoma). En el análisis de los resultados, se puede observar inducción de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos (ERG5, ERG10, ERG13, OLE1, YEH1, EEB1) en la cepa aclimatada en condición fermentativa. Contrariamente se observa también que se activan genes como GUT1 en la condición respiración, o el gen MDH1, en la condición fermentativo-respiratoria. También se ha podido observar que en las condiciones del estudio, las levaduras aclimatadas según el metabolismo fermentativo han podido alcanzar la presión de 6 bares en botella. En las otras condiciones no ha sido así.

**Palabras clave:** Oxígeno, Insaturación, Esteroles, respiración.

## 1. Introducción

El Cava necesita para su elaboración dos fermentaciones consecutivas. Una fermentación alcohólica para obtener el vino base y una segunda fermentación en botella según el método *Champenois* para conseguir la aparición de la espuma. Para asegurar que se realice esta segunda fermentación las levaduras tienen que ser previamente aclimatadas especialmente al etanol y pH del vino base.

Aunque la aclimatación de las levaduras es un proceso bien definido en la industria [1, 2], no existe ningún estudio que describa la diferencia en la expresión génica de células aclimatadas según diferentes criterios.

Nuestro estudio describe el proceso realizado con distintas condiciones de oxigenación y concentración de azúcar, para ello se ha seguido la cinética mediante la determinación del consumo de azúcares con su consiguiente producción de etanol. Además, se hizo un estudio transcriptómico a lo largo del proceso de aclimatación.

Después de realizar la segunda fermentación en botella para las diferentes condiciones de aclimatación testadas se determinó que un proceso en semi-anaerobiosis y con alta concentración de azúcar obtenía unas células con mejor diagnóstico.

## 2. Material y métodos

La cepa EC1118 *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand SA, Montreal, Canadá) fue utilizada en este estudio y rehidratada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se activaron las levaduras en 30 ml de medio basal (150 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 4 g/l PO<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 20% (v/v) de vino sintético) bajo agitación (150 rpm) durante 24 horas, lo que corresponde a la fase 1 (P1). Entonces se completó este medio con 120 ml de medio basal (50 g/l de sacarosa y 84% (v/v) de vino sintético) para permitir que las células de levadura se aclimataran al etanol durante tres días, lo que corresponde a la fase 2 (P2).

Se modificaron variables en P2 dependiendo de la condición estudiado: condición OXI, crecimiento de la levadura en aerobiosis (1/3 del volumen total del recipiente con agitación) y condición NOXI, crecimiento en semi-anaerobiosis (4/5 del volumen total del recipiente sin agitación). La condición ETOXI representa un crecimiento de la levadura en aerobiosis sin adición de azúcares a partir de P1. La temperatura de aclimatación fue de 25°C.

La viabilidad de las células se determinó según [3] mediante la citometría de flujo utilizando el kit LIVE/DEAD Viabilidad (Molecular Probes Inc., EE.UU.). Se determinó la concentración en azúcares y etanol durante la aclimatación usando un análisis enzimático con kit comerciales de Roche (R-Biopharm, Darmstadt, Alemania).

La segunda fermentación en botella fue realizada a 25°C en un vino base definido inoculando con las tres condiciones de aclimatación por duplicado. Se siguió la evolución de la segunda fermentación midiendo la presión interior en las botellas mediante afrómetros.

Se realizaron dos preparaciones de ARN independientes; uno de cada réplica biológica, para cada uno de los tres puntos de muestreo al final del proceso de aclimatación, OXI, NOXI y ETOXI. El análisis de microarrays de expresión génica diferencial fue realizado mediante el *GeneChip Yeast Genome 2.0* en el *Institute for Research in Biomedicine* (IRB, Barcelona).

### 3. Resultados

La aclimatación de la cepa *S. cerevisiae* EC1118 fue realizada siguiendo el protocolo industrial descrito por [1, 2] con 2 fases sucesivas, la P1 (24h) y P2 (72h), (Fig. 1). Como se puede observar en la figura 1, las células de las condiciones OXI, NOXI y ETOXI tuvieron diferente comportamiento: ETOXI, presenta un metabolismo respiratorio consumiendo el etanol, OXI, presenta un metabolismo fermentativo-respiratorio, presencia de oxígeno con una concentración en azúcares por debajo del efecto Crabtree y NOXI, continua todavía con un metabolismo fermentativo.

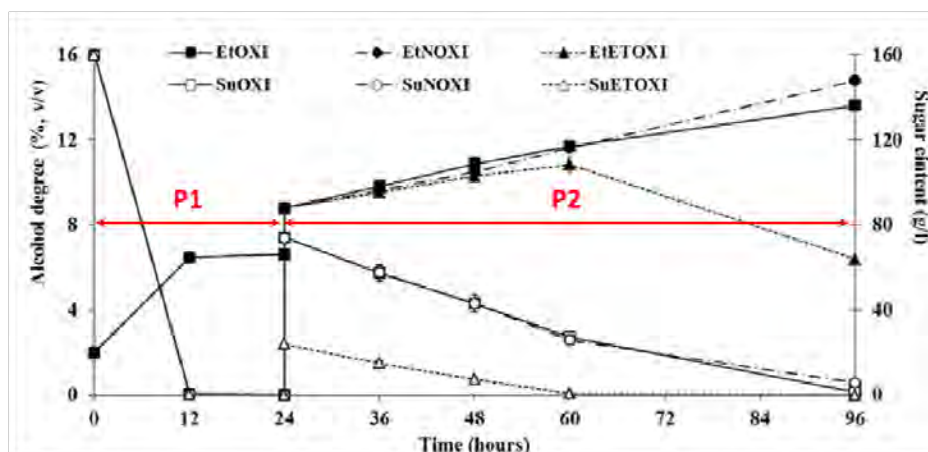


Figura 1. Evolución de las concentraciones en azúcares (símbolos abiertos) y etanol (símbolos cerrados) durante el proceso de aclimatación de *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 a 25 °C. Las condiciones utilizadas fueron: OXI, Aerobiosis + adición de azúcar (cuadrados); NOXI, Semi-anaerobiosis + adición de azúcar (círculos); ETOXI, Aerobiosis sin adición de azúcar (triángulos). Et, etanol; Su, Azúcar.

Los resultados de la tabla 1 muestran que las células aclimatadas según la modalidad NOXI fueron las únicas que permitieron finalizar la segunda fermentación (6 bares para una concentración inicial en sacarosa de 24 g/l) en 35 días. Se puede observar también que la viabilidad para las tres condiciones de aclimatación fue idéntica.

Tabla 1. Resultados finales de la segunda fermentación en botella a 25°C. Inoculación del vino base definido por tres procesos de aclimatación diferente OXI, Aerobiosis + adición de azúcar; NOXI, Semi-anaerobiosis + adición de azúcar; ETOXI, Aerobiosis sin adición de azúcar.

	OXI	NOXI	ETOXI
Concentración final en azúcares (g/l)	5.41	2.24	3.51
Grado alcohólico (% v/v)	10.30	10.90	10.55
Días para alcanzar a 4 bares	16	10	13
Días para alcanzar 6 bares	ND	35	ND
Viabilidad celular 4 bares (cel/ml)	1.18 10 <sup>6</sup>	1.34 10 <sup>6</sup>	1.30 10 <sup>6</sup>

ND: No Determinado porque hubo paradas de segunda fermentación.

El transcriptoma de la condición más favorable, NOXI, fue comparado con las otras condiciones OXI Y ETOXI, y se determinó qué genes estaban expresados dos veces-más (Fig. 2) o dos veces menos (Fig. 3). Aunque no se encontraron muchos genes con variaciones significativas, se vio que varias vías metabólicas se veían afectadas, de forma diferencial según la condición. Estas vías metabólicas incluían la sobreexpresión, para NOXI respecto a OXI y ETOXI, de genes relacionados con el metabolismo lipídico como son el caso de ERG5, ERG10, CYB5, OLE1 y YEH1. También de vio sobreexpresión de otros genes interesantes como TIR4, relacionado con las manoproteínas de la pared celular y que se expresa bajo condiciones anaeróbicas y necesarias para el crecimiento anaeróbico y el gen HLR1 relacionado con la preservación de la integridad de la membrana.

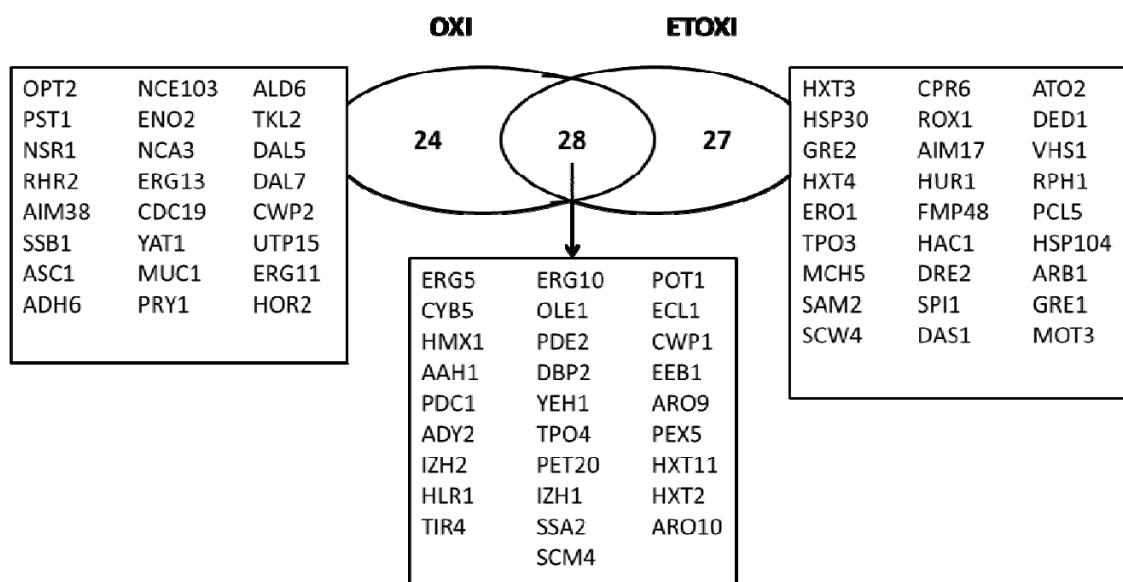


Figura 2. Representación de los genes *up-regulated* en NOXI respecto a OXI, ETOXI y ambos en *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 a 25 °C durante el proceso de aclimatación. OXI, Aerobiosis + adición de azúcar; NOXI, Semi-anaerobiosis + adición de azúcar; ETOXI, Aerobiosis sin adición de azúcar.

También se puede observar la inducción de la transcripción de dos genes, RHR2 (GPP1) y HOR2 (GPP2) como respuesta a las condiciones de hipoxia, y que están relacionados con la formación de glicerol, en NOXI respecto a OXI (Fig. 2).

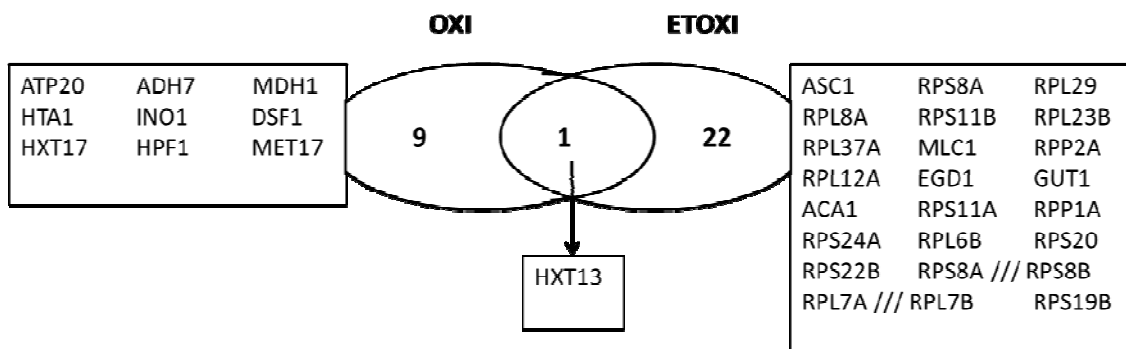


Figura 3. Representación de los genes *down-regulated* en NOXI respecto a OXI, ETOXI y ambos en *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 a 25 °C durante el proceso de aclimatación. OXI, Aerobiosis + adición de azúcar; NOXI, Semi-anaerobiosis + adición de azúcar; ETOXI, Aerobiosis sin adición de azúcar.

En la figura 3, es interesante notar que uno de los genes activado en OXI respecto a NOXI, el gen HPF1, está relacionado con la excreción de manoproteínas que pueden limitar la formación de agregados proteicos en los vinos blancos [4]. Por otro lado, en la condición ETOXI, se puede observar la inducción del gen GUT1 inducido por la presencia de una fuente de carbono no-fermentable.

## 4. Conclusiones

El análisis del transcriptoma de la condición más favorable NOXI fue comparado con las otras dos condiciones OXI Y ETOXI. Se determinó cuales genes estaban sobre-expresados o inhibidos y se vio que, aunque no hubo muchos genes con variaciones significativas, varias vías metabólicas se veían afectadas diferencialmente según la condición. Dichas vías incluían la sobreexpresión para NOXI de genes relacionados con el metabolismo lipídico por ejemplo ERG5, ERG10, CYB5 y OLE1, y otros con características interesantes como la inducción del gen HPF1 en la condición OXI. Trabajos futuros ayudaran a completar estos resultados.

## 5. Bibliografía

1. Laurent, M., Valade, M., 1998. La propagation des levains de tirage. *Vigneron Champenois*. 3, 29-52.
2. Laurent, M., Valade, M., 2007. La préparation du levain de tirage à partir de levures sèches actives. *Vigneron Champenois*. 3, 75-95.
3. Borrull, A. Poblet, M., Rozès, N., 2015. New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiol.*, 48, 41-48.
4. Brown, S.L., Stockdale, V.J., Pettolino, F., Pocock, K.F., de Barros Lopes, M., Williams, P.J., Bacic, A., Fincher, G.B., Høj, P.B., Waters, E.J., 2007. Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:1363–1376.

## 6. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Gobierno español, proyecto AGL2010-22001-C02-02, otorgado a NR. Además, AB quiere agradecer a la Universidad Rovira i Virgili para su beca de doctorado 2009BRDI / 12/13.