

14-6-2021

Evaluación de la metodología de edición genómica CRISPR/CAS 9 para la obtención de vinos con menor contenido alcohólico

TFG_URV_ GRADO ENOLOGÍA

M^a Isabel García Navarro
Tutor: M^a Carmen Portillo
Depto. Bioquímica y Biotecnología



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Índice

Resumen.....	2
Introducción.....	3
Objetivo.....	6
Metodología.....	7
Resultados y Discusión.....	9
Prácticas culturales en viña.....	9
Prácticas fermentativas y enológicas.....	10
Coupages.....	10
Extracción de azúcares.....	11
Adición de enzimas.....	11
Prácticas post-fermentativas y procesos tecnológicos.....	12
Coupages o blending.....	12
Extracción de alcohol.....	13
Prácticas microbiológicas.....	14
Uso de levaduras no convencionales.....	14
Inoculación secuencial.....	17
Modificaciones genéticas.....	18
Hibridaciones de cepas.....	18
Deleción sobreexpresión de genes.....	20
Mutagénesis dirigida.....	21
Mutaciones vía evolución adaptativa_ALE.....	22
CRISPR.....	23
Equilibrio redox y la fermentación alcohólica.....	29
Discusión global.....	32
Situación de los OGM en La Unión Europea.....	32
Perspectivas de futuro.....	33
Conclusiones.....	35
Bibliografía.....	36

Resumen

La tendencia actual hacia un estilo de vida más saludable hace que cada vez más consumidores opten por bebidas sin o con menos alcohol. Sin embargo, en los últimos años el cambio climático está alterando los patrones climáticos en todo el planeta y en la viña esto se traduce en un adelanto de la maduración, y en el consecuente aumento de grado alcohólico. En este contexto el sector vitivinícola busca desesperadamente alternativas que permitan reducir el grado para no perder cuota de mercado.

Este trabajo hace un repaso de las diferentes opciones exitosas que se han probado hasta la fecha para reducir el contenido de etanol en el vino. Se presentarán las diferentes estrategias empleadas a través de la revisión de artículos científicos publicados en los últimos años: desde prácticas agronómicas en la viña, a modificaciones genéticas de levaduras pasando por prácticas enológicas y opciones tecnológicas. No obstante, la prometedora tecnología CRISPR merece especial atención en esta revisión al tratarse de la última innovación en ingeniería genética y ser la menos utilizada. Veremos que la solución no es única y que mientras se materializa el necesario cambio global quizás lo más adecuado sea hacer una combinación de diferentes estrategias.

❖ Palabras clave:

Reducción etanol, vino, Crispr, *Saccharomyces*, No-*Saccharomyces*

Introducción

Llamamos vino a la bebida alcohólica natural resultante de la fermentación de uvas, o de su mosto, gracias a la acción de levaduras. Éstas utilizan los azúcares presentes en el medio como fuente de carbono para obtener energía, crecer y multiplicarse. El metabolismo de las levaduras transforma los azúcares en etanol, dióxido de carbono y energía (además de otros muchos metabolitos secundarios) mediante el proceso que conocemos como fermentación alcohólica.

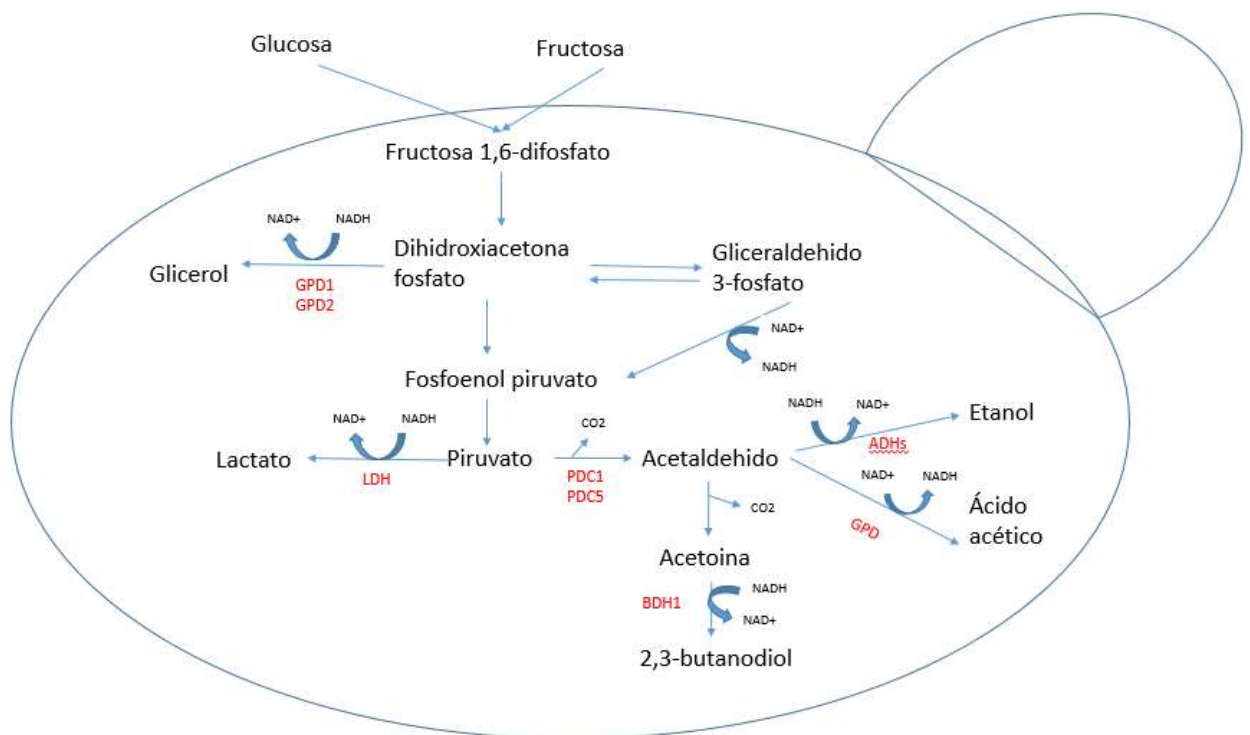


Fig.1: Representación de las principales reacciones que tienen lugar durante la fermentación alcohólica en *S. cerevisiae*. En rojo las enzimas que catalizan las reacciones más significativas tratadas en esta revisión.

Las levaduras son microorganismos unicelulares que pertenecen al dominio *Eukaryota* y son capaces de crecer en anaerobiosis gracias a la fermentación. Se encuentran de forma natural en el epitelio de las frutas, de ahí que el vino haya formado parte de la

cultura mediterránea desde tiempo inmemorial, pues el mosto de uva fermentaba de forma espontánea (se han hallado restos que datan de 6000 a.C.). Muchas son las especies de levaduras existentes pero, sin duda alguna, la más utilizada hoy día en el mundo enológico es *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura se caracteriza por su gran capacidad fermentadora, que le permite realizar fermentaciones completas (azúcares residuales <2 g/L). Otras especies con menor tolerancia al etanol pueden fermentar en los estadios iniciales pero posteriormente no soportan las condiciones externas y quedan inhibidas mientras *S. cerevisiae* se impone. Además, su tolerancia térmica les permite seguir creciendo, aunque más lentamente, a baja temperatura, condición muy deseable en la elaboración de ciertos estilos de vinos. Cada especie de levadura tiene un metabolismo particular, de forma que un mismo sustrato da lugar a productos químicos y organolépticamente diferentes en función de la especie fermentadora. Ésta es otra de las razones por las que *S. cerevisiae* destaca: produce poco SO₂ y muchos metabolitos secundarios deseables (glicerol, compuestos aromáticos...).

Las uvas son el fruto de la especie *Vitis vinífera*, que surgió en el sur del Cáucaso durante el mioceno, de allí se extendió por la cuenca mediterránea y el hombre la introdujo en el resto de zonas vitícolas actuales. La planta de la vid tiene unas exigencias climáticas que impiden su desarrollo en zonas frías, de ahí que el cultivo mundial se extiende a lo largo de 2 franjas paralelas al ecuador entre los grados 30-50 aproximadamente. Es un cultivo de secano, cosa que ha propiciado que España sea actualmente el país con más superficie de viña plantada (> 1.000.000ha).

En el contexto actual la mayor amenaza del sector vitivinícola es el cambio climático. Es una realidad innegable que puede cambiar el perfil tradicional de los vinos de una zona determinada, así como el mapa de las zonas de cultivo de las especies vegetales en general. El calentamiento global y el cambio de los patrones de lluvias desplazará hacia el norte / sur (según el hemisferio) las franjas geográficas aptas para el cultivo de la viña con fines de vinificación. Los registros históricos de temperatura confirman ya un aumento de las temperaturas medias que se traducen en un adelanto del ciclo de la vid. Para poder elaborar vinos de calidad es fundamental el balance entre ácidos y azúcares del mosto, que se traduce en vinos equilibrados, ni demasiado ácidos y ligeros ni demasiado alcohólicos y pesados. En general, los vinos de zonas cálidas se caracterizan por tener menor acidez y más alcohol que los elaborados en zonas templadas ya que, medida que madura el fruto, los ácidos van degradándose y la planta va acumulando cada vez más azúcares en la baya. La acidez es un parámetro muy importante no solo de cara al equilibrio sensorial del producto final, sino también a su estabilidad microbiológica y su capacidad de guarda, estando íntimamente relacionados la acidez total y el pH. No obstante, no solo acidez y azúcares determinan la fecha de la cosecha, hay otros aspectos muy importantes que determinan la calidad del producto final: los precursores de aromas, que también se degradan antes con temperaturas altas y los taninos cuya madurez no siempre se ajusta temporalmente al nivel óptimo de azúcares y ácidos. Así, nos encontramos que la tendencia actual es una disminución de la acidez unida a un aumento de la graduación alcohólica debido a una mayor concentración de azúcares en la baya, dando como resultado vinos desequilibrados menos atractivos

organolépticamente. Por otro lado, se observa una tendencia del mercado hacia bebidas fermentadas de menor graduación como cervezas y sidras, motivado por razones de salud, estética o moda. Además el contenido alcohólico de las bebidas suele estar sujeto a impuestos y aranceles específicos, de forma que más alcohol equivale a más impuestos y, por tanto, a menos competitividad.

Por todo lo expuesto anteriormente la industria del vino busca opciones que permitan reducir el grado alcohólico para poder adaptarse mejor a estas tendencias del mercado y del clima. De ahí que surjan todo tipo de estrategias encaminadas a este fin, algunas biológicas se centran en reducir la síntesis etanol (fermentaciones limitadas, utilización de especies alternativas de levaduras), otras son físicas, basadas en eliminar el alcohol ya formado (filtro de conos rotativos, osmosis, osmosis inversa, rectificación y evaporación al vacío), además de prácticas culturales como reducir el ratio de superficie foliar vs peso de fruto.

Objetivo

Este trabajo tiene como objetivo presentar las estrategias más exitosas que se han seguido hasta la fecha para reducir el grado alcohólico y plantear la posibilidad de utilizar la técnica CRISPR/Cas 9 para este fin. Para ello se procedió a la revisión de los estudios más prometedores realizados hasta fecha en esta dirección.

Metodología

La búsqueda de material bibliográfico para realizar este trabajo se llevó a cabo entre febrero y principios de junio de 2021. Está centrada principalmente en artículos científicos, aunque también se recurrió ocasionalmente a páginas web como recurso para obtener imágenes e información.

Las revisiones de artículos publicados para reducir el alcohol en el vino (Varela et al., 2015) o de las estrategias microbiológicas encaminadas al mismo fin (Varela&Varela, 2019) sirvieron como punto de partida para, a partir de ahí, consultar sus referencias y ver si éstas habían publicado algo más en la misma dirección. Del mismo modo, se utilizaron las revistas online especializadas que las habían publicado para realizar búsquedas en su contenido. Las mismas páginas ofrecen información de otros estudios similares introduciéndolos como “artículos similares” o “quizás pueda interesarle”. También se recurrió a google académico para localizar artículos haciendo búsquedas con palabras clave para posteriormente consultar la revista en que se había publicado el artículo con el permiso de Sabidi.

La búsqueda siguió un esquema similar a la estructura del trabajo, buscando primero información más global sobre cómo reducir el etanol en vino y posteriormente indagando en las diferentes estrategias concretas con parámetros como:

“low ethanol wine”, “pruning low ethanol”, “sugar reduction wine”, “alcohol reduction wine”, “low ethanol *Saccharomyces*”, “low ethanol no *Saccharomyces*”, “Crispr”, “Crispr wine”, “Crispr low ethanol”, “NADH *Cerevisiae*”, “EU GMO”

A partir de aquí se seleccionaron los artículos más recientes y con mejores resultados reduciendo alcohol o aquellos cuyos resultados parecían interesantes y podrían servir de base a estudios posteriores.

La búsqueda se centró en artículos posteriores a 2010 aunque excepcionalmente se recurrió a estudios anteriores.

Resultados y Discusión

Hasta la fecha muchas son las estrategias empleadas para intentar reducir el contenido alcohólico en el vino. Podemos agruparlas en 4 grupos fundamentales:

Prácticas culturales en viña

Una de las prácticas más efectivas consiste en reducir el área foliar para con ello reducir el índice SA / P (superficie foliar/ rendimiento). El área foliar determina la cantidad de carbono que la planta es capaz de fijar mediante la fotosíntesis, en época de maduración este carbono es transformado en azúcares y su destino principal son las bayas. Hay estudios que muestran que si realiza una defoliación parcial o un despuntado después del cuajado es posible reducir notablemente la cantidad de sólidos solubles (Stoll et al., 2010), si bien en tintos puede venir asociado una reducción del contenido de antocianos (Martínez de Toda et al., 2013). Otros ensayos constatan que defoliar después del envero en los 2/3 superiores del brote permite una ligera reducción del grado sin que el resto de parámetros importantes se vean afectados (acidez, pH, antocianos...) (Poni et al., 2013).

Otra opción sería la aplicación de inhibidores de etileno, la hormona responsable de desencadenar el proceso de maduración, este método se ha probado eficaz a la hora de atrasar la maduración (Böttcher et al., 2010) que al fin y al cabo es lo que busca el sector, cuanto más tarde empiece a madurar la uva, menos azúcares se acumularán.

Adaptar la fecha de cosecha a es sin duda otra estrategia. En el sector enológico, sobre todo en la elaboración de tintos, existe la tendencia de atrasar la fecha de cosecha

persiguiendo conseguir la madurez fenólica para que los taninos sean más suaves. Esto permite elaborar un vino más redondo, con cuerpo, apto para el envejecimiento, con aromas de fruta madura y untuoso gracias al glicerol y evita los toques vegetales y la astringencia asociada a los taninos menos maduros. Siempre asumimos que esto es lo que el consumidor desea, pero en un estudio se demostró que no es necesariamente así (Bindon et al., 2014). El ensayo se realizó con Cabernet Sauvignon, una variedad rica en pirazinas que da notas de pimienta verde cuando no madura lo suficiente, se vendimiaron las uvas en cosechas sucesivas y se vinificaron las partidas por separado obteniendo vinos con diferente grado de madurez. Los vinos se sometieron al veredicto de los consumidores y sorprendió que, si bien los vinos más maduros tenían más fruta, eran más cálidos y glicéricos y tenían menos notas de vegetales, la preferencia de los consumidores no aumentaba con el grado de madurez y valoraron de forma similar vinos de 13,5° y de 15,5°.

Prácticas fermentativas y enológicas.

Coupages

En la misma línea de jugar con la fecha de cosecha estaría la estrategia de hacer vendimias sucesivas para luego ensamblar los distintos vinos y reducir el grado del producto final, obviamente esta opción afectará también a otros parámetros, como la acidez, y conseguir un resultado organolépticamente satisfactorio puede resultar complicado y seguramente no será reproducible de una cosecha para otra.

Extracción de azúcares

La nano-filtración a través de membranas del mosto permite reducir (o aumentar) el contenido de azúcares, consiste en filtrar una porción determinada del mosto de forma que los azúcares queden retenidos y volver añadir la porción filtrada, el problema es que no es un método selectivo y otros compuestos interesantes como aromas y antocianos quedan también retenidos, dando como resultado vinos menos aromáticos y con menos color. Esto unido al coste del equipo hace de esta técnica una opción poco atractiva (García et al., 2010).

Adición de enzimas

También se han llevado a cabo estudios con la encima glucosa oxidasa (GOx), (Biyela et al., 2009) extraída del hongo *Aspergillus niger*, que es capaz de oxidar la glucosa hasta transformarla en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, su utilización por tanto reduce el grado y aumenta la acidez, resultados a priori positivos en el contexto actual. No obstante, la enzima también tiene la capacidad de oxidar compuestos fenólicos dando como consecuencia alteraciones cromáticas no deseadas (pardeamiento). Además, su actividad aumenta el número de grupos carbonilos que pueden combinarse con el SO₂, de forma que, los vinos necesitan mayor cantidad de sulfuroso para protegerlos de posibles contaminaciones y de la oxidación. Organolépticamente los vinos obtenidos son similares a los que resultarían de una vendimia afectada de *Botrytis*, no en vano esta enzima también se encuentra en *Botrytis cinerea*, presentan alteraciones de color,

menos aromas a fruta fresca y menos permanencia en boca, por lo que el tratamiento con esta enzima tampoco resulta una opción interesante.

Prácticas post-fermentativas y procesos tecnológicos

Coupages o blending

El coupage también puede utilizarse para conseguir vinos con menor contenido alcohólico mezclando vinos de graduación alta con otros de graduación inferior, empleando una estrategia similar a la empleada al mezclar mostos o al vendimiar en fechas diferentes para luego mezclar los vinos. Por lo general, además del grado, suelen diferir también el resto de parámetros de forma que vinos con menos grado acostumbran a presentar también acideces más altas y los taninos poco maduros suelen tener notas astringentes y vegetales, por ello esta estrategia debe estar siempre unida al análisis sensorial y puede resultar conveniente realizar tratamientos agresivos con bentonita y carbón que conviertan el vino poco maduro en un líquido neutro sin aromas ni color que únicamente baje grado y aumente acidez sin aportar ninguna nota adicional. Esta estrategia se empleó en un ensayo para “neutralizar” el producto obtenido de vinificar los racimos procedentes del aclareo en variedades como Cabernet Sauvignon, Merlot y Bobal, que posteriormente se mezclaron con los respectivos vinos control vendimiados en una vez alcanzada la madurez fenólica, consiguiendo una reducción de grado de 0.9%, 1,7% y 3% v/v respectivamente (Kontoudakis et al., 2011), el análisis sensorial solamente arrojó diferencias significativas en una de las variedades, por lo que resulta una opción digna de valorar.

Extracción de alcohol

Actualmente existen varias alternativas tecnológicas para extraer el alcohol por medios físicos. Tradicionalmente se empleaba la destilación fraccionada basada en la diferencia entre la temperatura de ebullición del etanol y el agua, pero este método tenía la contrapartida de generar aromas desagradables ya que las altas temperaturas también afectaban al resto de compuestos. Actualmente el avance de la ciencia ofrece muchas alternativas basadas en tecnología de membranas como la osmosis inversa, la pertracción evaporativa, la pervaporación o la destilación osmótica, otro tipo de técnicas incluyen la columna de conos rotativos y la extracción con CO₂ supercrítico. Todos ellos se han demostrado eficaces a la hora de extraer etanol del vino, pero sabemos que el vino es una matriz extremadamente compleja y la reducción de un elemento acostumbra a alterar el equilibrio del resto de componentes. En un estudio sobre las consecuencias en la composición del vino de la desalcoholización parcial mediante osmosis inversa y pertracción evaporativa (Pham et al., 2019) se concluye que si bien no hubo diferencias en los valores de pH o acidez volátil, desapareció el SO₂ libre, hubo un ligero aumento de la acidez total y hubo diferencias significativas en el color y los resultados del índice de gelatina (procedimiento para medir la astringencia) debidos a cambios en la concentración de antocianinas y otros compuestos fenólicos. También se observó una reducción de esteres etílicos sea porque fueron eliminados en el proceso o porque la extracción del etanol afectó al equilibrio de su formación / hidrólisis. Desgraciadamente este estudio no incluía un análisis sensorial, pero es de esperar que el vino desalcoholizado hubiera ganado en astringencia frente al control y perdido aromas. Con

la columna de conos rotativos es posible extraer los aromas y añadirlos al vino desalcoholizado posteriormente pero es un proceso complejo con varias etapas en el que es difícil determinar el grado de desalcoholización final y el coste de la tecnología la hace inaccesible para muchos elaboradores (Diban et al., 2008). En cualquier caso, cualquier opción debe encontrar un equilibrio satisfactorio entre la reducción de etanol, el equilibrio sensorial del vino resultante, los costes y la energía consumida en el proceso.

Prácticas microbiológicas

Uso de levaduras no convencionales

S. cerevisiae es la levadura fermentadora por excelencia y hasta la fecha la única capaz de llevar a cabo fermentaciones completas (azúcares residuales <2 g/L), no obstante, en el epitelio de la uva se encuentran multitud de especies de levaduras y demás flora bacteriana que tienen allí su hábitat natural. En fermentaciones espontaneas estas especies conviven con *S. cerevisiae* en los estadios iniciales, pero llega un punto en que las condiciones son demasiado desfavorables para ellas, por el elevado contenido en etanol y por la presión de *S. cerevisiae* que acaba imponiéndose.

En los últimos años se están llevando a cabo muchos estudios encaminados a aislar y caracterizar las especies de levaduras no convencionales (también conocidas como no-*Saccharomyces*) por su papel durante la fermentación alcohólica. Hasta ahora se las veía como alternativas que permitían cambiar sensorialmente el vino aportando otros aromas y añadiendo complejidad para diferenciarse de la competencia. Ahora, además, se las ve como una alternativa que podría reducir el contenido alcohólico. Un estudio realizado

con la cepa *Metschnikowia pulcherrima* AWRI3050 (Varela et al., 2017) mostró resultados alentadores en una fermentación realizada en laboratorio con la variedad merlot. El vino resultante presentaba un perfil similar al fermentado usando *S. cerevisiae* y en una evaluación sensorial obtuvo puntuaciones altas en marcadores como frutos rojos, frutal... además de una reducción de 1,7% v/v del contenido alcohólico y mayor concentración de glicerol.

Tabla 1: Resumen de los estudios recientes más significativos que utilizan levaduras no *Saccharomyces* para reducir el contenido etílico en vinos. Se muestra la reducción de etanol y su impacto en la composición y la percepción sensorial respecto al control fermentado con *S. Cerevisiae*. Fuente: Varela & Varela 2019.

Levadura no <i>saccharomyces</i> ^a	Escala y condiciones de fermentación	Varietal	Reducción de etanol ^b	Impacto en composición o atributos sensoriales ^c
<i>Candida sake</i>	Escala laboratorio	Tempranillo	2,40%	Aumento de sorbitol, baja producción de ésteres etílicos. Sin análisis sensorial
<i>Candida stellata</i>	Media escala	Chardonnay	0,70%	Aumento de glicerol y acetato de etilo, descenso de atributos "floral" y "frutal"
<i>Candida szemlinina</i>	Escala piloto aireación	Riesling	0,80%	Aumento de oxidación y atributos de "disolvente"
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Escala media	Pinotage	0,80%	Aumento de descriptores "avellanas", "café", "caramelo", "cereza" y "acetona"
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Escala laboratorio	Tempranillo	1,20%	Reducción de la intensidad y la calidad aromática, más herbáceo
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Escala industrial	Sangiovese	0,70%	Aumento de acidez y atributo "especiado"
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Escala laboratorio	Chardonnay	0,90%	Más concentración de ésteres y alcoholes superiores, reducción de acidez volátil. Sin análisis sensorial
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Escala laboratorio	Shiraz	1,60%	Más concentración de ésteres y alcoholes superiores, reducción de acidez volátil. Sin análisis sensorial
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Escala laboratorio	Verdicchio	1,40%	Aumento de genariol y acetaldehído. Sin análisis sensorial
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Escala laboratorio aireación	Malvasia + Viura	2,20%	Sin datos de compuestos volátiles ni análisis sensorial.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Escala piloto	Merlot	1,00%	Aumento de descriptores de frutos rojos
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Escala piloto aireación	Riesling	3,80%	Menos aromas limpios y frutales, aumento de los descriptores "vinagre", "oxidación" y "disolvente"
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Escala piloto aireación	Viura-Malvasía	0,80%	Aumento de glicerol, descenso de los atributos "fruta tropical", "fruta blanca" y aumento de "oxidación"
<i>Pichia guilliermodii</i>	Escala piloto aireación	Riesling	2,00%	Menos aromas limpios y frutales, aumento de los descriptores "vinagre" y "reducción"
<i>Pichia kluyveri</i>	Escala piloto aireación	Riesling	3,00%	Menos aromas limpios y frutales, aumento de los descriptores "vinagre", "oxidación" y "disolvente"
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Escala media	Airen	0,70%	Menos concentración de ácido málico y de descriptores de acidez, aumento de amargor
<i>Starmerella baombicola</i>	Escala laboratorio	Barbera	0,70%	Aumento de glicerol. Sin análisis sensorial
<i>Starmerella bacillaris</i>	Escala laboratorio	Verdicchio	1,60%	Aumento de acetato de etilo y acetato de isoamilo. Sin análisis sensorial

También ha habido ensayos prometedores con *Sacchromyces uvarum* en vinos de Malvasia delle Lipari, en que el vino resultante comparado con el control fermentado con

S. cerevisiae tenía más atributos positivos y menos negativos y consiguió reducir el contenido alcohólico (- 0,7% v/v) y la acidez volátil al tiempo que incrementaba la total (Muratore et al., 2007). En la tabla 1 aparece un resumen con los resultados de estudios recientes llevados a cabo con levaduras no convencionales, algunos con resultados muy positivos en cuanto a la reducción de alcohol. El problema es que muchos de ellos no valoraron organolépticamente los vinos resultantes y otros lo hicieron pero los resultados no fueron satisfactorios.

Inoculación secuencial

La inoculación secuencial combinando una levadura no convencional y *S. cerevisiae* es una buena alternativa para conseguir una ligera reducción en el contenido final de etanol.

En la inoculación secuencial se inocula una cepa no convencional para que deje su huella organoléptica y pasado un tiempo (entre 24-48 horas normalmente), se inocula una cepa de *S. cerevisiae* para que pueda acabar efectivamente la fermentación alcohólica.

Se ha aislado una cepa de *Metschnikowia pulcherrima* capaz de reducir 0,9% y un 1,6% el contenido de etanol en vinos de las variedades Chardonnay y Shiraz respectivamente en un inoculación secuencial con *S. cerevisiae* (Contreras et al., 2015) tal como se recoge en la Tabla 1, pero el estudio no incluía datos sobre el análisis sensorial. Más recientemente (Hranilovica et al., 2020) otro estudio analizó como se comportaban diferentes cepas de *M. pulcherrima* y como afectaba al producto final el momento de la segunda inoculación con *S. cerevisiae*. En este caso se consiguió una reducción en el contenido alcohólico de hasta un 1,6% v/v en la fermentación de un mosto mezcla de Chardonnay y Semillon.

A la vista de los resultados parece que la especie *M. pulcherrima* es una buena alternativa para llevar a cabo una inoculación secuencial. No obstante, los efectos de las inoculaciones secuenciales son muy variables dependiendo de las especies y cepas de levaduras implicadas y la variedad de uva usada.

Modificaciones genéticas

Hibridaciones de cepas

La levadura vínica convencional es *S. cerevisiae*, históricamente se impuso la creencia de que el uso de otras especies de levaduras estaba asociado a desviaciones durante la fermentación y también en el producto final, de ahí que la tendencia fuera la selección de cepas *Saccharomyces* y la inoculación como método para arrancar de forma segura y eficiente la fermentación. Recientemente, numerosos estudios han tenido lugar con el objetivo de conseguir aislar o crear mediante hibridación cepas de esta especie que produjeran menos alcohol. El problema es que la mayoría tienen un rendimiento etílico similar debido a la selección natural que esta especie arrastra desde hace milenios y a que supone una de sus grandes ventajas competitivas, por lo que ni el aislamiento ni la recombinación han ofrecido hasta la fecha una cepa de *S. Cerevisiae* con menor rendimiento fermentativo.

Dentro del género de levaduras *Saccharomyces*, encontramos también otras especies como *S. bayanus*, *S. eubayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. uvarum*, entre otros. Todos ellos comparten la característica de ser muy eficientes fermentando de azúcares y son buenos

candidatos para crear híbridos con posibilidades de éxito en el mundo enológico. De hecho, un híbrido natural entre *S. cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii* aislado en Suiza se comercializa actualmente como W27 por Lallemand para la elaboración de blancos por su capacidad fermentadora a baja temperatura. La especie *S. kudriavzevii* es criotolerante, es decir que presenta mejor rendimiento a temperaturas bajas. Un ensayo de laboratorio comparó el rendimiento fermentativo de *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* IFO 1802T, y W27 que es el híbrido de las anteriores en micro vinificaciones de un mosto sintético que reproducía las características del mosto de uva (Arroyo et al., 2010).

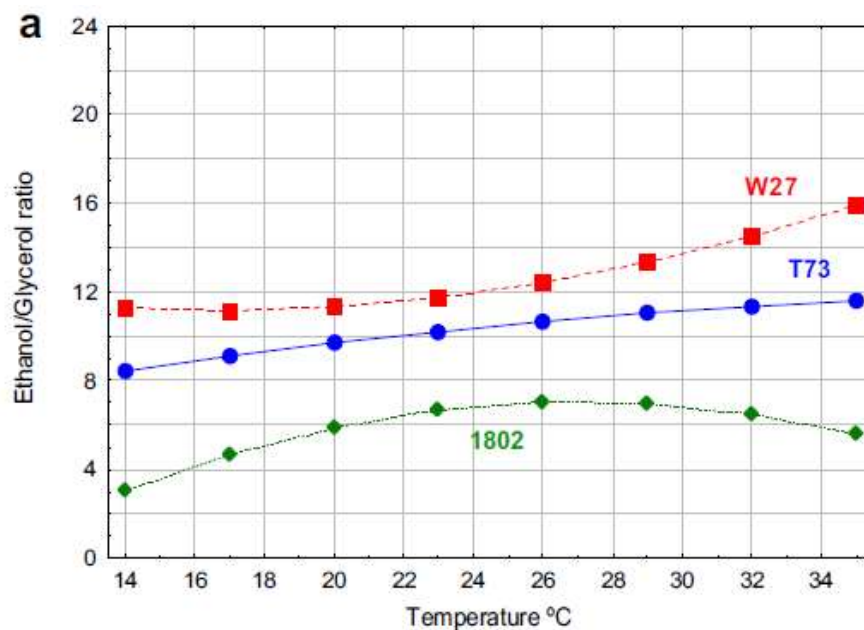


Fig.2: Gráfico que representa la relación entre el ratio etanol/glicerol en función de la temperatura de fermentación de *S. cerevisiae* T73, *S. kudriavzevii* IFO 1802T y el híbrido natural de las anteriores W27. (Fuente: Arroyo et al., 2010).

El estudio demuestra que el ratio etanol/glicerol varía enormemente en función de las condiciones en que se desarrolle la fermentación y en función de la especie (figura 2), y que el ratio etanol/glicerol de *S. kudriavzevii* IFO 1802T supone $\frac{1}{4}$ del W27 y menos de

la mitad de T73. Esto es significativo porque el etanol y el glicerol se generan en la misma vía metabólica, y por tanto cuanto más glicerol se genere menos etanol podrá producirse (figura 1). Las cantidades de glicerol producidas a 14°C fueron 4.85 (± 0.43), 5.72 (± 0.65) y 13.43 (± 1.45) g/L para T73, W27 y 1802, respectivamente. El estudio demostró que otros factores externos como la concentración de azúcares en el medio y el pH también afectaban al ratio etanol/glicerol de forma que cuanto más rico era el mosto y más bajo el pH más glicerol se generaba en los tres casos. Desgraciadamente este estudio no ofrece datos sobre las características organolépticas de los fermentados resultantes y ni siquiera se realizó con mosto de uva, pero señala la importancia de adaptar las condiciones de la fermentación para minimizar el etanol.

Delección sobreexpresión de genes

Hasta la fecha las modificaciones genéticas más exitosas a la hora de reducir el rendimiento alcohólico en *S. Cerevisiae* consistían en desviar el flujo de carbohidratos de la producción de etanol hacia el glicerol pero tenían la contrapartida de aumentar la acidez volátil. No obstante, un experimento llevado a cabo mediante ingeniería genética (Ehsani et al., 2009), que consistía en manipular los propios genes de *S. Cerevisiae*, permitió reducir el contenido alcohólico en un 3% v/v sin que aumentara la producción de ácido acético. La modificación consistía en:

- Sobre-expresar el gen GPD1 que codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y así potenciar el flujo hacia la formación de glicerol.
- Eliminar el gen ALD6 que codifica la enzima acetaldehído deshidrogenasa, de esta forma que quedaría inhibida la formación de ácido acético. No obstante, esta

modificación supone un aumento significativo de acetoina, compuesto que también tiene un impacto sensorial desagradable.

- Sobre-expresar el gen Bdh1 que codifica para la butanodiol deshidrogenasa, la proteína que reduce la acetoina a 2,3-butanodiol, que es un compuesto sin impacto sensorial. Si bien la reacción de reducción de la acetoina también tiene NADH como cofactor, durante la fermentación alcohólica el factor más limitante sería la síntesis de Bdh1.

Muta génesis dirigida

La modificación genética tiene como objetivo mejorar determinados aspectos de la fermentación y va dirigida a locus concretos de forma que el resto del genoma quede inalterado y no se pierdan las características positivas de la cepa original. Múltiples estudios se han llevado a cabo en este campo aunque únicamente 2 cepas modificadas genéticamente (GMO, genetic modified organism) han llegado a comercializarse, ambas reducen posibles riesgos para la salud del consumidor: una reduce la formación de aminas biógenas (Husnik et al., 2006) y la otra el carbamato de etilo (Coulon et al., 2006). Esta tecnología también ha sido utilizada para reducir el contenido de etanol desviando el flujo de carbohidratos hacia otros destinos diferentes a la síntesis de etanol, pero tan solo se han desarrollado y usado a nivel de laboratorio. Las cepas modificadas genéticamente han producido entre 1,5-2,5% v/v menos alcohol que las cepas originales, pero normalmente la modificación afectaba también a la fracción volátil de los vinos resultantes. Tan solo un ensayo reporta una reducción de 1,89% v/v de etanol sin

incremento del ácido acético ni del glicerol, (Cuello et al., 2017). El estudio consistía en introducir mutaciones en el terminal C del gen PDC2 (ver fig. 1). Éste codifica el factor de transcripción que regula la disponibilidad de las isozimas que catalizan la reacción del pirúvico a acetaldehído en la vía de síntesis del etanol. Desgraciadamente este ensayo tampoco aportaba datos sobre el perfil sensorial de los vinos resultantes.

Al fin y al cabo, para no comprometer la calidad del producto final es básico favorecer la síntesis de metabolitos deseables y evitar la formación de otros nuevos que puedan afectar al perfil sensorial de forma dramática.

Mutaciones vía evolución adaptativa _ALE (Adaptative Laboratory Evolution)

Esta estrategia consiste en provocar a las levaduras un estrés creciente en el medio de cultivo durante muchas generaciones, de manera que solo aquellas capaces de adaptarse a las condiciones hostiles puedan sobrevivir. Se han llevado a cabo varios ensayos con estrategias diferentes que perseguían alterar el metabolismo de carbono de las levaduras para que generen menos etanol. Aunque esta técnica supone un adelanto comparado con la mutagénesis dirigida sigue siendo una estrategia compleja por varios motivos: el medio de cultivo evoluciona a la vez que el cultivo y es complicado mantenerlo en las condiciones óptimas a lo largo de tantas generaciones, además está el riesgo de contaminaciones y el constante aislamiento de ejemplares para verificar su evolución y comparar sus características con los parentales. De momento sólo una cepa obtenida por esta vía ha llegado a comercializarse, se obtuvo aumentando el estrés hídrico osmótico en el medio de cultivo con cloruro de potasio (Tilloy et al., 2014). Las levaduras

generan glicerol como reacción al estrés osmótico y después de 200 generaciones se consiguió una cepa “evolucionada” capaz de producir más glicerol y menos etanol. Ésta, a su vez, se sometió a dos rondas de esporulación de las que resultó un híbrido capaz reducir en un 1,3% v/v el contenido alcohólico de un vino Shiraz comparado con la cepa parental.

CRISPR-Cas 9

Dentro de la categoría de ingeniería genética encontramos la revolucionaria metodología Crispr-Cas 9 (del inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Crispr associated protein 9, traducido como Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) descubierta en 2012 por las investigadoras Charpentier y Doudna y que les valió el premio nobel de química en 2020. La técnica permite realizar modificaciones en el genoma con una precisión hasta entonces inusitada. Está basada en una estrategia sacada del sistema inmunitario de las bacterias y arqueas que es capaz de recordar la secuencia del genoma de los virus invasores y eliminarla de su ADN cortando únicamente ese fragmento. Descubrieron que ciertas secuencias palindrómicas se repetían y que las secuencias intermedias a menudo formaban parte del ADN de virus, un palíndromo es una combinación de pares de bases que se lee igual en sentido 5'→3' que en sentido 3'→5'.

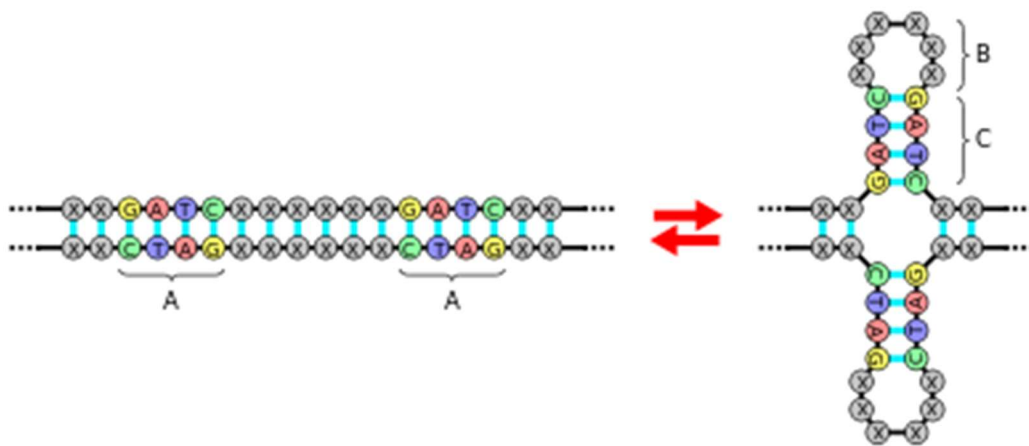


Fig.3: Representación de un palíndromo en el ADN. Fuente: Wikipedia, secuencia palindrómica.

También se observó que cercanos a esos palíndromos se encontraban unos genes, que codificaban las proteínas Cas. Descubrieron que las bacterias sintetizaban gARN que encajaba con la secuencia del ADN vírico y lo unía a estas proteínas, de forma que, si en el futuro un virus con ADN previamente almacenado intentaba invadir su genoma, el gARN lo reconocería y guiaría a las proteínas Cas para que lo eliminaran. Las Cas9 son endonucleasas que cortan la doble cadena en sentido ascendente hasta un PAM (Protospacer Adjacent Motif o Motivo adyacente de protoespaciador), en caso de no hallar un PAM a continuación de la secuencia de ADN la Cas no llevará a cabo la doble escisión. Lo interesante es que las proteínas Cas pueden cortar cualquier fragmento de ADN si tienen el gARN de reconocimiento adecuado. Puesto que actualmente la ciencia ya es capaz de generar cualquier secuencia de nucleótidos, se puede eliminar cualquier fragmento. Pero, además de cortar, también es posible substituir un fragmento por otro, motivo por el que se conoce esta técnica como “el corta-pegar genético”. Otra de las grandes ventajas de esta tecnología es que pueden modificarse varios locus a la vez ya que las Cas9 pueden asociarse a más de una secuencia de ARN. El CRISPR-Cas9 es

la última revolución en modificación genética ya que reduce muchísimo el tiempo necesario para los ensayos, además de abaratarlos y simplificarlos. Con el fin de introducir el CRISPR-Cas9 en la célula los investigadores se valen de plásmidos de bacterias. En este contexto no es de extrañar que hayan aparecido muchos artículos últimamente en los que se han intentado diversas modificaciones de *S. cerevisiae*, no podemos olvidar que *S. cerevisiae* siempre ha sido un modelo ideal para experimentar al tratarse de un ser unicelular eucariota de crecimiento fácil y rápido en laboratorio. Un ensayo que buscaba aumentar el rendimiento alcohólico resultó exitoso (Kui et al., 2019), logrando aumentar en un 40% la cantidad de etanol obtenida por una cepa mutante respecto a la original. Para ello realizaron una doble modificación en los genes ALDH2 y ALD4, el primero cataliza la oxidación del etanol a acetaldehído y el segundo oxida los aldehídos a acetatos. Si nos centramos en los ensayos orientados al sector enológico el número de ensayos se reduce, pero en 2017 (Vigentini et al.) un estudio modificó dos cepas comerciales de *S. Cervisiae* (EC118 y AWRI796) con el fin reducir el contenido de urea al fermentar mostos de Chardonnay y Cabernet Sauvignon. La urea es generada por las levaduras al metabolizar la arginina, un amino ácido abundante en el mosto. La célula excreta al medio el exceso de urea y esta es susceptible de reaccionar con el etanol y generar carbamato de etilo, un compuesto sometido a límites legales que puede resultar cancerígeno. La mutación consistía en eliminar uno de los transportadores de arginina, la permeasa CAN1, con ello lograron una reducción de la urea del 18,5% para la mutante de EC118 y del 35,5% para la de AWRI796, ambas cepas finalizaron la fermentación con éxito. También funcionó otro ensayo con el objetivo de reducir la urea

pero esta vez para la elaboración de vino de arroz y siguiendo una estrategia diferente (Wu et al., 2020). En esta ocasión sobre expresaron el gen DUR3, que codifica el transportador que da paso a la urea al interior de la célula, en una cepa N85 que ya había sido modificada por ellos en un ensayo previo (Wu2016) para sobre expresar DUR1,2 (gen que codifica para la amidoliasa encargada de hidrolizar la urea en NH₃ y CO₂) de tal manera que las levaduras no producían menos urea pero eran más eficientes reabsorbiéndola y transformándola en otros metabolitos menos peligrosos.

Entre los ensayos que se han realizado hasta la fecha uno de los más prometedores fue el llevado a cabo por Wyk et al. en 2020, en que consiguieron autoclonar la cepa AWRI1631 de forma produjera más ésteres y más glicerol en la fermentación de Riesling. Para ello crearon dos cepas mutantes en las que se había sobre-expresado los genes ATF1 y GDF1 respectivamente usando la tecnología CRISPR/CAS 9 (ver figuras 6 y 1). El primero codifica para la alcohol acetiltransferasa, y es necesario en la producción de ésteres y le segundo transforma la dihidroxiacetona fosfato en glicerol-3-fosfato en la formación de glicerol. Estas dos cepas se combinaron mediante mating para conseguir una única cepa con ambas características.

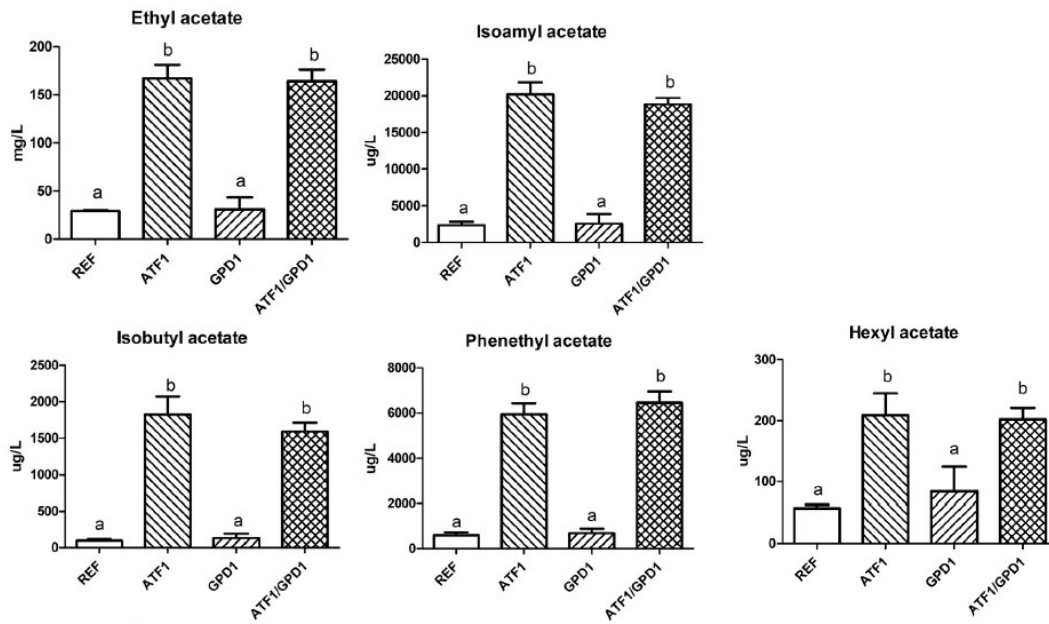


Fig.4: Gráficos que representan la producción de esteres de acetato de la levaduras mutantes ATF1, GPD1 y ATF1/GPD1 respecto al control REF sin mutaciones. (Fuente: Wyk et al. 2020)

Llama la atención de este estudio que pudieran aumentar de forma significativa la producción de glicerol sin disminuir el contenido en etanol (ver fig. 5). La mayoría de los estudios que se han realizado siguiendo esta estrategia aumentaban el glicerol pero reducían el etanol y aumentaban el ácido acético.

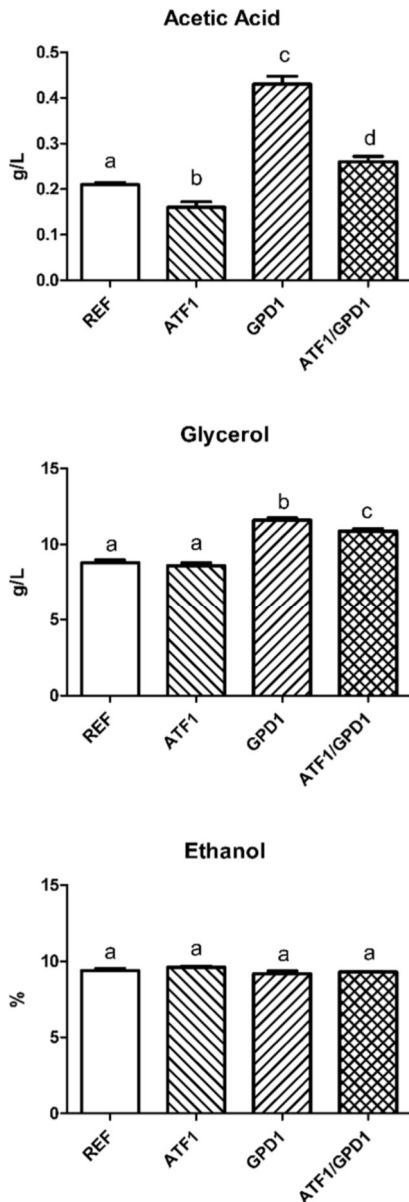


Fig. 5: En las gráficas de la izquierda podemos observar como la mutante que sobre-expresa GPD1 aumenta el contenido de glicerol y acético, pero no disminuye el rendimiento en etanol. Si miramos los resultados de la mutante ATF1 vemos que no hay diferencias significativas respecto al control en cuanto al rendimiento en glicerol y etanol pero si disminuye el contenido un 25% en ácido acético, como consecuencia de sobre-expresar el gen que transforma el acetil-CoA en acetatos. (Fuente: Wyk et al. 2020)

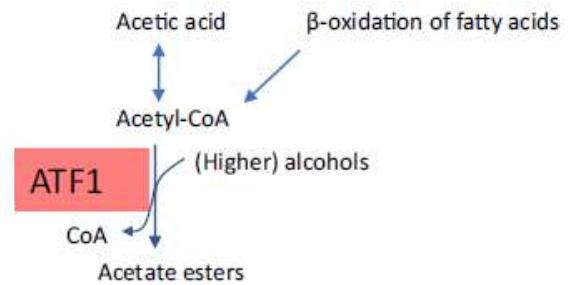


Fig. 6: Representación del mecanismo de transformación del ácido acético en acetatos. Fuente: Vilela et al., 2021)

Se trata de una modificación muy interesante pero el contenido en etanol no disminuye. No obstante, valdría la pena repetir el ensayo y ver si los resultados son consistentes, pues si aumenta el glicerol otro compuesto debería dejar de generarse de forma proporcional y teóricamente debería ser el etanol.

En el sector enológico la tecnología CRISPR-Cas9 también se ha utilizado para determinar la importancia del transportador sin porte Stl1 H⁺/glicerol en la fermentación de icewein con K1-V1116 (Muysson et al., 2019) y para arrojar luz sobre los genes

implicados en la producción de acetato de feniletilo, responsable del aroma a rosas (Trinidad et al., 2017).

Equilibrio Redox y la fermentación alcohólica.

La síntesis de etanol en *S. Cerevisiae* está asociada a su sistema redox, al igual que lo están la producción de glicerol, ácido acético, acetoina y butandiol. Alterar una vía sobre expresando o eliminando un gen no basta si no tenemos en cuenta que el equilibrio redox celular debe poder mantenerse.

En la figura 1 observamos que algunas reacciones necesitan de la forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida y adenina o NAD⁺ como cofactor (ej.: el paso de acetaldehído a ácido acético) mientras que otras precisan de la forma reducida o NADH (paso de dihidroxicetona a glicerol).

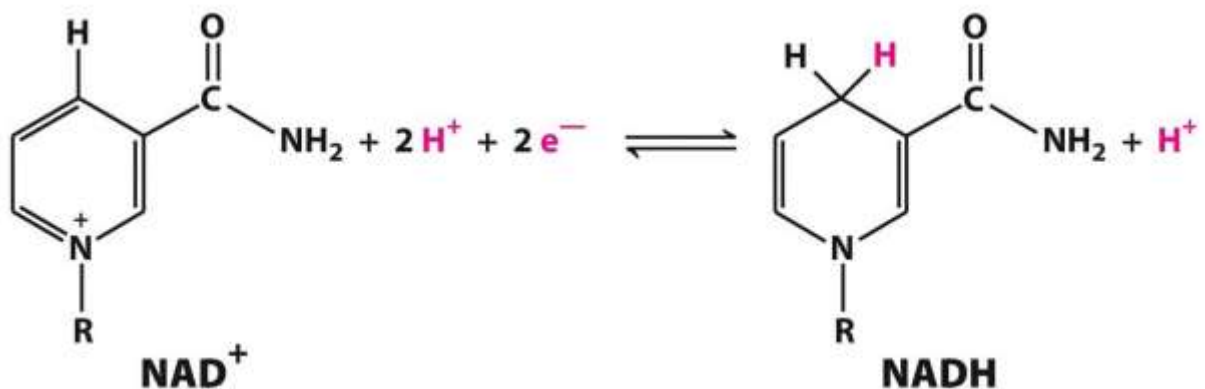


Fig. 7. Representación gráfica de las versiones oxidada/reducida de la molécula de NAD⁺/ NADH. (Fuente: Biochemistry a short course. 2nd edition 2013 W.H. Feeman and company)

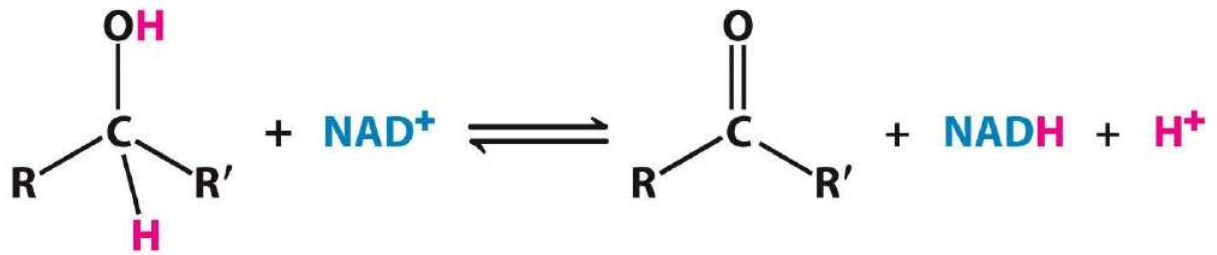


Fig. 8. Ejemplo del funcionamiento del NAD⁺/NADH como cofactor en una reacción redox. (Fuente: Biochemistry a short course. 2nd edition 2013 W.H. Feeman and company)

En función del estado redox de la célula, es decir, de si tiene exceso/carencia de la forma reducida/oxidada se propiciarán unas rutas u otras. De ahí que muchos experimentos hayan conseguido reducir el rendimiento étlico pero a costa de aumentar la producción de ácido acético, pues la célula potencia esta vía para regenerar NADH. Además, dentro de la célula existen dos zonas interdependientes pero separadas donde se oxida/reduce el NADH/NAD⁺, la mitocondria y el citoplasma. Un ensayo demostró que el aumento del NADH mitocondrial se traduce en producción de etanol, pues inhibe la entrada de piruvato al ciclo de Krebs, mientras que un aumento del NADH citoplasmático supone un aumento en la producción de glicerol (Hou et al., 2010).

La membrana interna mitocondrial es impermeable al NADH/NAD⁺ por lo que los intercambios se producen a través transportadores anti-porte de malato/2 oxoglutarato y aspartato/glutamato (figura 9). El circuito puede operar en ambos sentidos, en la gluconeogénesis funciona en sentido inverso al presentado en la figura y permite expulsar oxalacetato de la mitocondria y generar NADH en el citosol.

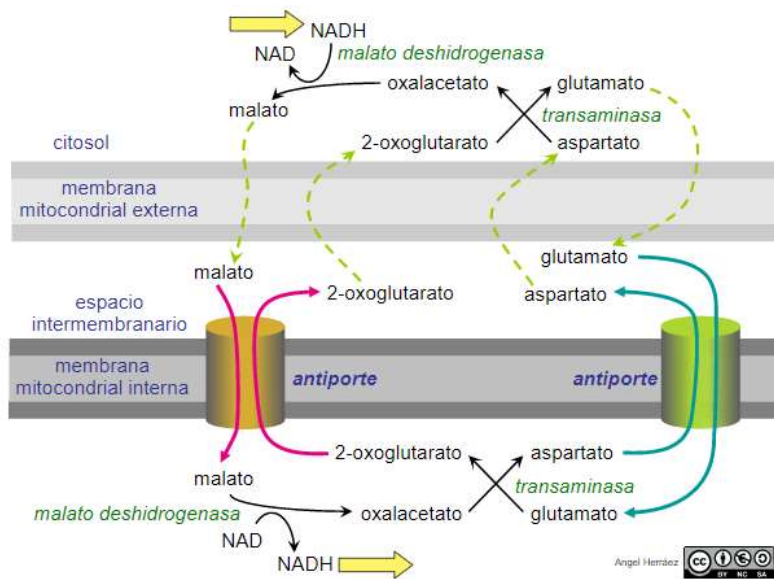


Fig.9: Representación gráfica del funcionamiento de los transportadores malto y aspartato mitocondriales.
(Fuente: <http://biomodel.uah.es/metab/lanza.htm>)

Queda claro que cualquier modificación genética encaminada a reducir el rendimiento de etanol en la producción de vino con *S. Cerevisiae* debe tomar en consideración el equilibrio redox celular.

Discusión global

Situación de los OGM en La Unión Europea

La legislación de la Unión Europea (UE) es una de las más restrictivas en cuanto a la entrada de Organismos Genéticamente Modificados (OGM). Cualquier producto destinado para el consumo humano o de animales, que haya sido modificado genéticamente debe ser aprobado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Para ello el vendedor debe probar que el producto es seguro y que no supone un riesgo para el ser humano ni para el medioambiente. Los cultivos vegetales OGM son los que más trabas encuentran, tanto a nivel legislativo como de la opinión pública. Aun así, se han autorizado algunas especies de cereales y en nuestro país se cultiva maíz Genéticamente Modificado (GM). Cada país tiene derecho a reservarse un veto nacional a pesar de que el producto tenga la aprobación de la EFSA. La realidad es compleja y la opinión pública respecto a estos organismos varía en función de la percepción de utilidad y riesgo que tiene la ciudadanía.

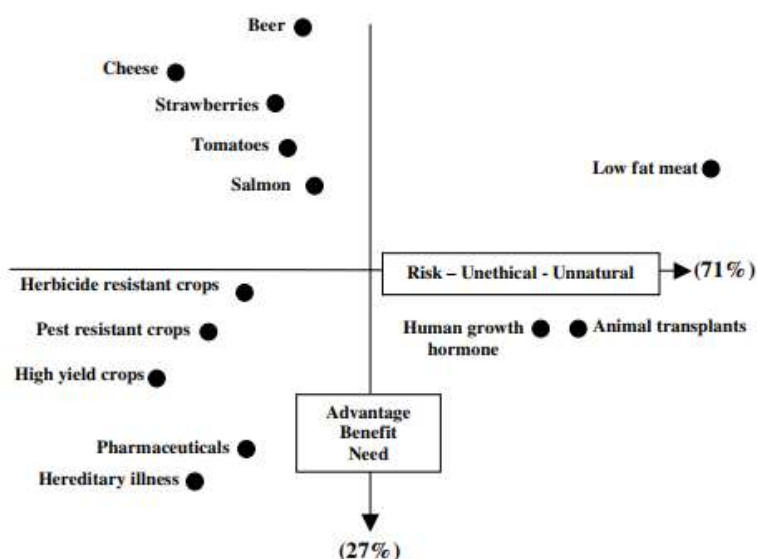


Fig. 10. Percepción de la opinión pública respecto a los OGM. (Fuente: Frewer et al., 2003)

Así, se considera poco útil la modificación de una levadura para elaborar cerveza pero muy útil que se haga para curar enfermedades hereditarias. No obstante, muchos europeos consumen ganado que ha sido alimentado con cultivos OGM importados, por lo que reina la paradoja. Aunque la UE permite la investigación con OGM, muchos científicos consideran que Europa está cuartando su competitividad en el ámbito científico, pues es poco probable que se lleve a cabo un estudio si el hallazgo no puede comercializarse posteriormente.

Perspectivas de futuro

Teniendo en cuenta todos los estudios analizados con sus pros y sus contras, a continuación comentaré cuáles serían mis propuestas personales para conseguir una reducción de etanol en el vino utilizando la tecnología CRISPR.

Una opción sería reproducir el experimento de Ehsani et al. de 2009 en que conseguían reducir el etanol sin aumentar el ácido acético pero utilizando la tecnología CRISPR/CAS 9 y testarla en una microvinificación con mosto. El uso de la tecnología facilitaría el proceso de creación de la levadura mutante y la fermentación de mosto permitiría valorar el resultado sensorial y ver si es una opción realmente válida para el sector enológico. Esta posibilidad no tendría los inconvenientes legales del uso de material genético exógeno. Los organismos auto-clonados, es decir, aquellos han sido modificados con genes de su propio ADN tienen muchas más opciones de ser aprobados en la UE que aquellos en los que no se han introducido genes de otras especies, ya que técnicamente podrían no considerarse OGM.

Otra posibilidad que aún no ha sido probada consistiría en aprovechar la tecnología CRISPR/CAS9 para crear una cepa de *S. cerevisiae* capaz de generar más ácido fórmico. El ácido fórmico en presencia de NAD⁺ se transforma en CO₂ + NADH, lo que podría solucionar el problema de la regeneración de NADH citosólico sin que la célula tenga que recurrir a la formación de ácido acético para ello. El inconveniente de esta alternativa es que implica insertar un gen que no está en el genoma de *S. cerevisiae*, se trata del PFL de *Escherichia coli* que codifica para la piruvato formato liasa y que permitiría la sobreproducción de ácido fórmico. Esta modificación ya fue hecha en un ensayo que perseguía producir hidrógeno a nivel industrial (Waks & Silver 2009). Si a esto uniéramos la sobreexpresión del GPD1, para desviar el flujo de carbohidratos hacia la síntesis de glicerol, se podría teóricamente reducir rendimiento alcohólico de la fermentación sin alterar el perfil sensorial pues no aumentaría el contenido en ácido acético. No obstante, parece poco realista a día de hoy que modificaciones genéticas que implican introducir partes del genoma de otra especie, pueden aprobarse en la Unión Europea. Con el marco legal vigente parece más acertado invertir en proyectos que, en caso de tener éxito, puedan tener una aplicación más allá de la investigación científica.

Conclusiones

La tecnología CRISPR abre la puerta a infinidad de posibilidades pero, dado que los productos OGM no pueden comercializarse para consumo de animales o humanos en la UE, los productores europeos deberían optar por aplicar otras estrategias que ya se han probado efectivas y ver cual o cuales son las que mejor se adaptan a su situación. Si miramos todo el abanico de posibilidades las más útiles por su facilidad de aplicación de forma inmediata para prácticamente la totalidad de productores serían:

- ✓ Defoliación / despuntado en viña
- ✓ Adaptar la fecha de la cosecha
- ✓ Uso de levaduras no convencionales
- ✓ Adaptar las condiciones de fermentación

Obviamente nada de esto tiene sentido si seguimos contribuyendo a aumentar el problema del cambio climático. El futuro de la viticultura y la enología, como cualquier otro futuro, será verde o no será. Intentar rebajar el alcohol de los vinos mediante cualquier estrategia y seguir produciendo vino de forma no sostenible sería como poner una tirita para poder seguir golpeándonos sin que la sangre manche el martillo.

Si en un futuro el marco legal lo permite, la tecnología CRISPR revolucionará, sin lugar a dudas, no sólo la enología si no cualquier campo relacionado con la biotecnología. Llegado ese momento se podrán considerar opciones como las propuestas en el último apartado y muchas otras.

Bibliografía

Arroyo FN, Pérez R, Querol A, Barrio E. Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. *Food Microbiol.* 2010 ;27(5):628-637.

Bakker BM, Bro C, Kötter P, Luttik MA, van Dijken JP, Pronk JT. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 2000; 182(17):4730-4737. doi:10.1128/JB.182.17.4730-4737.2000

Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJ, et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2001; 25(1):15-37. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00570.x

Bindon K, Holt H, Williamson PO, Varela C, Herderich M, Francis IL. Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 2. Wine sensory properties and consumer preference. *Food Chem.* 2014; 154:90-101. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.099.

Biyela BNE, du Toit W, Divol B, Malherbe D, Rensburg P. (2009). The production of reduced-alcohol wines using Gluzyme Mono® 10.000 BG-treated grape juice. *South African Journal of Enology and Viticulture.* 30. 10.21548/30-2-1432.

Böttcher C, Harvey K, Forde CG, Boss PK, Davies C. Auxin treatment of pre-veraison grape (*Vitis vinifera* L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation. (2010). *Australian Journal of Grape and Wine Research.* Vol. 17, Issue 1.

Ciani M, Morales P, Comitini F, et al. Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines. *Front Microbiol.* 2016;7:642. Published 2016 May 4. doi:10.3389/fmicb.2016.00642

Contreras A, Hidalgo C, Henschke PA, Chambers PJ, Curtin C, Varela C. Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(5):1670-1678. doi:10.1128/AEM.03780-13

Contreras, A, Curtin C, Varela C. Yeast population dynamics reveal a potential 'collaboration' between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 1885–1895 (2015).

Coulon J, Husnik J, Inglis D, Merwe G, Lonvaud-Funel A, Erasmus D, Vuuren H. (2006). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to Minimize the Production of Ethyl Carbamate in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture.* 57.

Cuello RA, Flores KJ, Mercado LA et al. Construction of low-ethanol-wine yeasts through partial deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* PDC2 gene. *AMB Expr* 7, 67 (2017).

Diban N, Athes V, Bes M, Souchon I. (2008). Ethanol and aroma compounds transfer study for partial dealcoholization of wine using membrane contactor, *Journal of Membrane Science*, Volume 311, Issues 1–2,

Ehsani M, Fernández MR, Biosca JA, Julien A, Dequin S. Engineering of 2,3-butanediol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glycerol-overproducing, low-alcohol *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(10):3196-3205. doi:10.1128/AEM.02157-08

- El Rayess Y, Mietton-Peuchot M. Membrane Technologies in Wine Industry: An Overview. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(12):2005-2020. doi:10.1080/10408398.2013.809566
- Frewer LJ, Scholderer J, Bredahl L. Communicating about the Risks and Benefits of Genetically Modified Foods: The Mediating Role of Trust. 2003. *Risk analysis.* Vol 23, issue 6. Pages 1117-1133.
- García N, Pérez S, Ortega M, González C, Mihnea M, González ML, Palacio L, Prádanos P, Hernández A. (2010). Sugar reduction in musts with nanofiltration membranes to obtain low alcohol-content wines, *Separation and Purification Technology*, Volume 76, Issue 2, Pages 158-170.
- Goold HD, Kroukamp H, Williams TC, Paulsen IT, Varela C, Pretorius IS. Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microb Biotechnol.* 2017;10(2):264-278. doi:10.1111/1751-7915.12488
- Hou J, Scalcinati G, Oldiges M, Vemuri GN. Metabolic impact of increased NADH availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(3):851-859. doi:10.1128/AEM.02040-09.
- Hranilovic A, Gambetta JM, Jeffery DW, Grbin PR, Jiranek V. Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing. *Int J Food Microbiol.* 2020; 329:108651. doi:10.1016/j.jfoodmicro.2020.108651
- Husnik JI, mVolschenk H, Bauer J, Colavizza D, Luo Z, van Vuuren HJJ. (2006). Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metabolic Engineering*, Volume 8, Issue 4, Pages 315-323,
- Jain VK, Divol B, Prior BA, Bauer FF. Effect of alternative NAD⁺-regenerating pathways on the formation of primary and secondary aroma compounds in a *Saccharomyces cerevisiae* glycerol-defective mutant. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(1):131-141. Doi: 10.1007/s00253-011-3431-z.
- Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, De Freitas V, Zamora F. (2011). Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chemistry*, Volume 124, Issue 3, Pages 767-774.
- Kui L, Xue Y, Limin L, Jingping F, Youqiang C, Wenjin H, Ting X. Using CRISPR/Cas9 for multiplex genome engineering to optimize the ethanol metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. (2019) *Biochemical Engineering Journal*, Volume 145, Pages 120-126,
- Martinez de Toda, Fernando & Sancha, J.C. & Balda, Pedro. (2013). Reducing the Sugar and pH of the Grape (*Vitis vinifera* L. cvs. 'Grenache' and 'Tempranillo') Through a Single Shoot Trimming. *South African Journal for Enology and Viticulture.* 34. 246-251. 10.21548/34-2-1101.
- Muratore G, Asmundo C, Lanza C, Caggia C, Licciardello F, Restuccia C. (2007). Influence of *Saccharomyces uvarum* on Volatile Acidity, Aromatic and Sensory Profile of Malvasia delle Lipari Wine. *Food Technology and Biotechnology.* 45. 101-106.
- Muysson J, Miller L, Robert A, Inglis D, (2019). The Use of CRISPR-Cas9 Genome Editing to Determine the Importance of Glycerol Uptake in Wine Yeast During Icewine Fermentation. *Fermentation.* 5. 93. 10.3390/fermentation5040093.
- Pham DT, Stockdale VJ, Wollan D, Jeffery DW, Wilkinson KL. Compositional Consequences of Partial Dealcoholization of Red Wine by Reverse Osmosis-Evaporative Perstraction. *Molecules.* 2019; 24(7):1404. Published 2019 Apr 10. Doi :10.3390/molecules24071404

- Poni S, Gatti M, Bernizzoni F, Civardi S, Bobeica N, Magnanini E, Palliotti A. (2013). Late leaf removal aimed at delaying ripening in cv. Sangiovese: physiological assessment and vine performance. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. Vol. 19, Issue 3.
- Raschmanová H, Weninger A, Glieder A, Kovar K, Vogl T. Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. *Biotechnol Adv*. 2018; 36(3):641-665. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.006
- Rigoulet M, Aguilaniu H, Avéret N, et al. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem*. 2004; 256-257(1-2):73-81. doi:10.1023/b:mcbi.0000009888.79484.f0
- Rocco L, Lackman J, Antalick G, Torley P, Rogiers S, Schmidtke L. (2018). Volatile and sensory profiling of Shiraz wine in response to alcohol management: comparison of harvest timing versus technological approaches. *Food Research International*. 109. 10.1016/j.foodres.2018.04.057.
- Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, Palsson BO, Feist AM. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metab Eng*. 2019; 56:1-16. doi:10.1016/j.ymben.2019.08.004
- Stovicek V, Holkenbrink C, Borodina I. CRISPR/Cas system for yeast genome engineering: advances and applications. *FEMS Yeast Res*. 2017; 17 (5):fox030. doi:10.1093/femsyr/fox030
- Stoll, Manfred & Scheidweiler, Mathias & Blank, Magali & Schultz, Hans. (2010). Possibilities to reduce the velocity of berry maturation through various leaf area to fruit ratio modifications in *Vitis vinifera* L. Riesling. *Prog. Agric. Vitic.* 127. 68-71.
- Tilloy V, Ortiz-Julien A, Dequin S. Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80(8):2623-2632.
- Trinidade B, Holt S, Souffriau B, Lopes R, Foulquié MR, Thevelein JM. Identification of Novel Alleles Conferring Superior Production of Rose Flavor Phenylethyl Acetate Using Polygenic Analysis in Yeast. *mBio*. 2017; 8(6):e01173-17. Published 2017 Nov 7.
- Tymoczko JL, Berg JM, Stryer L. *Biochemistry a short course*. 2nd edition. New York: W.H. Freeman and company; 2013. (ISBN: 1-4292-8360-2 ISBN-13: 978-1-4292-8360-1)
- Varela C, Kutyna DR, Solomon MR, et al. Evaluation of gene modification strategies for the development of low-alcohol-wine yeasts. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78 (17):6068-6077. doi:10.1128/AEM.01279-12
- Varela C, Dry PR, Kutyna DR, Francis IL, Henschke PA, Curtin CD, Chambers PJ. (2015). Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. Vol. 21, Issue 21.
- Varela C, Barker A, Tran T, Borneman A, Curtin C. Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Int J Food Microbiol*. 2017; 252: 1-9.
- Varela J & Varela C. Microbiological strategies to produce beer and wine with reduced ethanol concentration. (2019). *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 56, Pages 88-96.

Vigentini I, Gebbia M, Belotti A, Foschino R, Roth FP. CRISPR/Cas9 System as a Valuable Genome Editing Tool for Wine Yeasts with Application to Decrease Urea Production. (2017) *Front Microbiol.* 2017; 8:2194. Published 2017 Nov 9.

Vilela A. An Overview of CRISPR-Based Technologies in Wine Yeasts to Improve Wine Flavor and Safety. *Fermentation.* 2021; 7(1):5. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010005>

Waks Z, Silver PA. Engineering a synthetic dual-organism system for hydrogen production. *Appl Environ Microbiol.* 2009 75(7):1867-1875. doi:10.1128/AEM.02009-08.

Wu D, Xie W, Li X, Cai G, Lu J, Xie G. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* using the CRISPR/Cas9 system to minimize ethyl carbamate accumulation during Chinese rice wine fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020; 104 (10):4435-4444.

Wyk N, Kroukamp H, Espinosa MI, Wallbrunn C, Wendland J, Pretorius IS. Blending wine yeast phenotypes with the aid of CRISPR DNA editing technologies. (2020). *International Journal of Food Microbiology*, Volume 324, 108615.

Zheng N, Jiang S, He Y, et al. Production of low-alcohol Huangjiu with improved acidity and reduced levels of higher alcohols by fermentation with scarless ALD6 overexpression yeast. *Food Chem.* 2020; 321: 126691. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126691

Webgrafía

<http://biomodel.uah.es/metab/lanza.htm>

<https://ec.europa.eu/>

<https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto3120-01-1.pdf>

<https://science.sciencemag.org/content/339/6122/883/tab-pdf>

<https://wikipedia.org/>