



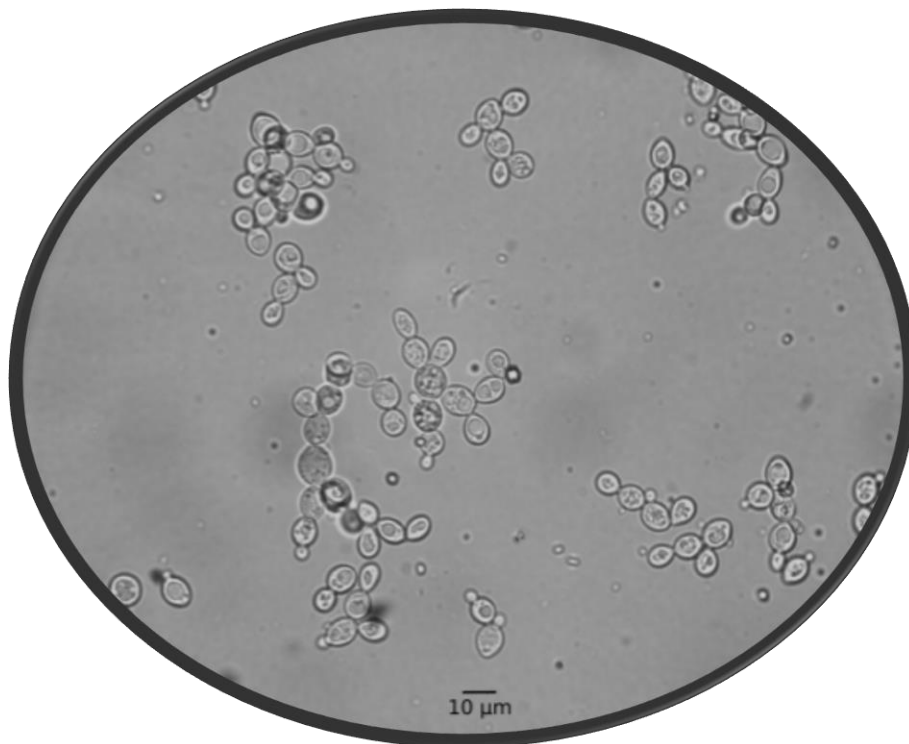
UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



INTERACCIONES ENTRE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES EN EL VINO: *TORULASPORA DELBRUECKII* Y *LACHANCEA THERMOTOLERANS*

Enrique Monzón Vázquez

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



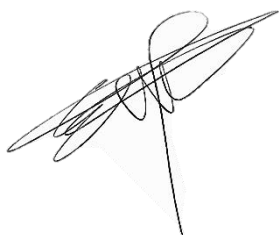
Tutor académico: María Jesús Torija Martínez, Grado de Biotecnología, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, mjesus.torija@urv.cat

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

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

Yo, Enrique Monzón Vázquez, con DNI 44721985A, soy conocedor de la guía de prevención del plagio de la URV prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 4 de Junio de 2021

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long vertical stroke extending downwards.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar, a todo el equipo del grupo de investigación de Biotecnología enológica por haberme enseñado una parte de esta profesión y por su compañerismo.

A mi tutora, la Doctora María Jesús Torija, por darme la oportunidad de hacer este TFG y brindarme su atención y paciencia en todo el proceso.

Agradecimiento especial a la futura Doctora Helena Roca, por estar conmigo día tras día, ayudándome y dándome su apoyo cuando algo salía mal. Haciendo este TFG he ganado una bonita amistad.

A mi familia, que por muy lejos que estemos, siempre puedo contar con su amor y su confianza en mí. Papá, Mamá, Tania, Jorge, estoy orgulloso de la familia que me ha tocado.

A los amigos de toda la vida y a los que he conocido por el camino, por poder contar con ellos en las buenas y en las malas, y en especial, a M. Rubio por acompañarme desde el primer año en esta aventura.

A mi sorpresa de último momento, por ser mi pilar en estos tiempos de pandemia y por los que vendrán. Gracias por cruzar esos 2000 km para verme. Te quiero.

Índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción	3
2.1 La fermentación alcohólica.....	3
2.2 El vino y su interés industrial.....	3
2.3 Ecología de la fermentación.....	4
2.4 Paradas en la fermentación del vino	5
2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.6 <i>No-Saccharomyces</i>	7
2.7 <i>Torulaspora delbrueckii</i> y <i>Lachancea thermotolerans</i>	9
2.8 Problemática	10
3. Hipótesis.....	13
4. Objetivo.....	13
5. Metodología	13
5.1 Cepas utilizadas	13
5.2 Fermentaciones	14
5.3 Análisis microbiológicos	17
6. Resultados y discusión	20
6.1 Fermentaciones con inóculo puro	20
6.2 Fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto	23
6.3 Fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto con adición de nutrientes	30
7. Conclusión.....	35
8. Autoevaluación	36
9. Bibliografía	37
9. Anexos.....	43

1. Resumen

Se ha demostrado que la utilización de levaduras *No-Saccharomyces* en la fermentación alcohólica puede proporcionar características organolépticas interesantes y que se obtengan vinos más complejos, siendo las especies de *Torulaspora delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans* las que presentan un mayor interés industrial. En estudios anteriores de la URV se ha observado que en fermentaciones secuenciales mixtas con una cepa de *T. delbrueckii* (*Td5*) y *L. thermotolerans* (*Lt2*) se producen inhibición entre ellas, siendo un efecto mayor por parte de *Td5* que de *Lt2*. En este trabajo se quiere comprobar si la inhibición entre *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* se da a nivel de especie o es específica entre estas cepas. Para ello, se realizarán fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto en mosto sintético a pH=3,3 y a 16°C, con diferentes cepas de *L. thermotolerans* (*Lt2* y *Lt Latkia*) y *T. delbrueckii* (*Td5* y *Td Biodiva*). La segunda cepa se inoculó a las 48h y se añadieron nutrientes adicionales para comprobar si la inhibición se produce por una falta de un nutriente esencial. El estudio de la fermentaciones se realizó con un análisis de la cinética de la fermentación, mediante la densidad del mosto, un estudio de la evolución de las poblaciones, mediante la densidad óptica, el crecimiento en placa con medio diferencial, y un análisis de la variación de aminoácidos y compuestos orgánicos del mosto, mediante el uso de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Con estos resultados se observó que la falta de YAN en el mosto a las 144h es un factor importante en las paradas de las fermentaciones, pero que la suplementación de nutrientes no es suficiente para que la segunda inoculación finalice la fermentación, excepto en *TdB ; Lt2* dónde se consigue finalizar la fermentación a los 19 días, por tanto, el efecto inhibitorio es mayor por parte de *Lt2* y *Ltk* sobre *TdB*. En conclusión, estos resultados demuestran que existe un efecto inhibitorio entre distintas cepas de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* y se debe seguir en esta línea de investigación para averiguar cuál es el motivo de esta inhibición, dado que no parece un problema únicamente de la falta de nutrientes.

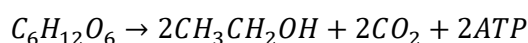
Palabras clave: Fermentación, Levaduras, *No-Saccharomyces*, *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, inhibición

2. Introducción

2.1 La fermentación alcohólica

La fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica catalizadas por enzimas. Los microorganismos han sido utilizados durante siglos para modificar los alimentos, y tanto estos como las bebidas fermentadas constituyen un sector primario y extremadamente importante de la industria alimentaria (Ward, 1989). La fermentación alcohólica es un proceso realizado por levaduras, algunos tipos de bacterias o algunos otros microorganismos para convertir los azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono. Esta comienza con la transformación de los azúcares por las levaduras para formar dos moléculas de piruvato, lo que también se conoce como glucólisis, y luego estas se transforman en dos moléculas de etanol y CO₂.

En condiciones anaeróbicas, el piruvato se transforma en una molécula intermedia llamada acetaldehído, que además libera dióxido de carbono, y el acetaldehído se convierte en etanol. En la fermentación alcohólica, el aceptor de electrones NAD⁺ se reduce para formar NADH. El intercambio de electrones que ocurre en el proceso favorece a la producción de ATP (Ribéreau-Gayon et al., 2006). La reacción global es la siguiente (Ward, 1989):



Un detalle común importante en la producción de todas estas bebidas alcohólicas es el empleo de levaduras para convertir los azúcares en etanol. Aproximadamente el 96% de la fermentación del etanol se lleva a cabo por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras se utilizan para la producción de alimentos como el vino, la cerveza y el pan (Ingraham & Ingraham, 1998; Ward, 1989).

2.2 El vino y su interés industrial

Los orígenes de la enología deben ser tan antiguos como la viticultura y casi tan remotos como la propia cultura. El vino es un producto natural resultante de una serie de reacciones bioquímicas, que comienzan durante la maduración de la uva y continúan durante la vendimia, durante la fermentación alcohólica, clarificación y posterior al embotellado (Romano et al., 2003).

El sector vinícola es uno de los más importantes en la agricultura española, por el impacto económico y social en nuestro país. España tenía una superficie de viñedos de 966 mha, la más grande del mundo, una producción de vino que representa el 12,9% de la producción mundial, y exporta unos 21,3 Mill. hl con un valor de 2,7 Mill de euros (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2019).

El comercio internacional de vino ha ido aumentando desde el 2000 (Figura 1).

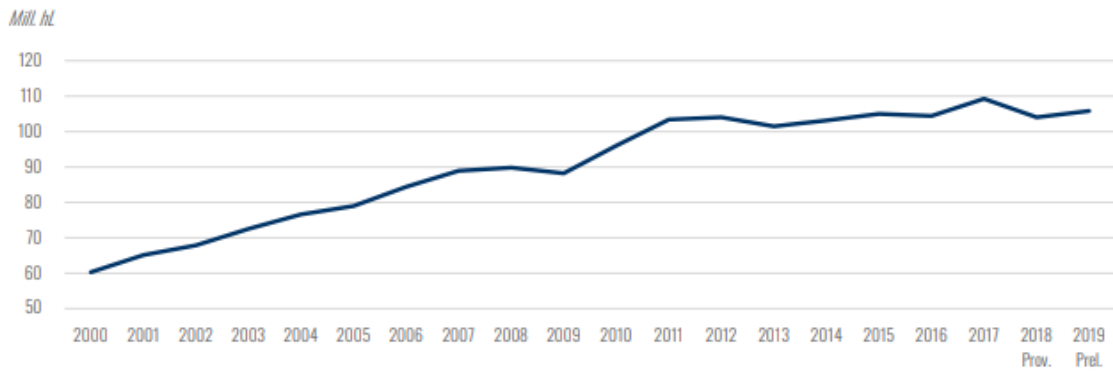


Figura 1: Evolución del comercio internacional del vino por Mill hL (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2019)

El vino destaca por su diversidad sensorial y matices. Son estas gamas las que dan al vino un valor comercial. Un vino tiene que seducir de manera inmediata y a largo plazo para no aburrir y para ello la complejidad sensorial es crucial (Tempère et al., 2018). Por esta razón, la frescura del vino es un concepto esencial para entender esta complejidad. Las propiedades organolépticas en la frescura del vino comprenden desde aromas afrutados, una mayor acidez o una menor graduación alcohólica puesto que las altas concentraciones de etanol reducen las propiedades sensoriales del vino. Actualmente es difícil obtener vinos con diferentes propiedades organolépticas en los procesos tradicionales de elaboración del vino. Por ello, las bodegas innovan para producir diferentes vinos para el gusto de los consumidores. Uno de los enfoques de estudio, es la selección de cepas *No-Saccharomyces* para obtener los parámetros apropiados en un vino con mayor complejidad organoléptica (Contreras et al., 2015; Morata et al., 2020; Tempère et al., 2018).

2.3 Ecología de la fermentación

Las levaduras se encuentran en la mayoría de las frutas, de las flores y en los exudados de las plantas (Ingraham & Ingraham, 1998). En la superficie de la uva hay una microbiota muy variada y encontramos géneros como *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*. En el mosto de uva inicial se encuentra poca proporción de *S. cerevisiae*, pero una gran proporción de levaduras conocidas como *No-Saccharomyces*. Una pequeña parte de esta microbiota es capaz de participar en la fermentación alcohólica, por tanto, la fermentación espontánea del vino no es sólo “de una especie”, sino que es un proceso complejo y secuencial que van realizando diferentes géneros de microorganismos. Las primeras etapas de la fermentación están dominadas por levaduras *No-Saccharomyces*, de poco poder fermentativo y con sensibilidad al etanol, por lo que su crecimiento se limita en los primeros días de fermentación, cuando el etanol aumenta. En estas condiciones *S. cerevisiae*, más tolerante al etanol y competitiva, supera en crecimiento al resto de levaduras, siendo esta última la que se encuentra en el mosto en las etapas finales de la fermentación.

Tradicionalmente, el proceso de elaboración del vino se realizaba mediante la fermentación espontánea secuencial de esta microbiota presente en la uva, pero a pesar de obtenerse unas propiedades organolépticas únicas procedentes de la variedad de la microbiota, a menudo la fermentación espontánea sufría de paradas o defectos debido a la producción de metabolitos no deseados.

Por tanto, debido al poco control de la fermentación espontánea se desarrolló la tecnología del cultivo starter en la industria vinícola y con ello, se obtuvieron fermentaciones más controladas y reproducibles. De esta manera se puede obtener un sabor equilibrado del vino, pero también se puede producir pérdidas de las propiedades organolépticas. Por ello, una opción beneficiosa es la selección de cultivos starter en base a las características que le aportan al vino. Esta tecnología consiste en aislar cultivos puros de la levadura de interés e inocularla en una cantidad adecuada para eliminar o minimizar la influencia del resto de levaduras. (Capozzi et al., 2015; Fleet, 2008; Jolly et al., 2014; Parapouli et al., 2020; Romano et al., 2003; Roudil et al., 2020).

2.4 Paradas en la fermentación del vino

Las paradas en la fermentación es uno de los problemas más importantes a lo que se enfrenta la industria enológica. Existen diversos factores que influyen en la inhibición de la fermentación afectando a la cinética de fermentación, a la producción de biomasa y a la tasa de viabilidad de las levaduras.

La presencia de oxígeno en el mosto es un factor del que depende el metabolismo de la levadura para realizar la fermentación. Una deficiencia de oxígeno durante la fermentación resulta en una inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides en la levadura y, en consecuencia, una disminución en la producción de biomasa y la tasa de glucólisis (Alexandre & Charpentier, 1998; Blateyron & Sablayrolles, 2001).

Otro problema relacionado con la parada de la fermentación en el vino es la baja concentración de nitrógeno en el mosto de uva. El nitrógeno es un nutriente esencial para el desarrollo de la fermentación alcohólica en levaduras, afectando al crecimiento de la levadura y a su metabolismo. El mosto de uva es la fuente principal de nitrógeno de las levaduras. El nitrógeno está presente en formas variables y químicamente complejas y, además, los aminoácidos primarios y el ion amonio, denominados YAN (Nitrógeno asimilable por levadura) son metabolizados por las levaduras. Algunos mostos de uva presentan concentraciones bajas de nitrógeno que se asocia a retrasos o paradas en la fermentación (Bell & Henschke, 2005; Vilanova et al., 2007). Además del nitrógeno, la deficiencia de minerales como el magnesio, o de vitaminas como la tiamina con importantes funciones metabólicas y fisiológicas de la levadura pueden conducir a retrasos en la fermentación (Alexandre & Charpentier, 1998; Labuschagne & Divol, 2021; Walker, 1994).

Por otro lado, la producción o presencia de sustancias inhibitoras son otro factor influyente en las paradas de la fermentación. El etanol inhibe el crecimiento y la viabilidad de las levaduras, por lo que la acumulación de altas concentraciones de etanol en etapas finales de la fermentación puede producir retrasos en la fermentación y defectos en el vino. Otra posible causa de los retrasos en la fermentación es la adicción de sulfitos al vino. El sulfito se añade en varias etapas durante la elaboración del vino, pero principalmente al mosto antes de la fermentación alcohólica para controlar el crecimiento de especies no deseadas. El sulfito es altamente tóxico para los microorganismos, por lo que las dosis de adición de sulfitos deben de estar controladas y personalizadas dependiendo de la especie con la que se trabaje ya que la resistencia a los sulfitos varía entre especies (Alexandre & Charpentier, 1998).

Por tanto, todos estos factores que influyen en la inhibición de la fermentación están relacionados con efectos como la disminución del pH, la inhibición de actividades enzimáticas claves y que al final se traducen en una disminución en el metabolismo de la célula y, en consecuencia, afectan a la cinética de fermentación, a la producción de biomasa y a la tasa de viabilidad de las levaduras.

2.5 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es un hongo unicelular, del grupo de los ascomicetos. Posee un ADN genómico nuclear de 12068 kilobases (kb) organizado en 16 cromosomas. Desde que la inoculación se ha convertido en una práctica habitual, se ha utilizado *S. cerevisiae* como cultivo starter principal, esto es debido a que *S. cerevisiae* es de las pocas especies que es capaz de consumir todos los azúcares y completar la fermentación alcohólica. Actualmente se está empezando a usar *S. cerevisiae* en cultivos mixtos o secuenciales junto con especies *No-Saccharomyces* que pueden aportar características diferentes en los vinos, aumentando su complejidad.

Las fermentaciones con cultivos mixtos consisten en la inoculación desde el inicio de la fermentación de las cepas seleccionadas, por ejemplo, en Hu et al. (2019) se realizó una fermentación mixta con *Hanseniaspora uvarum* y *S. cerevisiae* para observar si se producía una mejora en la formación de ésteres en el vino con la adición de nutrientes. Por otro lado, los cultivos secuenciales consisten en la inoculación al inicio de la fermentación de unas cepas *No-Saccharomyces*, y posteriormente a las 24 o 48h se inocula la cepa *S. cerevisiae*, por ejemplo, en Mas et al. (2015) para reproducir las condiciones microbiológicas de las uvas de la zona del Priorat (Cataluña) se realizó una fermentación secuencial, en el inicio de la fermentación se inocularon cuatro cepas de especies *No-Saccharomyces* en diferentes proporciones (*H. uvarum* (60%), *C. zemplinina* (30%), *T. delbrueckii* (5%) y *M. pulcherrima* (5%) y pasadas 24h, se inocularon 3 cepas de *S. cerevisiae* (33% de cada una).

Como ya se ha comentado anteriormente, *S. cerevisiae* destaca por su capacidad de imponerse en la fermentación antes que otras levaduras más abundantes en el mosto de uva debido a su

capacidad de resistencia a condiciones adversas de pH bajo, osmoralidad alta, y su tolerancia a altas concentraciones de etanol. *S. cerevisiae* también es capaz de producir alcoholes superiores, ésteres y aldehídos. (Parapouli et al., 2020; Roudil et al., 2020)

2.6 *No-Saccharomyces*

Las levaduras *No-Saccharomyces* están formadas por ascomicetos o basidiomicetos. Las taxonomías actuales reconocen 149 géneros de levadura que comprenden casi 1500 especies (Kurtzman et al., 2011). De estas, más de 40 especies se han aislado del mosto de uva (Tabla 1).

Tabla 1: Levaduras *No-Saccharomyces* reportados en uvas y fermentaciones de vino, tabla realizada a partir de Kurtzman et al., (2011).

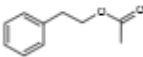
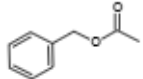
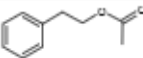
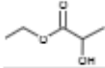
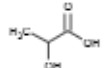
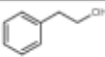
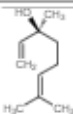
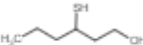
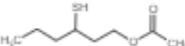
<i>Citeromyces matritensis</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Debaryomyces hanseii</i>	<i>Pichia kluyveri</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Pichia occidentalis</i>
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	<i>Pichia terrícola</i>
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Starmerella bombicola</i>
<i>Hanseniaspora vineae</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>Lachancea kluyveri</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
<i>Lachansea thermotolerans</i>	<i>Zygoascus meyeri</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Milleromyces farinosa</i>	

La producción de metabolitos no deseados y la acidez volátil acompañada de paradas en la fermentación se ha relacionado comúnmente con las levaduras *No-Saccharomyces*. Todo esto, junto a la certeza de que eran pobres fermentadores de mosto de uva y que presentaban baja tolerancia al alcohol supusieron el rechazo de las levaduras *No-Saccharomyces* durante mucho tiempo en la industria vinícola (Jolly et al., 2014). Sin embargo, los estudios recientes dan otra perspectiva para el destino de las levaduras *No-Saccharomyces*. Se ha demostrado que las levaduras *No-Saccharomyces* son capaces de obtener unas características organolépticas únicas y de gran calidad, además de producir vinos con una menor graduación alcohólica que satisfaga la creciente demanda de este tipo de vinos.

Entre las características organolépticas que se pueden obtener de la fermentación con *No-Saccharomyces* es la formación de ésteres y alcoholes superiores que dotan al vino de aromas afrutados y florales. *Hanseniaspora vineae* es capaz de sintetizar *de novo* alcohol bencílico, benzaldehído, p-hidroxibenzaldehído y alcohol p-hidroxibencílico, con niveles del primero que

fueron 20-200 veces mayores de los fermentados por *S. cerevisiae* (Martin et al., 2016), mientras que *Pichia kluyveri* es capaz de aumentar la producción de tioles volátiles si se co-inocula junto a *S. cerevisiae* (Anfang et al., 2009). En Rodriguez et al. (2007) se observó que las cepas *Candida guilliermondii* y *Candida pulcherrima* presentaban actividades enzimáticas activas a las concentraciones de pH, glucosa, etanol y SO₂ típicas en la elaboración de vinos y eran capaces de liberar monoterpenos y alcoholes a partir de extractos de glucósidos de jugo de uva. Además, estas cepas de levadura no produjeron acidez volátil ni sabor desagradable.

Tabla 2: Levaduras No-Saccharomyces con interés enológico y sus metabolitos más importantes (Morata et al., 2020)

Non-Saccharomyces Species	Metabolite/ Biopolymer	Structure	Sensory Repercussion
<i>Hanseniaspora/Kloeckera</i>	2-Phenylethyl acetate		Floral, rose petals hints
	Mannans		Cell wall polysaccharides, mannoproteins
<i>Hanseniaspora vineae</i>	Benzyl acetate		Floral jasmine aroma
<i>Lachancea thermotolerans</i>	2-Phenylethyl acetate		Floral, rose petals hints
	Ethyl lactate		Strawberry, toffee
	Lactic acid		Citric acidity
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	2-Phenylethanol		Rose-like odour
	Monoterpens (e.g., linalool)		Floral
<i>Pichia kluyveri</i>	Mercaptohexanol (3-MH)		Grapefruit, passion fruit
	Mercaptohexyl acetate (3-MHA)		Grapefruit, passion fruit

Non-Saccharomyces Species	Metabolite/Biopolymer	Structure	Sensory Repercussion
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Pyruvate		Stable pigments, colour stability Precursor for vitisin A type compounds:
	Cell wall polysaccharides, mannoproteins		Better wine structure, softening of the astringency
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	2-Phenylethyl acetate		Flower, honey
	Ethyl hexanoate		Apple
	3-Ethoxy-1-propanol		Black currant, solvent
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2-phenylethyl acetate		Flower, honey
	Isoamyl acetate		Banana
	Ethyl acetate		Fruity at low concentration

Por otro lado, las levaduras *No-Saccharomyces* son capaces de formar pigmentos estables, como se apreció en el uso de *Schizosaccharomyces pombe* en fermentaciones secuenciales aumentando la estabilidad de la materia colorante al favorecer la formación de vitisinas y piranoantocianinas vinilfenólicas (Loira et al., 2015). Asimismo, se ha comprobado que las levaduras *No-Saccharomyces* en fermentaciones secuenciales junto a *S. cerevisiae* son capaces de producir vinos con una baja concentración de etanol, que son de gran interés en la industria enológica porque con el cambio climático, los mostos presentan altas cantidades de azúcar, y, por tanto, vinos con mayor grado de alcohol.(Contreras et al., 2014).

Pero de todas las levaduras *No-Saccharomyces*, las que presentan un mayor interés industrial son las especies de *Torulaspora delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans*.

2.7 *Torulaspora delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans*

Entre las levaduras *No-Saccharomyces*, la más estudiada, comercializada y utilizada a nivel industrial es *T. delbrueckii*. Es una levadura que presenta células esféricas elipsoidales que son ligeramente más pequeñas que las de *S. cerevisiae* con dimensiones de aproximadamente 2–4 × 3–5 μm. Pueden reproducirse asexualmente por división celular en brotes multilaterales y de forma sexual a través de sacos que contienen de una a cuatro ascosporas esféricas (Benito, 2018a).

T. delbrueckii ha destacado por la producción de menores cantidades de acetaldehído y ácido acético (Belda et al., 2017; Bely et al., 2008; Benito, 2018a), uno de los principales parámetros de calidad del vino; el aumento de la producción de glicerol (Belda et al., 2015); un bajo perfil fermentativo con bajos niveles de producción de etanol, alcoholes superiores, ácidos grasos volátiles y acidez volátil; y su notable contribución al perfil aromático del vino (Belda et al., 2015, 2017; Bely et al., 2008; Contreras et al., 2014; Loira et al., 2015; Mecca et al., 2020; Morata et al., 2020; Puertas et al., 2017; Renault et al., 2015).

Por otro lado, *L. thermotolerans* es una levadura unicelular que presenta una forma esférica y elipsoidal y son ligeramente más pequeñas que la de *S. cerevisiae*, con dimensiones de aproximadamente 3-6 x 6-8 µm. Esta levadura se reproduce asexual y sexualmente de igual modo que *T. delbrueckii* (Benito, 2018b; Morata et al., 2018).

El interés industrial de *L. thermotolerans* reside en su influencia en el pH del mosto de uva, debido a la producción de ácido láctico, siendo capaz de producir hasta 16 g/L (Morata et al., 2020). Por ello, *L. thermotolerans* es utilizada para acidificar el mosto de regiones cálidas en donde los efectos del cambio climático han afectado en un aumento del contenido de azúcar y una disminución de la acidez en el mosto de uva (Benito, 2018b; Vaquero et al., 2020).

2.8 Problemática

En estudios anteriores de la URV se ha demostrado que *T. delbrueckii* inhibe el crecimiento de *S. cerevisiae*. Para comprobar si la inhibición era específica entre estas dos especies se realizaron fermentaciones con inoculación secuencial sin contacto en mosto sintético a pH= 3,3 y a 16°C con otra especie *No-Saccharomyces*, una cepa de *L. thermotolerans* denominada *Lt2*. Este experimento consistía en inocular en primer lugar *Lt2* y al cabo de 48h eliminarla e inocular *ScR*. Se comprobó que pasadas las 48h y tras haber inoculado *ScR*, se producía una ralentización de la fermentación y una inhibición del crecimiento de *ScR*, por lo que *L. thermotolerans* también afectaba al desarrollo de la fermentación de *ScR*, y descartaba que la inhibición la produjera únicamente *T. delbrueckii* (Figura 2).

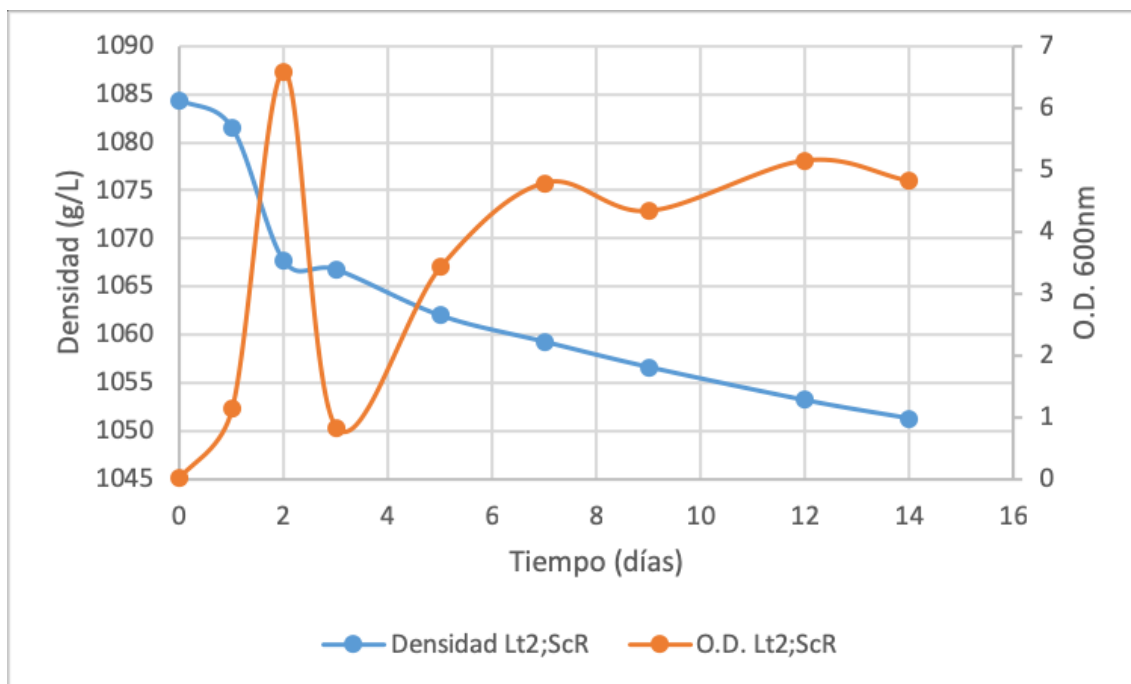


Figura 2: Evolución de la densidad y la O.D a 600 nm de las fermentaciones mixtas con la inoculación secuencial sin contacto de una cepa de *L. thermotolerans* y de *S. cerevisiae* (Lt2 ; ScR).

Para comprobar si las cepas de *No-Saccharomyces* también se inhibían entre ellas o sólo era un efecto sobre *S. cerevisiae*, se realizaron fermentaciones secuenciales con y sin contacto célula-célula entre la cepa de *T. delbrueckii* (Td5) y Lt2. Las fermentaciones secuenciales se llevaron a cabo en mosto sintético a pH=3,3 y a 16°C, y la segunda cepa se inoculó a las 48h. Se observó que tanto la cepa de *T. delbrueckii* como la cepa de *L. thermotolerans* eran capaces de inhibirse entre ellas durante la fermentación. Sin embargo, el efecto inhibitorio de Td5 sobre Lt2 era mayor que el de Lt2 sobre Td5 en fermentaciones sin contacto célula-célula (Figuras 3 y 4).

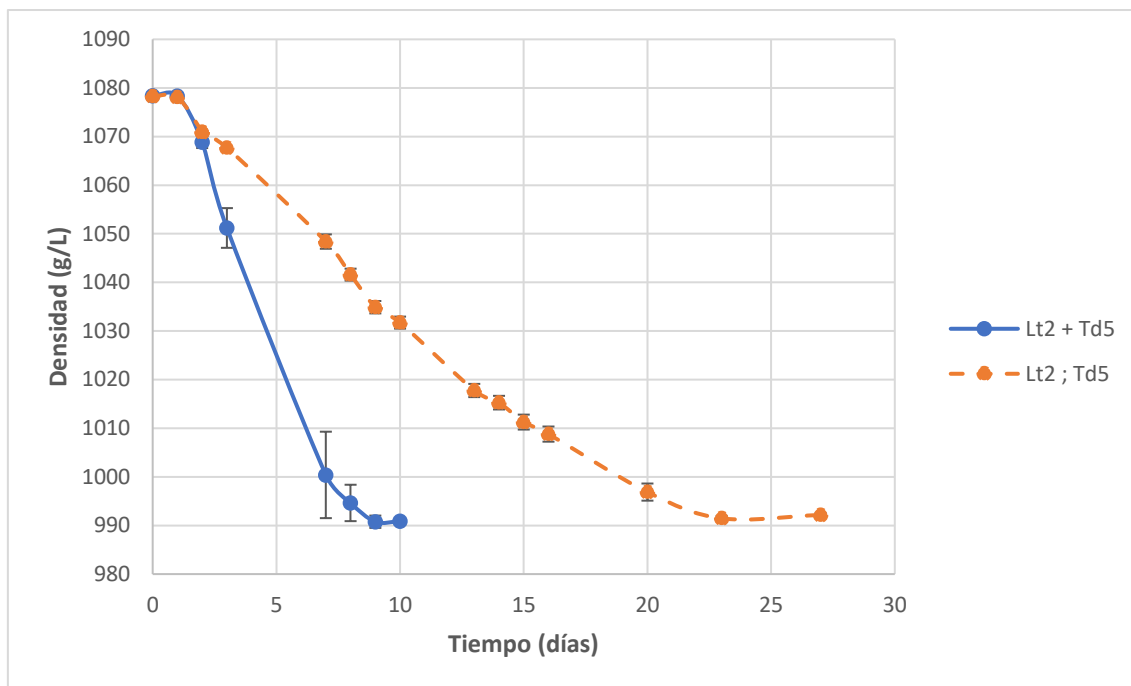


Figura 3: Evolución de las densidades de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial empezando con la cepa de *L.thermotolerans*, con (*Lt2* + *Td5*) y sin (*Lt2* ; *Td5*) contacto célula-célula.

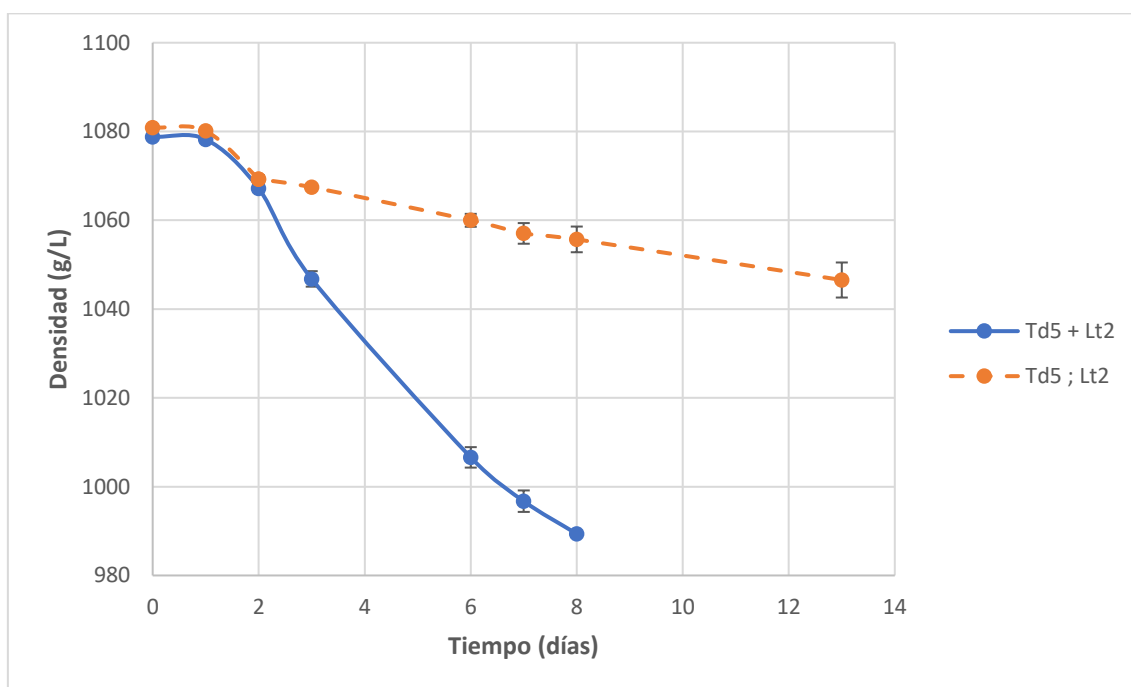


Figura 4: Evolución de las densidades de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial empezando con la cepa de *L.thermotolerans*, con (*Td5* + *Lt2*) y sin (*Td5* ; *Lt2*) contacto célula-célula.

Tras estas conclusiones, la hipótesis del grupo de investigación fue que esta inhibición se puede dar debido a la falta de un nutriente esencial o la síntesis por parte de *Td5* de alguna molécula que inhiba la fermentación de *Lt2*. Por ello, se llevó a cabo un experimento mediante fermentaciones con inoculación secuencial sin contacto de *Td5* y *Lt2*, adicionando Fosfato Diamónico (DAP) al inocular la segunda cepa. El DAP es un producto inorgánico que complementa a los mostos con

amonio, que es la forma de nitrógeno más fácilmente asimilable por las levaduras, ayudando a activar la fermentación alcohólica mediante la multiplicación celular e incrementando la concentración de levaduras/mL. Se observó que la adición de DAP no afecta a la mejora de la cinética de fermentación de *Td5* ni de *Lt2*, por lo que se descarta que la segunda cepa inoculada no fermente debido a la falta de nitrógeno en el mosto.

3. Hipótesis

La hipótesis planteada en este trabajo es que la inhibición entre cepas *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* se debe a una falta de algún nutriente esencial, o, a la síntesis por parte de *T. delbrueckii* de alguna molécula que inhiba la fermentación de *L. thermotolerans*.

4. Objetivo

El objetivo de este trabajo es determinar si la inhibición entre *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* se da a nivel de especie o es específica entre estas cepas.

Para ello, se realizarán fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto en mosto sintético con diferentes cepas de *L. thermotolerans* (*Lt2* y *Lt Laktia*) y *T. delbrueckii* (*Td5* y *Td Biodiva*). El estudio de la fermentaciones se realizará con un análisis de la cinética de la fermentación, mediante la densidad del mosto, un análisis de la evolución de las poblaciones, mediante la densidad óptica, el crecimiento en placa con medio diferencial, y un estudio de la composición nitrogenada del mosto y su evolución a lo largo de la fermentación, así como un análisis de compuestos de orgánicos en el vino final, mediante el uso de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

5. Metodología

5.1 Cepas utilizadas

Para realizar este trabajo, se han utilizado dos cepas de las especies *L. thermotolerans* (*Lt2*, *Lt Laktia*) y *T. delbrueckii* (*Td5*, *Td Biodiva*), y la cepa *QA23* de *S. cerevisiae* como control. Las cepas *Td5* y *Lt2* han sido proporcionadas por Agrovin S.A (España) y las cepas *Laktia*, *Biodiva* y *QA23* han sido proporcionadas por Lallemand S.L.

Las cepas se conservaban en medio líquido YPD (2% (p/v) de glucosa, 2% (p/v) de bacto peptona y 1% (p/v) de extracto de levadura; Cultimed, Barcelona, España) con 40% (v / v) glicerol, a -80 ° C. Antes de su uso, se siembra por agotamiento en placas de agar YPD (YPD líquido con agar al 2% (p/v)). Estas placas se utilizaron como cultivo madre de los precultivos, con el fin de inocular las fermentaciones. Para la preparación de precultivos, se aislaron colonias de los cultivos madres, y se hicieron crecer en 20mL de YPD líquido a 28 ° C y a 120rpm en un agitador orbital

durante 24h. Para saber la concentración celular en los precultivos, se realizó un recuento al microscopio con cámara de Neubauer, y se calculó el volumen necesario para inocular $2 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$.

5.2 Fermentaciones

Para la realización de las fermentaciones, se utilizó mosto sintético a una concentración inicial de azúcar a 200 g/L como se describe en Beltran et al (2004) (Anexo1). Se realizaron dos tipos de fermentaciones: Fermentaciones con inóculo puro y Fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto.

5.2.1 Fermentaciones con inóculo puro

Se realizó para observar la capacidad fermentativa de cada una de las cepas de forma individual, *Ltk*, *Lt2*, *TdB* y *Td5*.

Se preparó mosto sintético en una botella de 2L y se inoculó con el precultivo de la cepa pura, a una concentración de $2 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$. A continuación, se repartieron 220 mL de mosto en cada fermentador de 250 mL. Los fermentadores se incubaron a 16°C y a 120 rpm de agitación (Figura 5). Se tomaron muestras cada 24h durante los 3 primeros días y cada 48h a partir del tercer día. Los análisis consistían en un estudio de la cinética de fermentación y de la evolución de las poblaciones. Las fermentaciones se dieron por finalizadas cuando la concentración de azúcares era inferior a 2 g/L o cuando la medida de la densidad no variaba durante más de 48h.

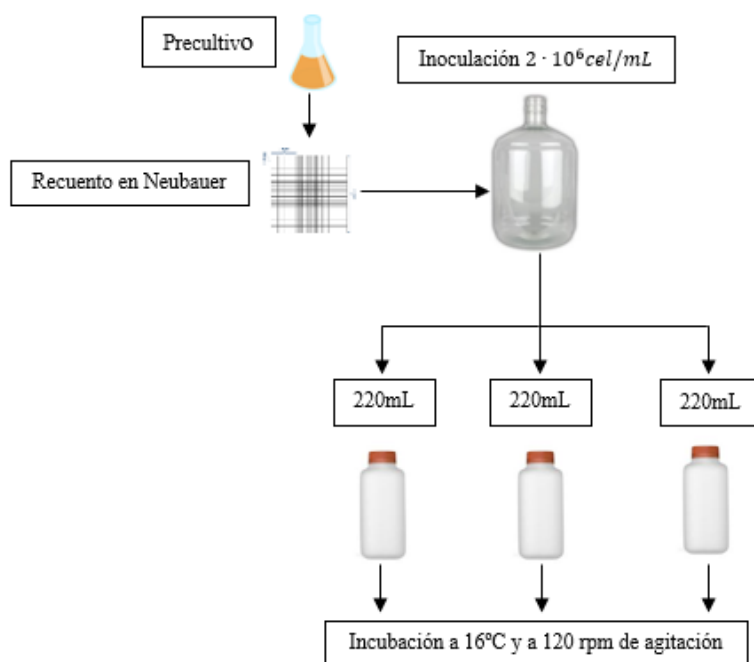


Figura 5: Esquema de la metodología utilizada para la preparación de una Fermentación con inóculo puro.

5.2.2 Fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto

Se realizó para comprobar si el hecho de que la primera cepa hubiera fermentado el mosto durante 48 horas afectaba negativamente a la fermentación de la segunda.

Se preparó mosto sintético en una botella de 2L y se inoculó con el precultivo de la primera cepa, a una concentración de $2 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$. A continuación, se repartió 220 mL en cada fermentador de 250 mL. Los fermentadores se incubaron a 16°C y a 120 rpm de agitación. Se tomaron muestras cada 24h durante los 2 primeros días. Al segundo día, si las densidades del mosto habían disminuido entre 10 y 15 g/L, se centrifugaba a 7800 rpm durante 10 minutos. Una vez centrifugado, el sobrenadante se filtró en condiciones de esterilidad, mediante un equipo de filtración de membrana al vacío, utilizando filtros S-Pack de poro de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore; GSWG047S). La centrifugación y el filtrado permitieron eliminar la primera cepa. Se repartieron 220 mL del sobrenadante filtrado en cada fermentador de 250 mL y se inocularon con el precultivo de la segunda cepa, a una concentración de $2 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$ en cada fermentador. Seguidamente, se volvieron a incubar a 16°C y a 120 rpm de agitación (Figura 6). Se tomaron muestras cada 48h. Las fermentaciones se dieron por finalizadas cuando la concentración de azúcares era inferior a 2 g/L, o cuando la medida de la densidad no variaba durante más de 48h.

Utilizando esta metodología se realizaron las fermentaciones de *Ltk* ; *TdB*, *TdB* ; *LtK*, *Td5* ; *Ltk*, *LtK* ; *Td5*, *Lt2* ; *TdB*, *TdB* ; *Lt2*.

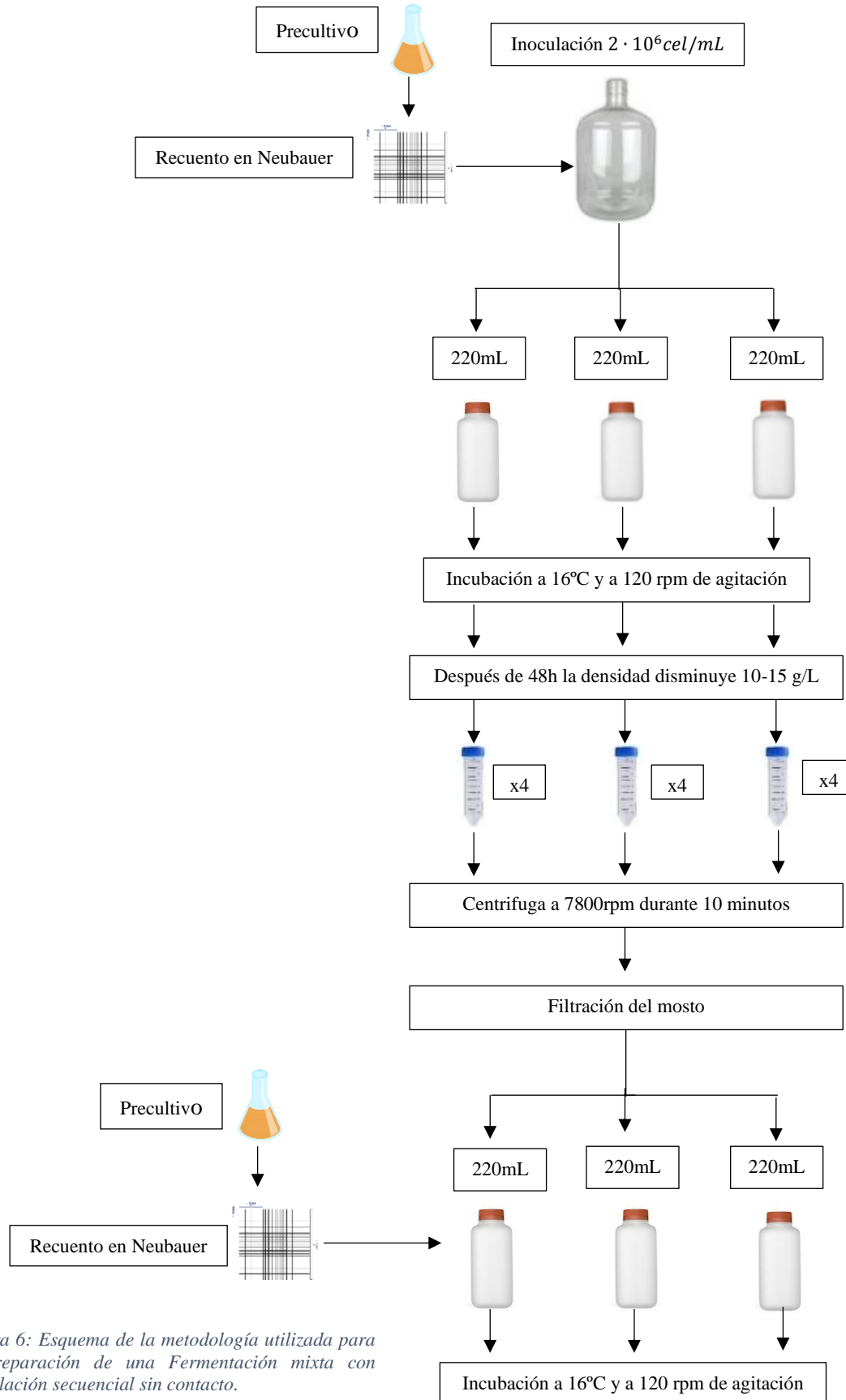


Figura 6: Esquema de la metodología utilizada para la preparación de una Fermentación mixta con inoculación secuencial sin contacto.

5.2.3 Fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto y adición de nutrientes

Se realizó para comprobar si los problemas de fermentación de la segunda cepa eran debido a que el medio quedaba empobrecido tras los dos días de fermentación de la primera cepa.

Se sigue la misma metodología anterior (Figura 6), sin embargo, antes de la inoculación de la segunda cepa se realizó la adición de nutrientes. La concentración de nutrientes añadida fue la misma que había en el mosto inicial: 0,024 g/L de Vitaminas, 1,46 g/L de Aminoácidos, 0,15 g/L de Factores de anaerobiosis y 0,012 g/L de Oligoelementos, para cada fermentador de 210 mL (Anexo 1; Tabla 5 y 6). Se dejó un fermentador como control negativo, es decir, sin adición de nutrientes. A continuación, se inoculó con el precultivo de la segunda cepa en la botella, a una concentración de $2 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$ en cada fermentador y se volvió a incubar a 16°C y a 120 rpm de agitación. Se tomaron muestras cada 48h. Las fermentaciones se dieron por finalizadas cuando la concentración de azúcares era inferior a 2 g/L o cuando la medida de la densidad no variaba durante más de 48h.

Se utilizó esta metodología para las fermentaciones *TdB ; Ltk (+)*, *TdB ; Lt2 (+)*, *Ltk ; TdB (+)*, *Lt2 ; TdB (+)*.

5.3 Análisis microbiológicos

Se utilizaron diferentes técnicas microbiológicas y bioquímicas para el análisis de las fermentaciones del mosto con el fin de determinar la cinética y evolución de poblaciones de levaduras.

5.3.1 Toma de muestra

Se realiza la toma de muestras cada 24h para hacer un seguimiento de la fermentación y el comportamiento de las levaduras, y a partir del tercer día se procede a la toma de muestras cada 48h. Se extraen 5 mL de cada fermentador en la cabina de flujo laminar. De estos 5 mL, 100 µL se utilizaron para realizar diluciones y sembrar en placa con medio diferencial WLN, otros 100 µL se utiliza para medir la Densidad Óptica, y el resto se centrifuga a 7800 rpm durante 5 min. Del sobrenadante del centrifugado, 1 mL se guarda a -20°C en el congelador para análisis bioquímicos en HPLC, y con el resto se mide la densidad con un densímetro electrónico (Figura 7).

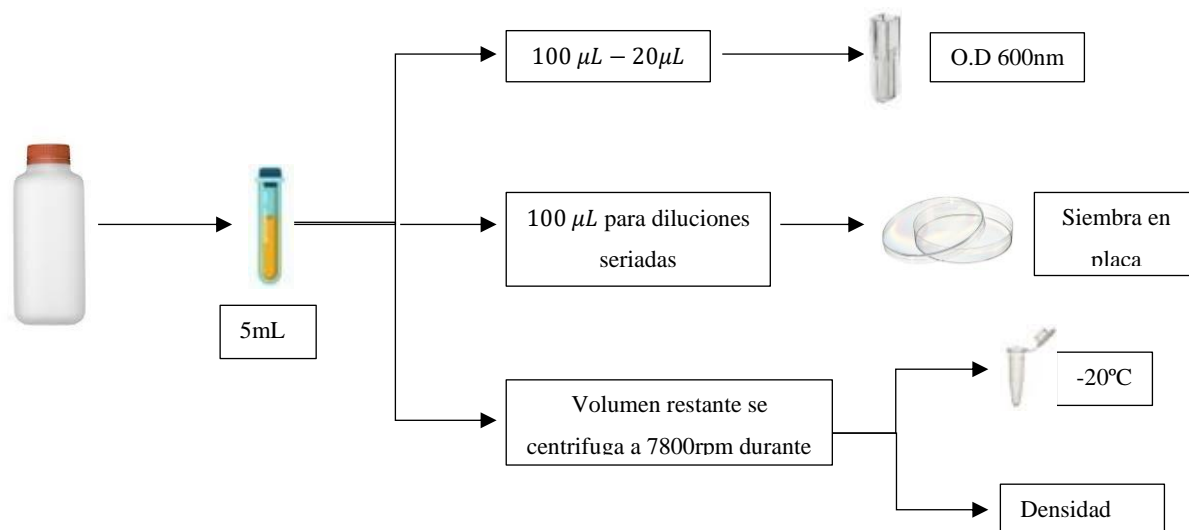


Figura 7: Esquema de la toma de muestra y su análisis posterior.

5.3.2 Cinética de la fermentación

Durante la fermentación las levaduras consumen los azúcares del mosto sintético y lo convierten en alcohol etílico y dióxido de carbono. La densidad se utiliza como parámetro para saber si las levaduras están consumiendo los azúcares, por tanto, si la densidad no baja, significa que la fermentación se ha parado. En el mosto sintético que se utilizó en el trabajo, la densidad inicial oscilaba entre 1080 g/L y 1085 g/L y se consideraba que la fermentación había terminado cuando la densidad estaba por debajo 995 g/L.

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

5.3.3 Evolución poblacional

5.3.3.1 Población total por medida de la densidad óptica

La Densidad Óptica se utiliza como parámetro para saber la absorbancia que tiene el mosto. La absorbancia del mosto es la medida que refleja cómo se atenúa la radiación cuando atraviesa el mosto. Esto quiere decir que cuanto menos luz atraviesa el cultivo, más cantidad de levadura habrá en el mosto. Por tanto, la Densidad Óptica nos permite tener una aproximación de la población total de levaduras que hay en el mosto. A mayor Densidad Óptica, mayor cantidad de levaduras.

La Densidad Óptica se midió a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro Thermospectronic Genesys 10 UV, (Pracisa +Giralt, Madrid, España).

5.3.3.2 Población viable

Para determinar la cantidad de levaduras viables que hay en el mosto se realiza una siembra en placa. Se utilizó el medio de cultivo diferencial Difco W1 Nutrient Broth (BD, ref: 247110) (WLN) que nos permite cuantificar las levaduras viables que hay en el mosto, y, además, diferencia morfológicamente las tres especies de levaduras con las que se trabajó (Anexo 2). El medio WLN dota a *SC* de una morfología circular de color blanco, a *Td5* y *TdB*, de una morfología circular y un color verde claro, mientras que *Ltk* y *Lt2*, presentan una morfología circular de color verde oscuro.

Para la siembra en placa se trabajó en condiciones de esterilidad. En primer lugar, se realizaron diluciones seriadas de la muestra. Se inoculó 100 uL de las últimas diluciones en las placas con medio WLN. La muestra se esparció por la placa mediante la agitación con bolas de vidrio estériles. Posteriormente se retiran las bolas de cristal y se dejan las placas en la estufa a 28°C durante 48h. Pasadas las 48h se realiza el recuento de colonias.

5.3.4 Análisis de compuestos de interés enológico

5.3.4.1 Azúcares reductores

Para confirmar que la fermentación había finalizado se midieron los azúcares reductores (Glucosa y Fructosa). Para cuantificar los azúcares reductores se utilizó un kit de BioSystems (Biosystems S.A, ref: 12800).

Cuando la fermentación llega a una densidad de 993 g/L, se toman muestras y se analizan en un multianalizador automático: Miura One, (TDI S.L, Gava, España). Si el resultado del análisis era una concentración de azúcares reductores de ≤ 2 g/L se podía considerar finalizada la fermentación.

5.3.4.2 Determinación de los metabolitos orgánicos en el vino final

Se utilizó el HPLC para determinar el contenido de metabolitos orgánicos (azúcares, ácidos y alcoholes) del vino final durante las fermentaciones con inóculo puro.

Para el análisis de la concentración de metabolitos orgánicos se analizó siguiendo el protocolo descrito por Quirós et al. (2010) utilizando un equipo Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies) equipado con una columna Hi-Plex H, 300 mm x 7,7 mm dentro de un 1260 MCT (termostato multicolumna Infinity II) conectado tanto a un MWC como a un RID (detector de longitud de onda múltiple G1365B y 1260 Infinity II detector de índice de refracción) (Agilent Technologies). La columna se mantuvo a 60 ° C y se utilizó H_2SO_4 5 mM como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. Previamente, las muestras se filtraron a través de filtros con tamaño de poro

de 0,22 μm (Dominique Dutscher, Brumath, Francia). Los cromatogramas se analizaron utilizando el software Agilent ChemStation Plus (Agilent Technologies).

5.3.4.3 Determinación del contenido nitrogenado

Se utilizó el HPLC para determinar el contenido de nitrógeno que las levaduras habían consumido en las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial durante las primeras 48h, tanto en la primera como en la segunda inoculación, con el fin de determinar si la primera cepa dejaba el mosto con una concentración de YAN pobre provocando retrasos y paradas en la fermentación de la segunda cepa.

Para el análisis, se descongelaba una de las muestras del sobrenadante del mosto, guardadas a -20°C , que habían sido centrifugadas a 7800rpm durante 5 minutos. El contenido de nitrógeno se analizó según el método de (Gómez-Alonso et al., 2007)El Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Alemania) se equipó con un detector ultravioleta DAD y un detector de fluorescencia (Agilent Technologies), y la separación se realizó en una columna Hypersil ODS C18 (Agilent Technologies) con un tamaño de partícula de 5 μm (250 mm \times 4,6 mm) y termostatzado a 20°C . La fase móvil (A) consistió en 2,05 g/L de acetato de sodio anhidro y 0,2 g/L de azida de sodio con agua MilliQ (Millipore Q-PODTM Advantage A10) ajustado a pH 5,8 con ácido acético glacial, y la fase móvil (B) consistió en acetonitrilo al 80% (v/v) y metanol al 20% (v/v). Los cromatogramas se analizaron utilizando el software Agilent ChemStation Plus (Agilent Technologies).

6. Resultados y discusión

6.1 Fermentaciones con inóculo puro

Se estudió la capacidad fermentativa de las cuatro cepas, las dos cepas de *L. thermotolerans* *Ltk* y *Lt2*, y las dos cepas de *T. delbrueckii* *Td5* y *TdB*, utilizando la cepa *QA23* de *S. cerevisiae* como control.

6.1.1 Cinética de la fermentación

Como se observa en la Figura 8, las levaduras *No-Saccharomyces* presentaron una menor capacidad fermentativa que *QA23*. En primera instancia, *Td5* fue la levadura *No-Saccharomyces* con mayor capacidad fermentativa, siendo capaz de acabar la fermentación en 10 días. Por otro lado, aunque inicialmente *Ltk* fermentaba más rápido que *TdB*, ambas finalizaron la fermentación a los 13 días. Curiosamente, la levadura que arrancó la fermentación más rápida fue *Lt2*, incluso más rápido que *QA23*, sin embargo, a partir de las 48h, se observó una ralentización de la fermentación, no habiendo finalizado a los 20 días.

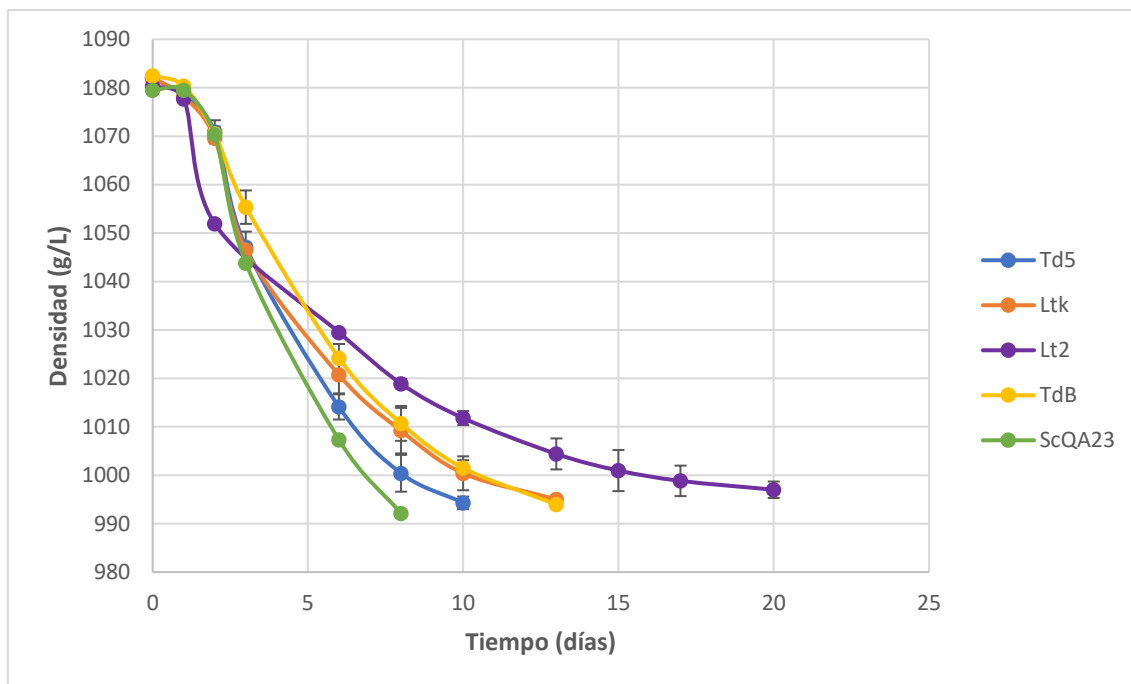


Figura 8: Evolución de la densidad de las fermentaciones de inóculo puro entre las cepas de *L. thermotolerans* (*Ltk* y *Lt2*) y las cepas de *T. delbrueckii* (*Td5* y *TdB*) junto a *QA23* como control.

6.1.2 Evolución poblacional

Se observó que la levaduras presentaron una fase exponencial durante las primeras 48h y a continuación entraron en una fase estacionaria hasta la finalización de la fermentación. Se pudo comprobar que, aunque inicialmente *Ltk* tuvo una mayor producción de biomasa que *TdB*, ambas finalizan con una biomasa similar a los 13 días, al igual que ocurrió en la cinética de fermentación de la Figura 8.

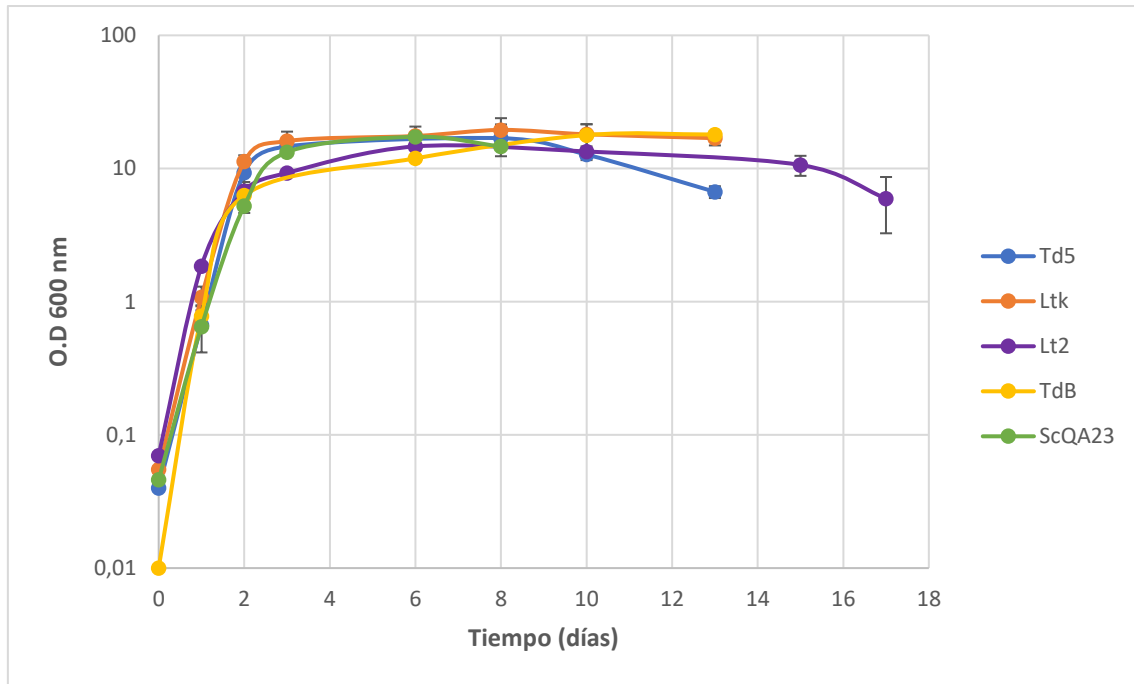


Figura 9: Variación de la O.D a 600nm de las fermentaciones de inóculo puro de las cepas de *L. thermotolerans* (Ltk y Lt2) y las cepas de *T. delbrueckii* (Td5 y TdB) junto a QA23 como control.

6.1.3 Orgánicos

Se analizaron los compuestos orgánicos más relevantes desde un punto de vista enológico en las muestras finales de las fermentaciones con inóculo puro en HPLC.

Tabla 3: Comparación de la producción de metabolitos orgánicos entre las cepas de *T. delbrueckii* (Td5 y TdB) y *L. thermotolerans* (Ltk y Lt2).

	Td5		TdB		Ltk		Lt2	
	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación
Ac cítrico	0,13	0,05	0,16	0,04	0,20	0,02	0,16	0,00
Ac tartárico	1,64	0,18	2,08	0,08	2,11	0,27	1,97	0,05
Ac málico	0,21	0,05	0,07	0,01	0,07	0,02	0,06	0,02
Ac succínico	0,52	0,08	0,54	0,18	0,17	0,03	0,33	0,10
Ac láctico	0,03	0,02	0,20	0,16	0,04	0,02	4,78	1,14
Ac acético	0,49	0,06	0,56	0,06	0,63	0,10	0,78	0,01
Glucosa	0	0	0	0	0	0	0	0
Fructosa	1,76	0,12	2,09	0,46	1,94	0,16	3,55	1,56
Glicerol	2,76	0,49	3,46	0,10	4,78	0,23	8,39	0,87
EtOH	9,78	0,44	11,21	0,38	11,19	0,45	10,85	0,21

En primer lugar, los contenidos de ácido cítrico, tartárico, succínico y acético se encuentran en niveles similares entre las 4 cepas. Se obtuvieron concentraciones de ac málico muy bajas que se deben a un error de calibración del HPLC, las concentraciones de ac málico estándares en vino están entre 2-6,5 g/L (Volschenk et al., 2017). Se observa una mayor producción de glicerol en

las cepas de *L. thermotolerans* en comparación con las cepas de *T. delbrueckii*, destaca *Lt2* entre el resto de las cepas, presentando un gran contenido de glicerol, casi duplicando la producción de *Ltk*, lo que sugiere una dependencia de la cepa de *L. thermotolerans* en la producción de glicerol (Porter et al., 2019) La producción de ácido láctico es una de las características principales de la especie *L. thermotolerans* (Benito, 2018b), y se observa una producción en *Lt2* de 4,78 g, sin embargo, resalta la producción prácticamente nula en *Ltk*, puesto que según la ficha técnica de Lallemand S.L la producción de ácido láctico de *Ltk* es de 3,3 g/L. La producción de ácido láctico varían entre 1 y 9 g/L en las cepas de *L. thermotolerans* (Vilela, 2018) lo que demuestra que aún se sabe poco de su vía metabólica. El consumo de glucosa es total al final de la fermentaciones, mientras que aún queda fructosa en el medio. Para acabar, se calculó el etanol teórico siendo de 11,76% en una concentración de 200 g/L de azúcar inicial en el mosto. Las especies *No-Saccharomyces* tienden a producir vinos con bajas concentraciones de alcohol (Belda et al., 2015; Contreras et al., 2014; Loira et al., 2015; Morata et al., 2020), como se refleja en la Tabla 3, dónde la producción de etanol oscila entre el 9% y el 11%, siendo *Td5* la cepa con una menor concentración de etanol, bastante alejada del etanol teórico calculado.

6.2 Fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto

Una vez comprobado la capacidad fermentativa de las levaduras, se comprobó si el hecho de fermentar inicialmente con las cepas de *T. delbrueckii* durante las primeras 48h de fermentación afectaba al desarrollo en la fermentación de *L. thermotolerans* y viceversa.

6.2.1 Cinética de la fermentación

A primera vista, en la Figura 10 se pudo observar que ninguna fermentación mixta fue capaz de finalizar la fermentación a los 20 días. Resalta que *TdB ; Lt2* presentó una tendencia de fermentación más rápida que *Td5 ; Ltk* y *TdB ; Ltk* a pesar de que , como se observó en la Figura 9, *Lt2* presentó una menor capacidad fermentativa que *Ltk*. Por otra parte, entre las dos cepas de *T. delbrueckii* se observó que *TdB* tenía un menor efecto sobre la fermentación de las cepas de *L. thermotolerans* que *Td5*. Estas dos cepas, *TdB ; Lt2* y *TdB ; Ltk* presentaron una cinética fermentativa similar hasta del día 8 que se empiezan a diferenciar, por lo que puede que haya un factor afecte más a *Ltk* que a *Lt2*.

En la Figura 11, se observó que la inoculación inicial de una cepa de *L. thermotolerans* afectó más a las cepas de *T. delbrueckii* que lo que se había visto al revés, produciéndose paradas de fermentación a densidades más altas. (Figura 10) y, por tanto, tampoco fueron capaces de finalizar la fermentación a los 20 días. También se observó que la segunda inoculación con *TdB* presentó una tendencia fermentativa más rápida que la segunda inoculación con *Td5*, a pesar de que esta última presentara una mayor capacidad fermentativa que la primera (Figura 8) de manera similar

que en el caso de *Lt2* y *Ltk* que se vio en la Figura 10. Por otro lado, la primera inoculación con *Lt2* parece ser que tiene un menor efecto sobre *T. delbrueckii* que *Ltk*.

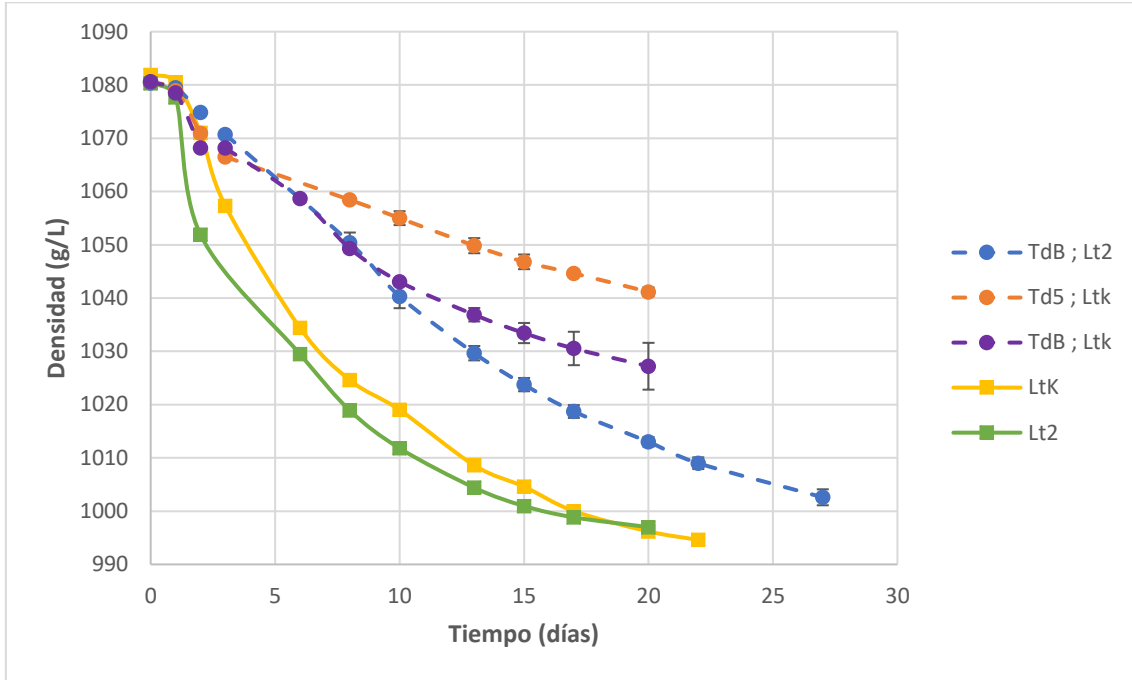


Figura 10: Evolución de la densidad de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto (*TdB ; Lt2*, *TdB ; Ltk*, *Td5 ; Ltk*) junto a las fermentaciones individuales de *Ltk* y *Lt2* como controles.

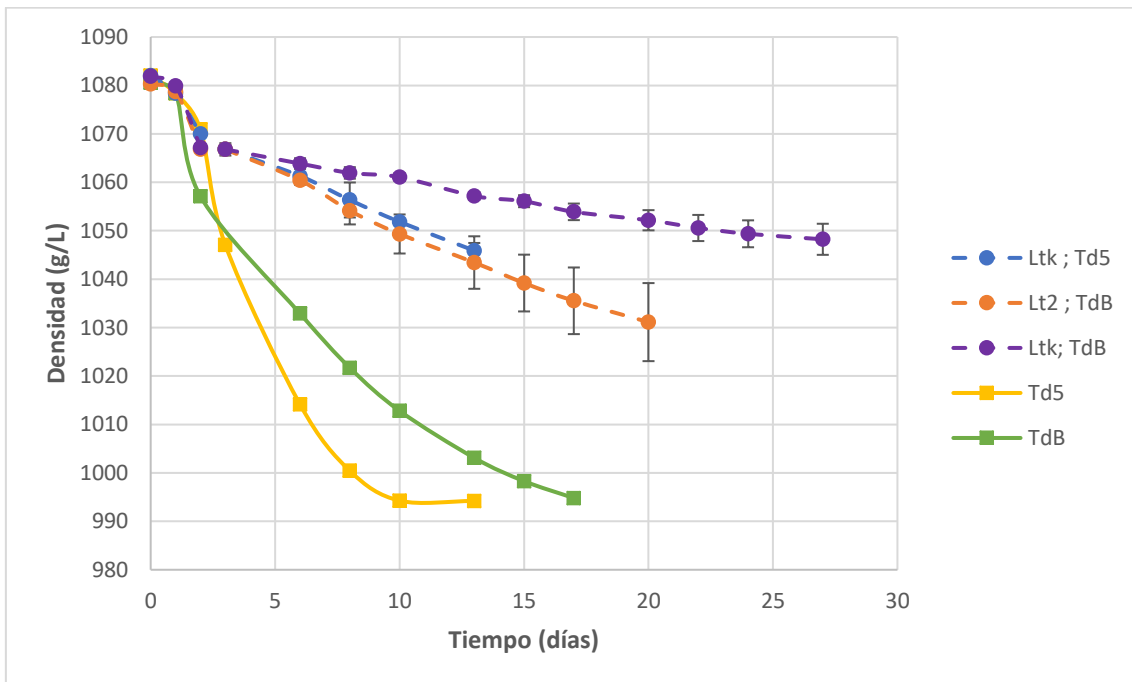


Figura 11: Evolución de la densidad de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto (*Ltk ; Td5*, *Ltk ; TdB*, *Lt2 ; TdB*) junto a las fermentaciones individuales de *Td5* y *TdB* como controles.

6.2.2 Evolución poblacional

En la Figura 12, se observó que las fermentaciones mixtas presentaron unos niveles de biomasa bastante similares entre ellas. Presentaron una pequeña fase exponencial después de la segunda inoculación hasta el día 6 donde entran en una fase estacionaria. Los niveles de biomasa de las fermentaciones mixtas son muy inferiores a los de los inóculos puros, por lo que hay un factor que inhibe la producción de biomasa.

En la Figura 13, *Ltk ; Td5* presentó una fase exponencial de producción de biomasa hasta el día 10, llegando a unos niveles superiores al resto de fermentaciones mixtas, por lo que *Td5* presenta una mayor producción de biomasa que *TdB*. Por otra parte, *TdB* presentó una pequeña fase exponencial hasta el día 6, donde entra en una fase estacionaria. En la combinación *Lt2 ; TdB*, se observó que a partir del día 13 la biomasa de *TdB* empieza a decrecer. Finalmente, al igual que en la Figura 11, las fermentaciones mixtas no son capaces de alcanzar los niveles de producción de biomasa que las inoculaciones puras.

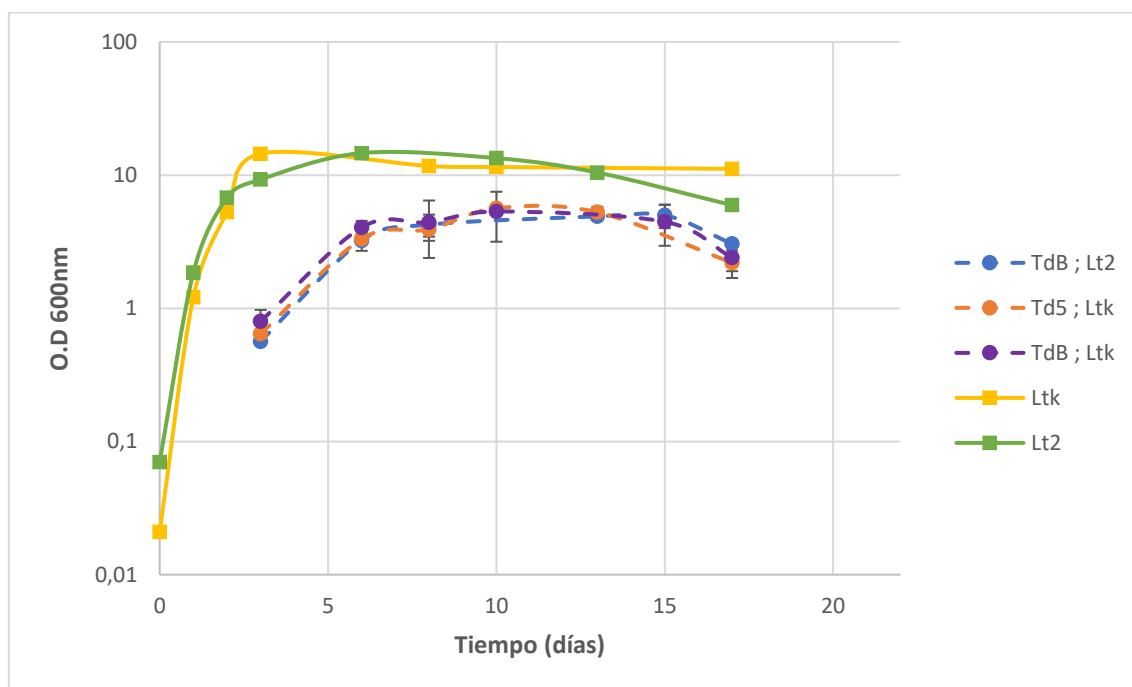


Figura 12: Variación de la O.D a 600nm de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto (*TdB ; Lt2*, *Td5 ; Ltk*, *TdB ; Ltk*) junto a fermentaciones individuales *Ltk* y *Lt2* como controles.

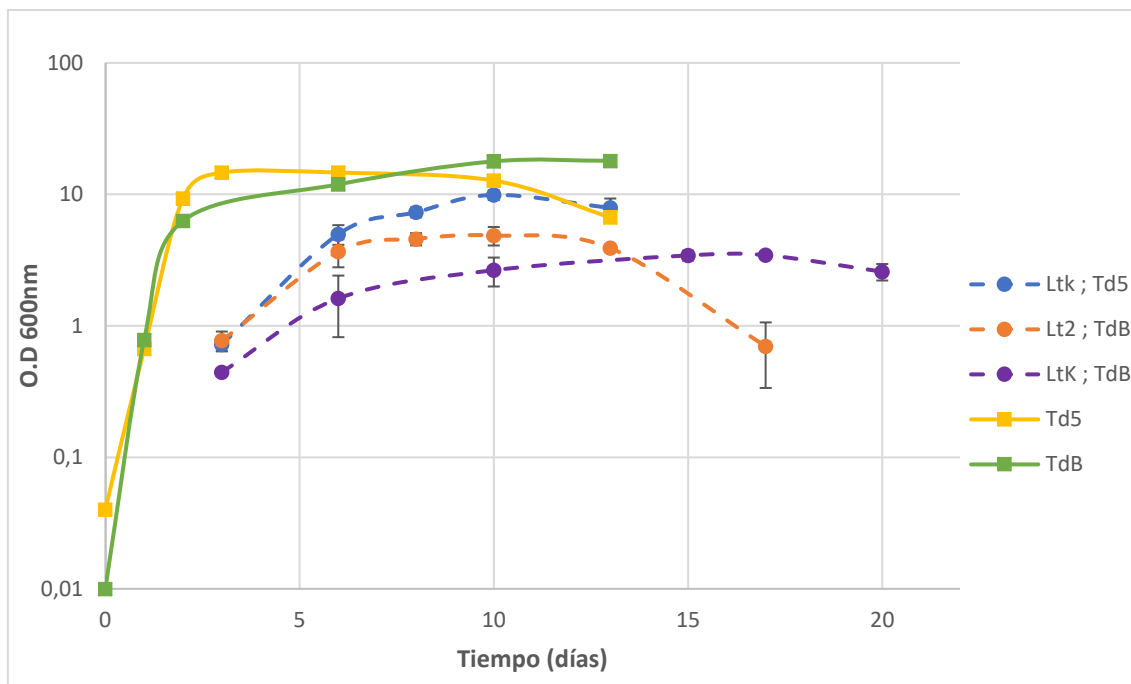


Figura 13: Variación de la población de la O.D a 600nm de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto (LtK ; Td5, LtK ; TdB, Lt2 ; TdB) junto a Td5 y TdB como control.

6.2.3 Consumo de nitrógeno

YAN se utiliza como una medida de la fuente de nitrógeno orgánico (aminoácidos libres) e inorgánico (NH_3 y NH_4). Debido a que las bajas concentraciones de nitrógeno están asociadas a retrasos o paradas en la fermentación, el análisis del contenido de YAN inicial en el mosto es necesario para predecir este tipo de problemas.

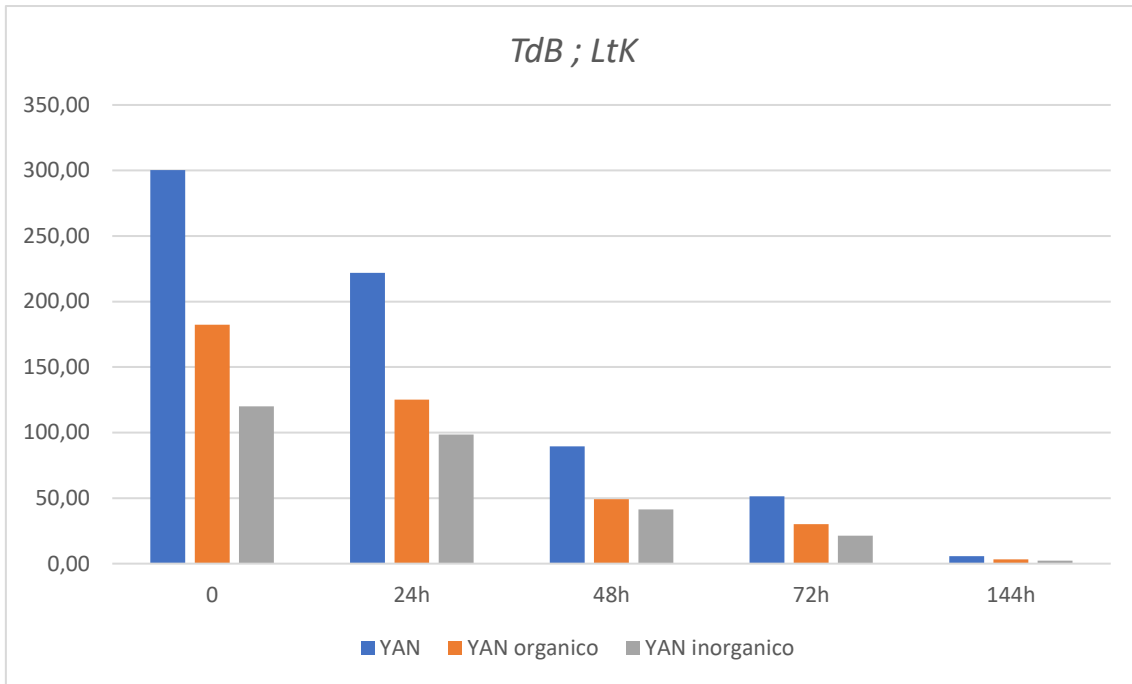


Figura 14: Evolución del consumo de nitrógeno de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto Tdb ; LtK.

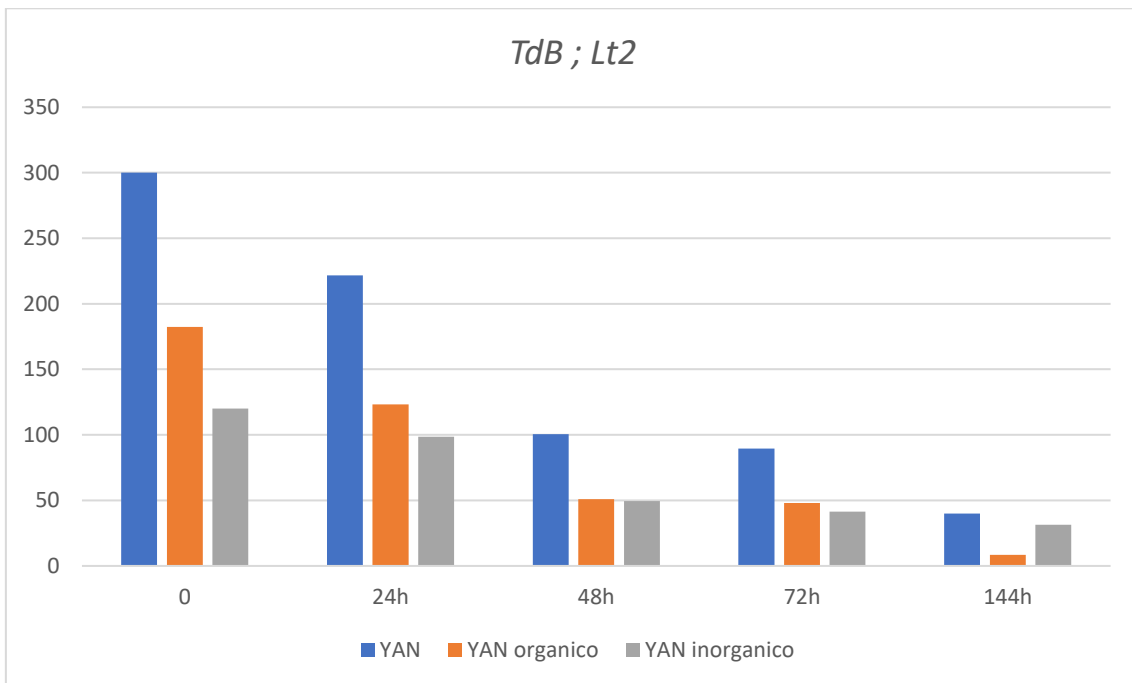


Figura 15: Evolución del consumo de nitrógeno de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto Tdb ; Lt2.

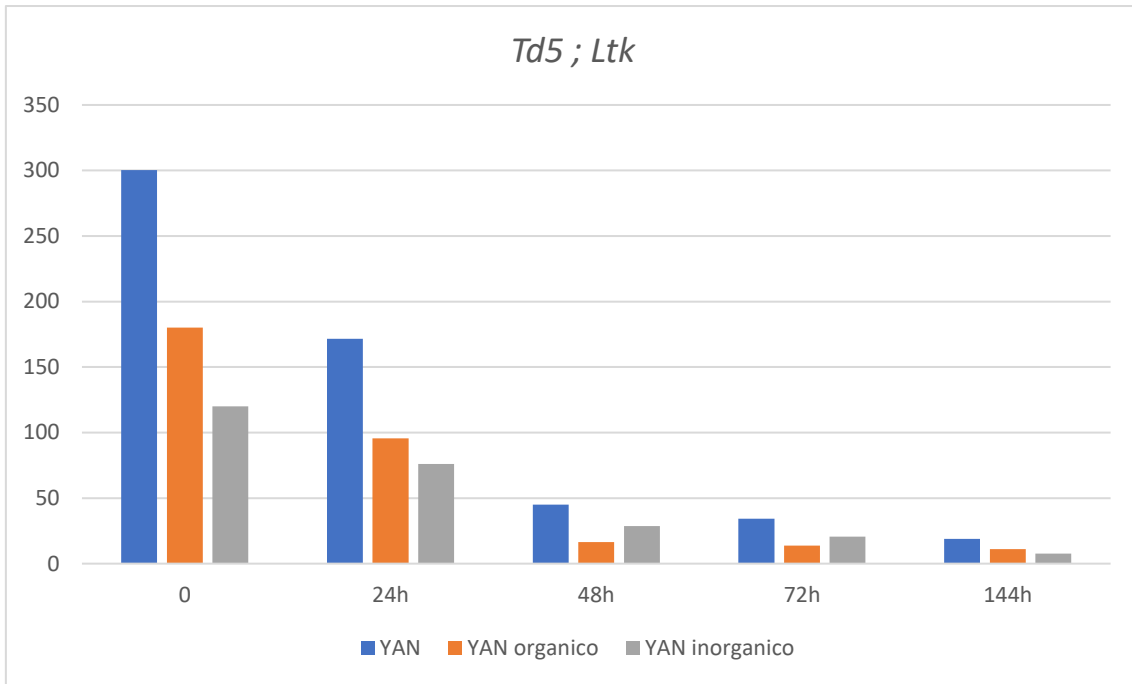


Figura 16: Evolución del consumo de nitrógeno de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto *Td5 ; Ltk*.

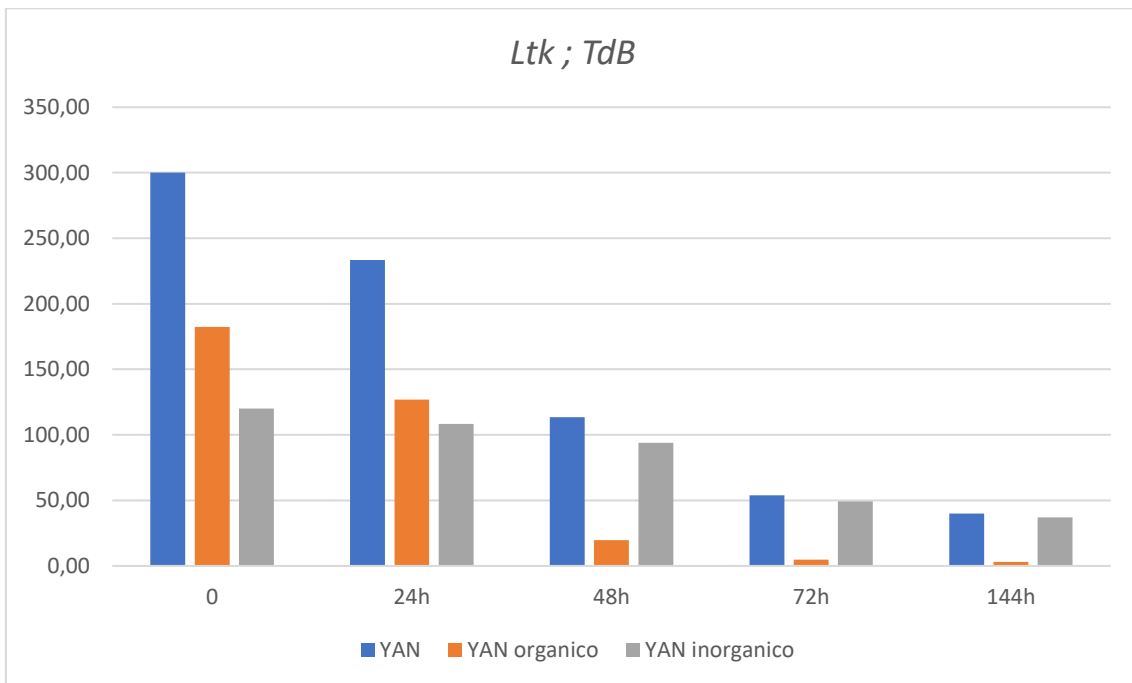


Figura 17: Evolución del consumo de nitrógeno de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto *Ltk ; TdB*.

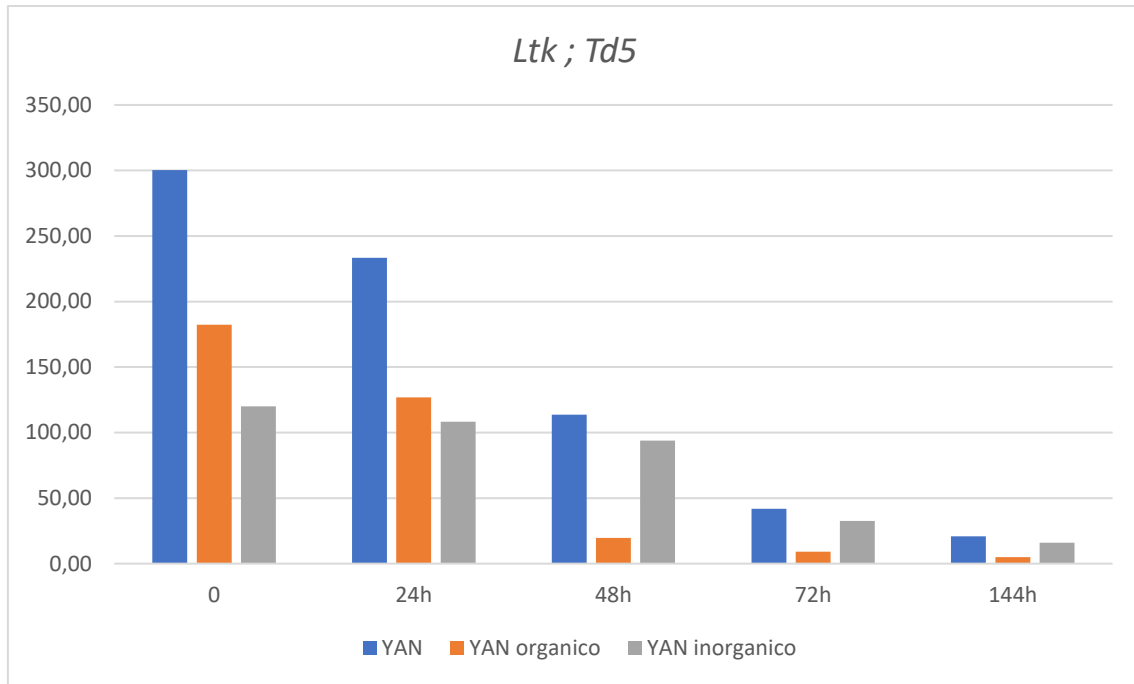


Figura 18: Evolución del consumo de nitrógeno de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto *Ltk*; *Td5*.

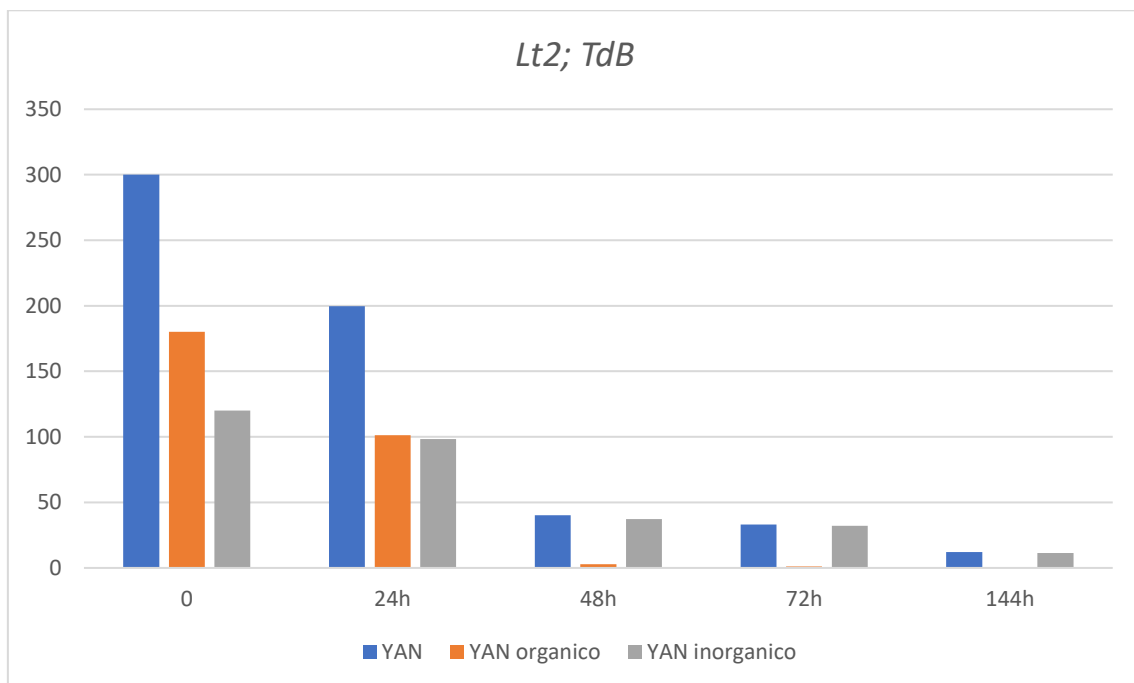


Figura 19: Evolución del consumo de nitrógeno de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto *Lt2*; *TdB*.

Se observa una escasez de YAN en todas las fermentaciones mixtas a las 144h (6 días), habiendo un mayor consumo de YAN orgánico, llegando a ser inferior a 50 mg/L a las 48h en comparación con YAN inorgánico. Por otro lado, *TdB* es la cepa que menor cantidad de YAN orgánico consume de todas, mientras que *Ltk* es la cepa que menos cantidad de YAN inorgánico consume, dejando grandes cantidades de este a las 48h.

Con estos resultados podemos pensar que la falta de YAN orgánico a los 6 días sea la responsable de que la segunda cepa ya no crezca más y entre en fase estacionaria lo que puede provocar las paradas de las fermentaciones. Hay un mayor consumo de YAN orgánico por parte de las cepas de *L. thermotolerans* que, de YAN inorgánico, mientras que las cepas de *T. delbrueckii* consumen mayores cantidades de YAN inorgánico que de YAN orgánico.

6.3 Fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto con adición de nutrientes

Debido a que ninguna fermentación mixta es capaz de finalizar la fermentación a los 20 días y, además, se observó la escasez de YAN a los 144h, se lleva a cabo fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto a las que, a las 48h se le adicionó nutrientes con el objetivo enriquecer el mosto para la segunda inoculación.

Esta prueba se realizó con las fermentaciones mixtas con las dos cepas de *L. thermotolerans* combinándolas con *Tdb*.

6.3.1 Cinética de la fermentación

Al adicionar nutrientes en el momento de inocular la segunda cepa en las fermentaciones secuenciales sin contacto, se observa en todos los casos una mejora en la fermentación Figura 20 y 21. Sin embargo, esta mejora no es igual en todos los casos. Sólo en la combinación *TdB ; Lt2*, la adición de nutrientes supuso que la fermentación se completó, mejorando incluso la fermentación individual de la cepa *Lt2*. En los otros casos, la adición de nutrientes supuso una mejora de la fermentación, muy ligera en el caso de la combinación *TdB ; Ltk*, pero en ningún caso, las cepas fueron capaces de fermentar todos los azúcares. Por tanto, parece que, en estos casos, la fermentación de la primera cepa tiene un efecto que no se debe únicamente al consumo de nutrientes esenciales para el crecimiento, sino que debe producir alguna molécula que debe ser tóxica para la segunda cepa.

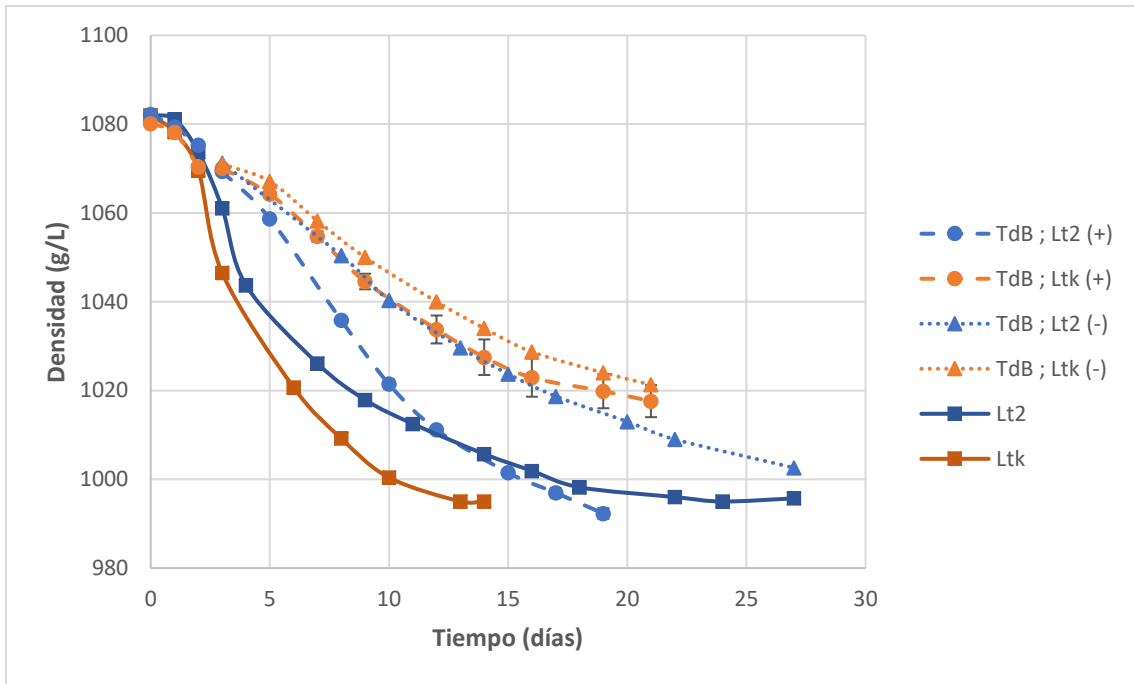


Figura 20: Evolución de las densidades de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto y adición de nutriente (TdB ; Lt2 (+), TdB ; LtK (+)) en comparación a la misma combinación sin adición de nutrientes y a las fermentaciones individuales de Lt2 y LtK..

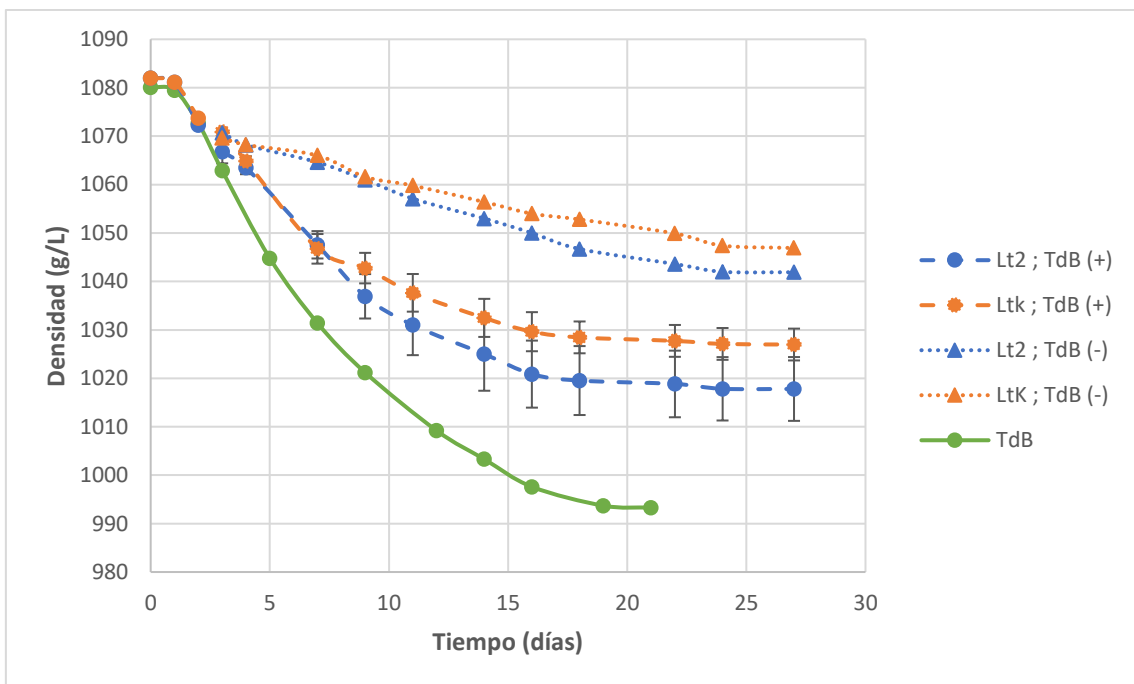


Figura 21: Evolución de las densidades de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto y adición de nutriente (LtK ; TdB (+), Lt2 ; TdB (+)) en comparación a la misma combinación sin adición de nutrientes y a la fermentación individual de TdB.

6.3.2 Evolución poblacional

Se observó tanto en la Figura 22 y como en la Figura 23 un aumento de la producción de biomasa de las fermentaciones mixtas, siendo muy ligera en el caso de la combinación *TdB* ; *Ltk* con adiciones respecto a las control negativo. La combinación *TdB* ; *Lt2* es capaz de llegar a niveles de biomasa similares a *Lt2* el día 9, en cambio, a pesar de las mejoras en la producción de biomasa, el resto de las fermentaciones mixtas no consiguen llegar a los niveles de producción de biomasa de las fermentaciones de inóculo puro. Las segundas inoculaciones con *L. thermotolerans* presentan una cinética típica con las fases de crecimiento de fase exponencial, fase estacionaria y muerte celular, llegando al día 20 baja cantidad de biomasa, mientras que las segundas inoculaciones con *TdB*, esta presenta una fase exponencial hasta el día 7, donde se mantiene en una fases estacionaria.

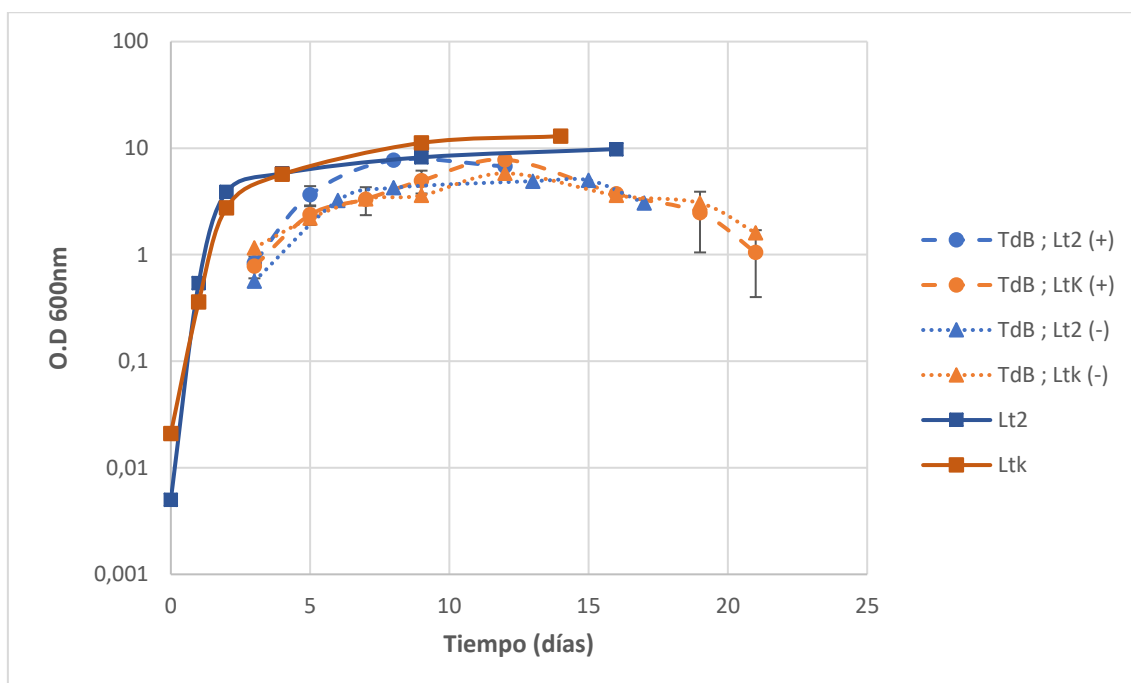


Figura 22: Variación de la O.D a 600nm de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto y adición de nutriente (*TdB* ; *Lt2* (+), *TdB* ; *LtK* (+)) en comparación a la misma combinación sin adición de nutrientes y a las fermentaciones individuales de, *Lt2* y *LtK*.

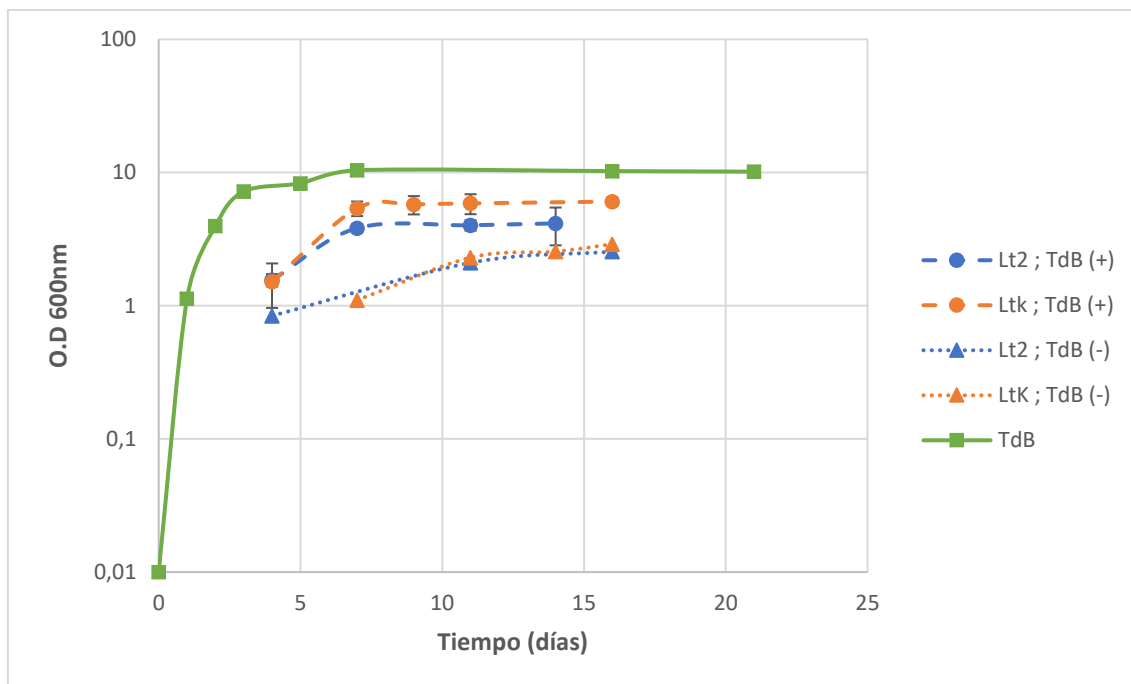


Figura 23: Variación de la O.D a 600nm de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto y adición de nutriente (LtK ; TdB (+), Lt2 ; TdB (+)) en comparación a la misma combinación sin adición de nutrientes y a la fermentación individual de TdB.

Con la totalidad de estos resultados podemos recalcar que las mejores cinéticas de fermentación se producen cuando se inocula en primer lugar la cepa *TdB*. Esta tiene un mayor efecto sobre *Ltk* que sobre *Lt2* cuando se inocula en primer lugar, mientras que cuando se inocula en segundo lugar, *Ltk* tiene un mayor efecto sobre *TdB* que *Lt2*. Parece que las mejores combinaciones son entre *TdB* y *Lt2*.

En la búsqueda de vinos con mayor complejidad organoléptica que se alejen de los procesos tradicionales de elaboración del vino con fermentaciones puras con *S. cerevisiae*, la selección de cepas *No-Saccharomyces* para obtener los parámetros apropiados en un vino con mayor complejidad organoléptica es uno de los enfoques más prometedores. Tanto *T. delbrueckii* como *L. thermotolerans* son capaces de fermentar completamente el mosto, se ha observado que inóculos puros de *T. delbrueckii* terminan la fermentación a los 11 días (Taillandier et al., 2014). El poder fermentativo de estas dos especies abre la posibilidad de poder utilizarlas tanto como inóculos puros, en combinaciones con otras *No-Saccharomyces*, o con *S. cerevisiae*. Se ha demostrado que el uso de cepas de *T. delbrueckii* y *S. pombe* en fermentaciones secuenciales junto a *S. cerevisiae* son capaces de finalizar la fermentación a los 22 días, mientras que en fermentaciones mixtas tardan la mitad. En ambas combinaciones se obtuvieron mejoras en las propiedades organolépticas en el vino, permitiendo el uso de *T. delbrueckii* en fermentaciones mixtas un potencial aumento de los aromas frutales en el vino (Loira et al., 2015). También en Belda et al. (2017) se observó que fermentaciones secuenciales *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* tardaron 23 días en completar la fermentación. En cuanto a *L. thermotolerans*, se ha visto que en

fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae*, el crecimiento de *L. thermotolerans* se ve afectado por la presencia de *S. cerevisiae*, mientras que en fermentaciones secuenciales *L. thermotolerans* mostró una persistencia más prolongada después de la inoculación de *S. cerevisiae*, probablemente debido a la competencia por el nitrógeno, sin embargo, se produjo una reducción del pH y una mejora en el 2-feniletanol y el glicerol (Gobbi et al., 2013). También se ha estudiado la coinoculación de levaduras *No-Saccharomyces* en fermentaciones terciarias con *S. cerevisiae*, que puede ser una herramienta para obtener vinos más complejos (Vaquero et al., 2021). En este trabajo se ha demostrado que la fermentación secuencial *TdB ; Lt2* es capaz de finalizar la fermentación en 19 días en medio rico en nitrógeno asimilable, por lo que se puede usar esta combinación como una alternativa a *S. cerevisiae*, para remediar la falta de acidez en vinos producidos en zonas cálidas gracias a la producción de ácido láctico de *Lt2* (Tabla 3) combatiendo el problema del cambio climático en el futuro (Benito, 2018a) Además, se tendría que realizar un estudio para ver la composición aromática de los vinos resultantes tanto en mosto sintético como en mosto natural, para valorar lo que puede aportar la combinación *TdB ; Lt2*.

En cuanto a las paradas de la fermentación, en las Figuras 14-19 se observó que las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto presentaban niveles muy bajos de YAN a las 144h. En otros estudios, se ha observado que *S. cerevisiae* no pudo desarrollarse en fermentaciones secuenciales debido al agotamiento del nitrógeno por el crecimiento de *T. delbrueckii* durante las primeras 48h, pero que en medios con altas concentraciones de nitrógeno asimilable el crecimiento de *S. cerevisiae* no se vio afectado por *T. delbrueckii* (Taillandier et al., 2014) Con las adiciones de nutrientes (Figura 20 y 21) *TdB ; Lt2* fueron capaces de finalizar la fermentación a los 19 días, por tanto, uno de los factores que provocan las paradas de las fermentación es la falta de nutrientes, sin embargo, el resto de fermentaciones a pesar de mejorar sus cinéticas de fermentación, no consiguieron finalizarla. Puesto a que se sigue produciendo una inhibición en el resto de las combinaciones, a pesar de las adición de nutrientes, no se puede confirmar que la inhibición entre *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* sea específica entre cepas. En estudios anteriores de la URV se había llegado a la conclusión que *Td5* tenía un mayor efecto sobre *Lt2*, mientras que en este estudio se aprecia que *Lt2* y *Ltk* tienen un mayor efecto sobre *TdB*.

No es probable que la inhibición de las fermentaciones mixtas se produzca por una alta concentración de etanol en etapas avanzadas de la fermentación, puesto que tanto *L. thermotolerans* como *T. delbrueckii* lo toleran y son capaces de llegar a concentraciones del 11% de etanol (Renault et al., 2009; Vaquero et al., 2020) La alta producción de ácido láctico de *L. thermotolerans* modifica el pH acidificando el mosto, por tanto, podría afectar al desarrollo de *T. delbrueckii*. Se ha observado que la mayor parte de la acidificación con *L. thermotolerans* se produce al inicio de la fermentación (Morata et al., 2018).

Otra factor para tener en cuenta, es la síntesis por parte de *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* durante la primera inoculación, de alguna molécula que inhiba la fermentación de la segunda cepa inoculada. Se ha observado que cepas de *T. delbrueckii* producen una toxina denominada TdKT con un peso moléculas mayor de 30 kDa eficaz contra otras levaduras como *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia manshurica* y *Pichia membranifaciens* (Villalba et al., 2016) Por otra parte, *L. thermotolerans* se ha utilizado como organismo de biocontrol contra hongos toxigénicos *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium verrucosum* y *Fusarium graminearum* gracias a que sus compuestos orgánicos volátiles consiguieron reducir en un 48% el crecimiento de hongos (Zeidan et al., 2018). Se ha visto con el uso de biorreactores de membranas que la cepa QA23 de *S. cerevisiae* en fermentaciones mixtas, secreta un metabolito que inhibe el crecimiento de *T. delbrueckii* (Taillandier et al., 2014). Entre las hipótesis del causante de este fenómeno de amensalismo se encuentra la inhibición a causa de acetaldehído o acetoína (Ciani et al., 2010), la producción de toxinas asesina o de algún péptido (Albergaria et al., 2010).

7. Conclusión

Se confirma la hipótesis planteada de que la inhibición entre cepas *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* se debe a una falta de algún nutriente esencial, pero este no es el único factor culpable del retraso de las fermentaciones. A pesar de la sinergia entre *TdB*; *Lt2*, y conseguir finalizar la fermentación con la ayuda de la adición de nutrientes, en *TdB*; *Ltk*, la suplementación de nutrientes tiene un efecto casi nulo, por lo que se puede hipotetizar que la síntesis de una molécula secretada por *TdB* inhiba la fermentación de *Ltk*. Por otra parte, las fermentaciones que empiezan con una cepa de *L. thermotolerans* y con la inoculación posterior de *TdB* y suplementación con nutrientes, presentan una mejora diferencial en su cinética de fermentación, pero no consiguen finalizarla. Por tanto, también hace pensar que las dos cepas *L. thermotolerans* secreten alguna molécula que inhiba a *TdB*.

Se debe continuar con la búsqueda de la causa de estas inhibiciones entre cepas. Una línea de investigación a seguir sería la realización de fermentaciones mixtas con separación de membranas en un mismo biorreactor, utilizando las cepas de *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii*, y utilizando membranas con diferentes tamaños de poros para ver si se retiene la posible molécula causante de la inhibición y poderla posteriormente identificar. Otra línea de investigación sería analizar los parámetros y componentes del mosto final de las fermentaciones mixtas con adición de nutrientes, y observar si hay algún componente especial que pueda afectar a las paradas.

8. Autoevaluación

Las practicas realizadas durante este curso han sido mi primera experiencia profesional en un laboratorio de investigación. Los primeros experimentos realizados en este trabajo fueron mi primera toma de contacto con la biotecnología enológica, por lo que tuve que familiarizarme con los protocolos de trabajo en el laboratorio para mantener la asepsia en los cultivos o el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en las fermentaciones. A medida que avanzaba en el trabajo he ido entendiendo el comportamientos de las levaduras que utilizaba y mejorando mi eficiencia en el trabajo de laboratorio. Esto se refleja en la evolución de mi trabajo y los resultados obtenidos.

Durante el trabajo me ha motivado resolver los problemas que han surgido en las fermentaciones, buscarle soluciones y obtener resultados satisfactorios, aunque a veces en este campo de investigación, es frustrante que el error en un pequeño detalle eche a perder días o incluso semanas de trabajo. Creo que he encontrado en la microbiología una rama que me motive para proseguir mis estudios en la realización de un máster más especializado en este ámbito.

9. Bibliografía

- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., & Gírio, F. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(3), 965–972. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2409-6>
- Alexandre, H., & Charpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *20*(1), 20–27. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900442>
- Anfang, N., Brajkovich, M., & Goddard, M. R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *15*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x>
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., & Benito, S. (2015). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(4), 1911–1922. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6197-2>
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., & Santos, A. (2017). Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, *257*, 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., Rozes, N., Mas, A., & Guillamon, J. (2004). Nitrogen catabolite repression in 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 *Torulaspora 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, S. (2018a). 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. (2018b). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(16), 6775–6790. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9117-z>
- Blateyron, L., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *91*(2), 184–189. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80063-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80063-3)
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*, *181*, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>
- 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>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(5), 1670–1678. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C., & Varela, C. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International Journal of Food Microbiology*, *205*, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027>
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, *8*(7), 979–995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>

- 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>
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & García-Romero, E. (2007). Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 608–613. <https://doi.org/10.1021/jf062820m>
- Hu, K., Jin, G. J., Xu, Y. H., Xue, S. J., Qiao, S. J., Teng, Y. X., & Tao, Y. S. (2019). Enhancing wine ester biosynthesis in mixed Hanseniaspora uvarum/Saccharomyces cerevisiae fermentation by nitrogen nutrient addition. *Food Research International*, 123, 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.030>
- Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1998). *Introducción a la microbiología* (Vol. 2). Reverté, S.A.
- 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>
- Labuschagne, P., & Divol, B. (2021). Thiamine: a key nutrient for yeasts during wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(3), 953–973. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11080-2>
- Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M. J., González, C., Calderón, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2015). Use of Schizosaccharomyces pombe and Torulaspora delbrueckii strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Research International*, 76, 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.030>
- Martin, V., Giorello, F., Fariña, L., Minteguiaga, M., Salzman, V., Boido, E., Aguilar, P. S., Gaggero, C., Dellacassa, E., Mas, A., & Carrau, F. (2016). De novo synthesis of benzenoid compounds by the yeast hanseniaspora vineae increases the flavor diversity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4574–4583. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05442>

- Mas Barón, A., Padilla, B., Esteve-Zarzoso, B., & Beltran Casellas, G. (2015). Utilización de inóculos mixtos de levaduras autóctonas como herramientas para reproducir la huella microbiológica de la zona. *ACE: Revista de Enología*, 149, 1. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/citart?info=link&codigo=5368184&orden=0>
- Mecca, D., Benito, S., Beisert, B., Brezina, S., Fritsch, S., Semmler, H., & Rauhut, D. (2020). Influence of nutrient supplementation on torulaspora delbrueckii wine fermentation aroma. *Fermentation*, 6(1), 35. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6010035>
- Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M. A., Loira, I., del Fresno, J. M., González, C., & Suárez-lepe, J. A. (2020). Contribution of non-saccharomyces yeasts to wine freshness. A review. *Biomolecules*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/biom10010034>
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M. A., González, C., & Suárez Lepe, J. A. (2018). Lachancea thermotolerans applications in wine technology. *Fermentation*, 4(3), 53. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>
- Organización Internacional de la Viña y el Vino. (2019). *Actualidad de la conyuntura del sector vitivinícola mundial en 2019*.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(1), 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Porter, T. J., Divol, B., & Setati, M. E. (2019). Lachancea yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Research International*, 119, 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>
- Quirós, M., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., & Gonzalez, R. (2010). A new methodology to obtain wine yeast strains overproducing mannoproteins. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1–2), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.014>

- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J. C., & Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., & Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2 nd Edition*. www.wiley.com
- Rodríguez, M. E., Lopes, C., Valles, S., Giraud, M. R., & Caballero, A. (2007). Selection and preliminary characterization of β -glycosidases producer Patagonian wild yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6–7), 812–820. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.004>
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3)
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., & Capozzi, V. (2020). Non-Saccharomyces Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11(1), 27–39. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>
- Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora 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>
- Tempère, S., Marchal, A., Barbe, J. C., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Marullo, P., & Albertin, W. (2018). The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(9), 3995–4007. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8914-8>

- Vaquero, C., Loira, I., Bañuelos, M. A., Heras, J. M., Cuerda, R., & Morata, A. (2020). Industrial performance of several lachancea thermotolerans strains for ph control in white wines from warm areas. *Microorganisms*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060830>
- Vaquero, C., Loira, I., Heras, J. M., Carrau, F., González, C., & Morata, A. (2021). Biocompatibility in Ternary Fermentations With Lachancea thermotolerans, Other Non-Saccharomyces and Saccharomyces cerevisiae to Control pH and Improve the Sensory Profile of Wines From Warm Areas. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656262>
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 145–157. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1145-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 Torulaspora delbrueckii effective against wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.006>
- Volschenk, H., van Vuuren, H. J. J., & Viljoen-Bloom, M. (2017). Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27(2). <https://doi.org/10.21548/27-2-1613>
- Walker, G. M. (1994). The roles of magnesium in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14(4), 311–354. <https://doi.org/10.3109/07388559409063643>
- Ward, O. P. (1989). *Biotechnology de La Fermentacion*. Acribia S.A.
- Zeidan, R., Ul-Hassan, Z., Al-Thani, R., Balmas, V., & Jaoua, S. (2018). Application of low-fermenting yeast Lachancea thermotolerans for the control of toxigenic fungi Aspergillus parasiticus, Penicillium verrucosum and Fusarium graminearum and their mycotoxins. *Toxins*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/toxins10060242>

9. Anexos

Anexo 1: Mosto sintético

10.1.1 Protocolo preparación mosto sintético

1. Pesar reactivos (Tabla 4) y añadir agua destilada (menos. de 200ml o 300ml del volumen final deseado).
2. Poner en el autoclave a 121 °C.
3. Pasar a un vaso de precipitados. Añadir vitaminas, aminoácidos, oligoelementos y factores de anaerobiosis. Los factores de anaerobiosis se calientan previamente en baño maría a 70°C durante 5 minutos. (Tabla 5 y 6).
4. Ajustar el pH a 3,3 en un pH-metro (añadiendo NaOH).
5. Añadir agua destilada hasta el volumen final deseado.
6. Filtrar (0,22 um) usando un equipo de filtración de membrana.

10.2.3 Tabla de reactivos

Tabla 4: Reactivos a añadir antes de autoclavar.

	2L	2,5L	3L
Azúcares	(g)	(g)	(g)
Glucosa	200	250	300
Fructosa	200	250	300
Ácidos	(g)	(g)	(g)
Ácido Málico	10	12,5	15
Ácido Cítrico, H ₂ O	1	1,25	1,5
Ácido Tartárico	6	7,5	9
Minerales	(g)	(g)	(g)
KH ₂ PO ₄	1,5	1,88	2,25
K ₂ SO ₄	1	1,25	1,5
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5	0,63	0,75
CaCL ₂ * 2H ₂ O	0,31	0,39	0,47
NaCl	0,4	0,5	0,6

NH₄CL	(g)	(g)	(g)
300 mg/L	0,92	1,15	1,38

Tabla 5: Reactivos a añadir después de autoclavar.

Oligoelementos	(mL)	(mL)	(mL)
	2	2,5	3
Vitaminas	(mL)	(mL)	(mL)
	20	25	30
Factores de Anaerobiosis	(mL)	(mL)	(mL)
	2	2,5	3
Aminoácidos	(mL)	(mL)	(mL)
	6,25	12,5	18,75

Tabla 6: Tabla de reactivos de la solución stock en 2% NaCO₃.

Aminoácidos	(g/L)
Asp	4.42
Glu	11.96
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	45,60
Oligoelementos	(g/L)
MnSO4 H2O	0,004
ZnSO4 H2O	0,004
CuSO4 5H2O	0,001
KI	0,001
CoCl2 6H2O	0,0004
H3BO3	0,001
(NH4)6 Mo7O24 4H2O	0,001
Vitaminas	(g/L)
Myo-Inositol	0,02
Pantotenato de Calcio	0,0015
Tiamina hidrocloreuro	0,00025
Ácido Nicotínico	0,002
Pyridoxina	0,00025
Biotina (100mg/L)	0,000003
Factores de Anaerobiosis	(g/L)
Ergosterol	0.015
Ácido Oléico	0,0045
Pilisorbato 80	0,535
Etanol (absoluto)	0,395

Anexo 2: Medios de cultivos

10.2.1 Preparación de 1L de medio YPD líquido

1. Pesar 20 g de Glucosa, 20 g de Peptona, 10 g de Extracto de Levadura en una balanza analítica.
2. Se hidratan el medio con 1 L de agua destilada.
3. Esterilizar el medio en el autoclave a 121 °C.

10.2.2 Preparación de 1L de medio YPD sólido

1. Pesar 20 g de Glucosa, 20 g de Peptona, 10 g de Extracto de Levadura y 17 g de Agar (Gelificante) en una balanza analítica.
2. Hidratar el medio con 1 L de agua destilada.
3. Esterilizar el medio en el autoclave a 121 °C.
4. Verter el medio en Placas Petri en la cámara de flujo laminar y dejarlas secar.

10.2.3 Preparación de 1L de medio WLN sólido

1. Pesar 80 g de Nutrient Broth en una balanza analítica.
2. Hidratar el medio con 1 L de agua destilada.
3. Esterilizar el medio en el autoclave a 121 °C.
4. Verter el medio en Placas Petri en la cámara de flujo laminar y dejarlas secar.

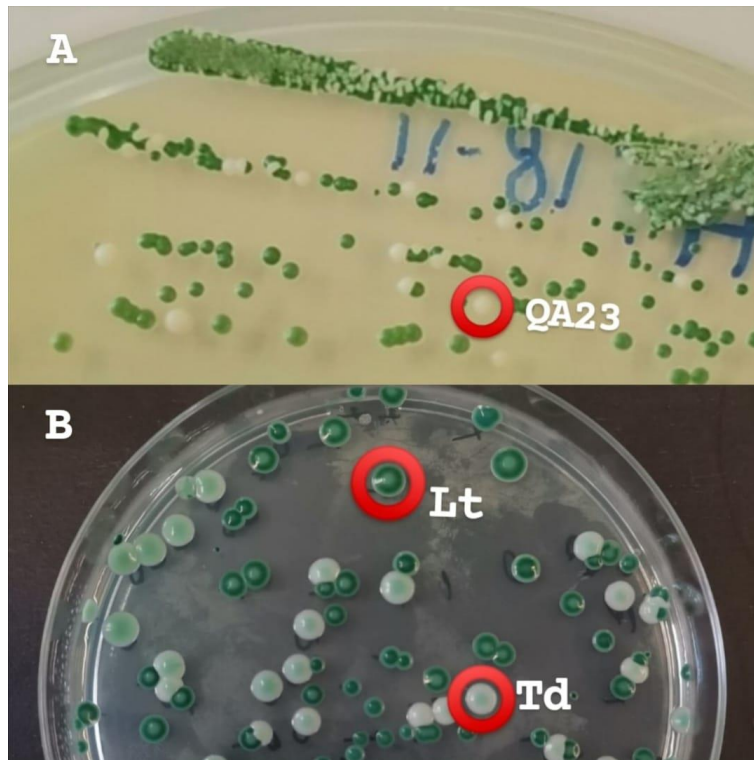


Figura S1: Cultivos mixtos en placa de levadura *L. thermotolerans* con *S. cerevisiae* QA23 (Figura A) y *L. thermotolerans* junto a *T. delbureckii* (Figura B) en medio WLN.

El medio diferencial WLN permite diferenciar las especies de levadura según las diferentes morfologías que presentan en el cultivo en placa. La cepa de *S. cerevisiae* QA23 presentan una colonias circulares blancas (Figura A), mientras que *T. delbureckii* presenta colonias circulares de un color blanco con un verde claro en el centro y *L. thermotolerans* presenta colonias circulares de un verde oscuro.

Anexo 3: Gráficas

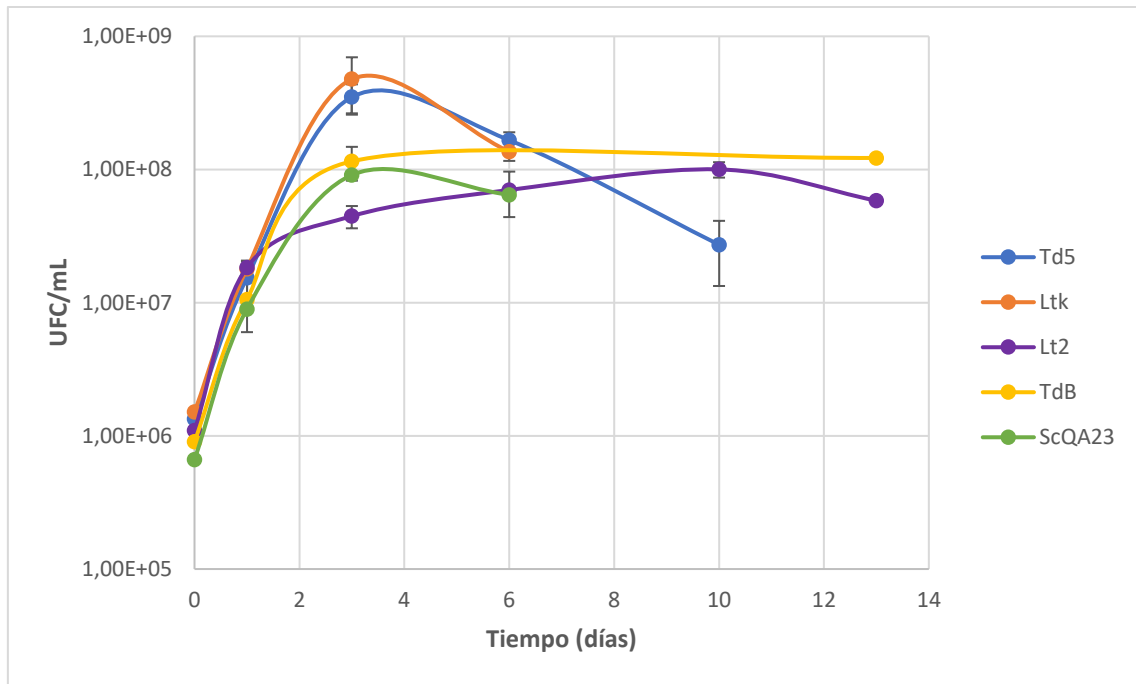


Figura S2: Variación de la población de levaduras viables de las fermentaciones de inóculo puro entre las cepas de *L. thermotolerans* (*Ltk* y *Lt2*) y las cepas de *T. delbrueckii* (*Td5* y *TdB*) junto a *QA23* como control.

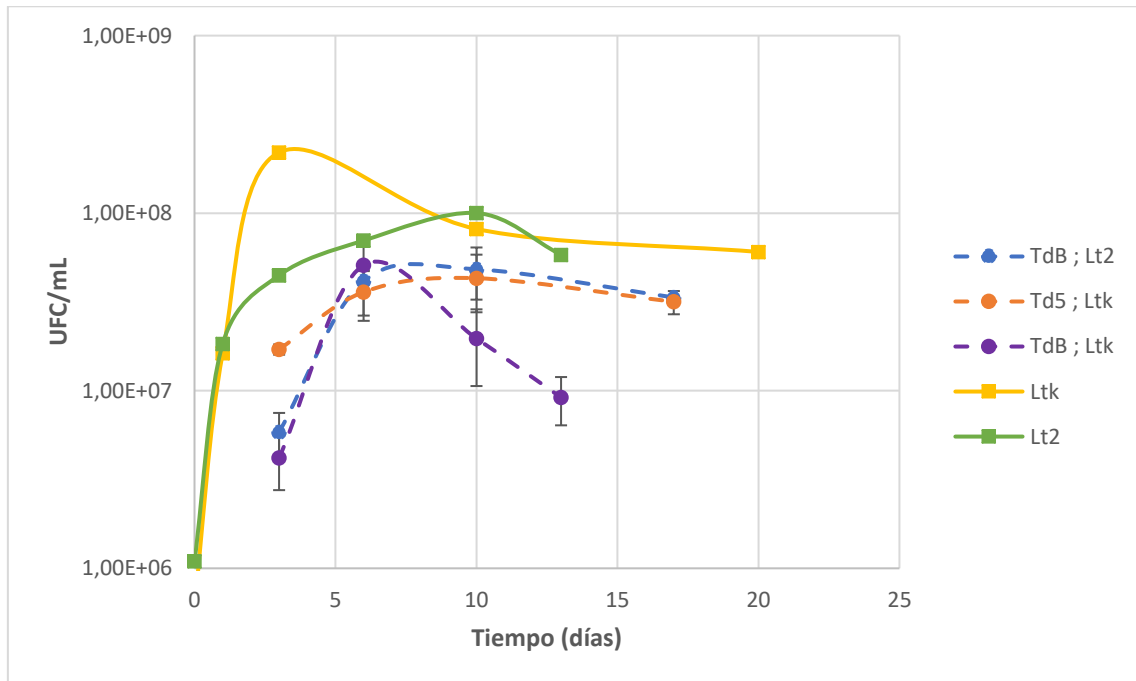


Figura S3: Variación de la población de levaduras viables de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto (*TdB ; Lt2*, *TdB ; Ltk*, *Td5 ; Ltk*) junto a *Lt2* y *Ltk* como control.

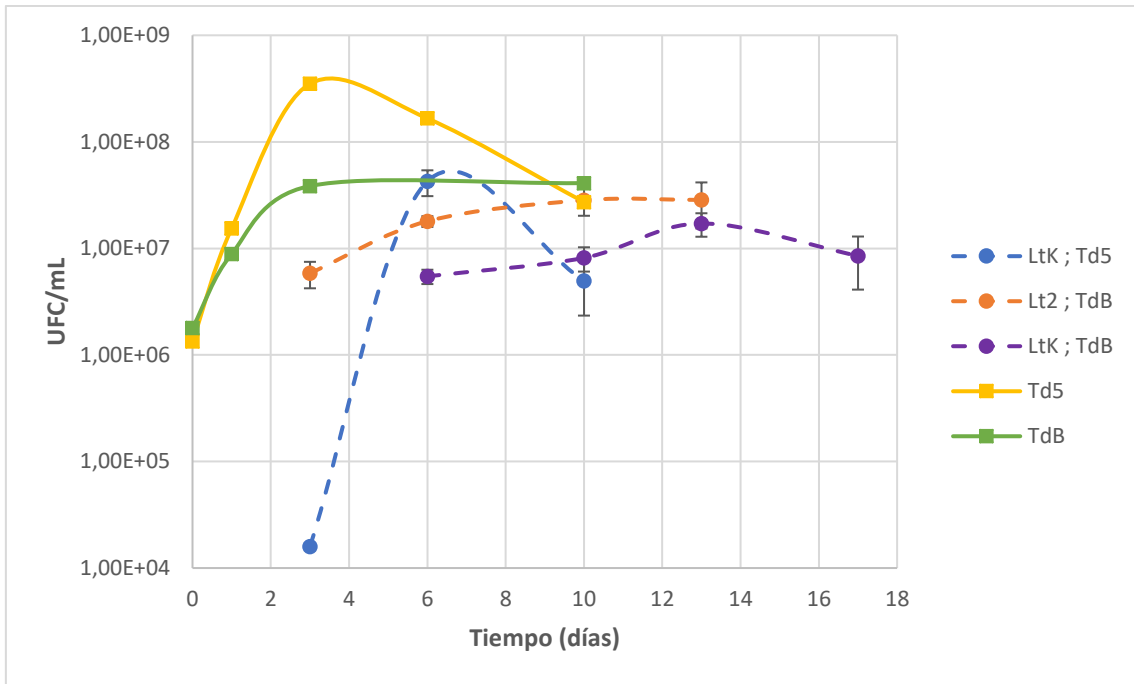


Figura S4: Variación de la población de levaduras viables de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto (LtK ; Td5, Lt2 ; TdB, LtK ; TdB) junto a Td5 y TdB como control.

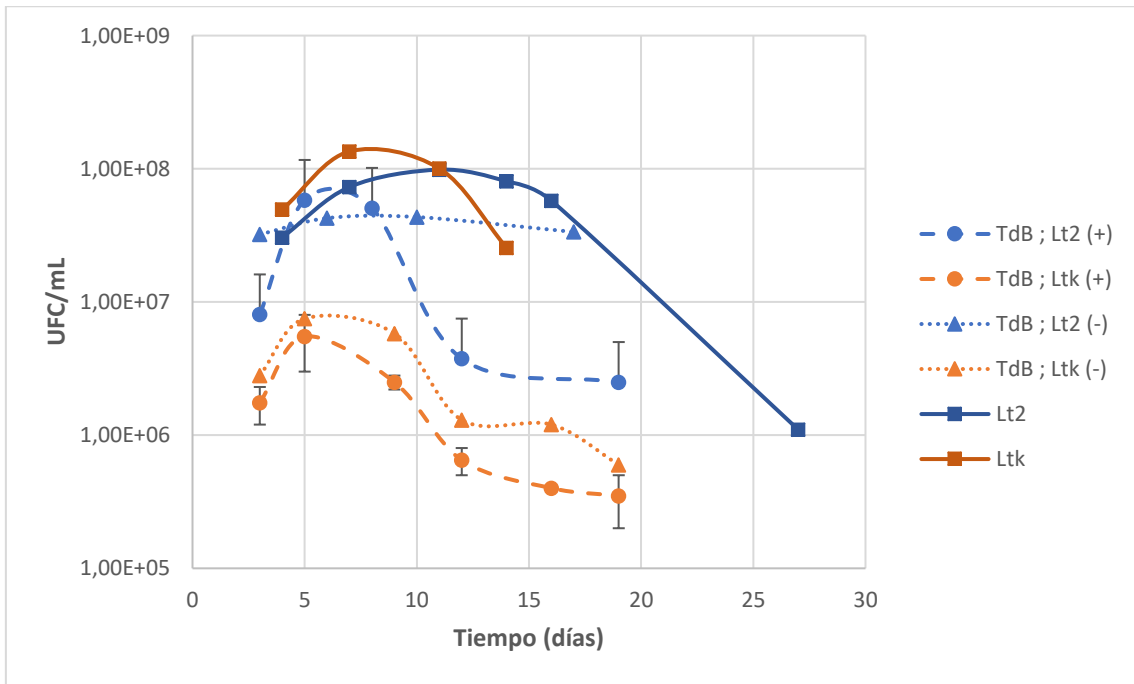


Figura S5: Variación de la población de levaduras viables de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto con adición de nutrientes (TdB ; Lt2, TdB ; LtK) junto a Lt2 y LtK como control.

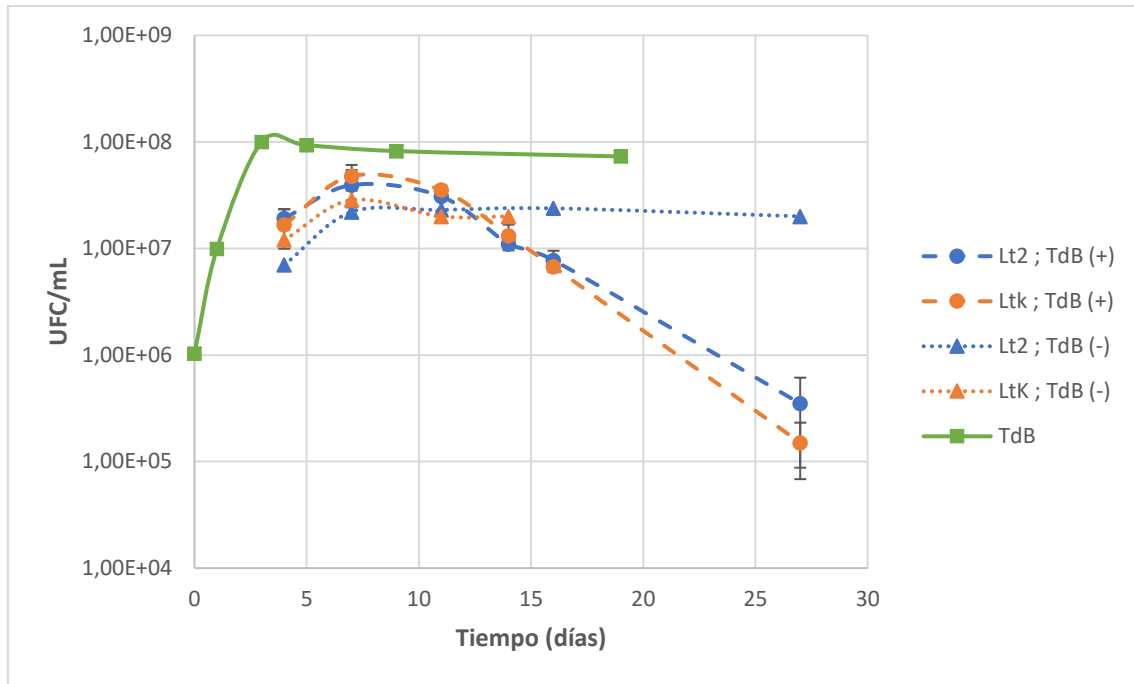


Figura S6: Variación de la población de levaduras viables de las fermentaciones mixtas con inoculación secuencial sin contacto con adición de nutrientes (Lt2 ; TdB, LtK ; TdB) y TdB como control.