



USO DE LEVADURAS NO CONVENCIONALES DEL GÉNERO *SACCHAROMYCES* EN EL SECTOR ENOLÓGICO Y CERVECERO

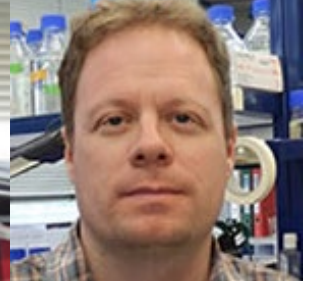
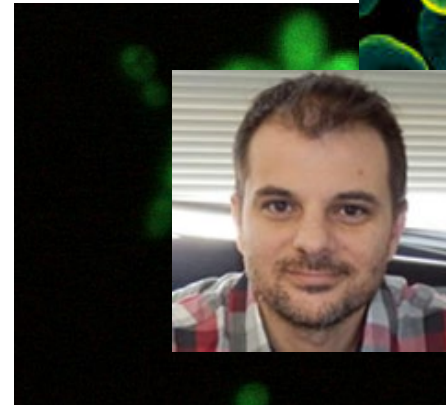
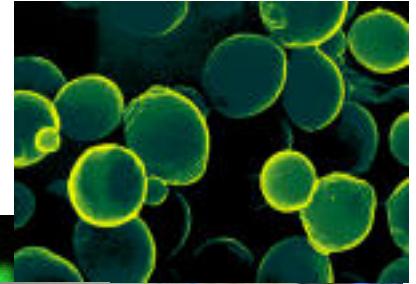
Amparo Querol

Biología de Sistemas en Levaduras de Interés Biotecnológico

PERSONAL DEL GRUPO

Investigadores seniors:

- Amparo Querol
- Jose Manuel Guillamón
- Eladio Barrio
- Sergi Puig
- Roberto Pérez Torrado



Instituto de Agroquímica y
Tecnología de Alimentos, CSIC

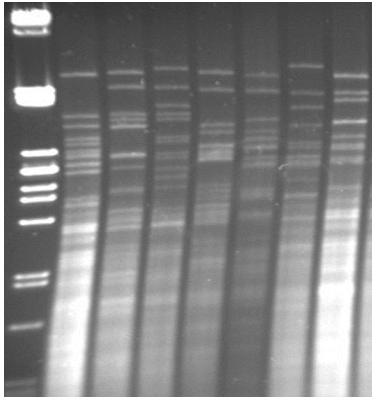


Biología de Sistemas en Levaduras de Interés Biotecnológico

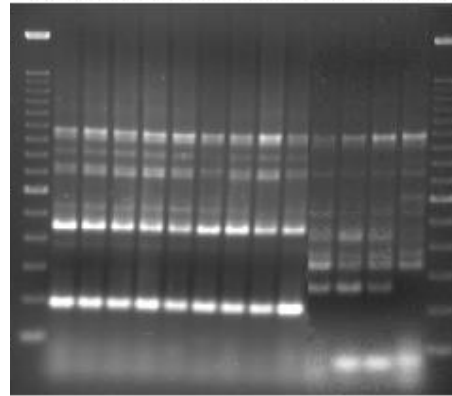
- Métodos para monitorizar, e identificar levaduras inoculadas y alternantes en fermentaciones vínicas, sidra y cerveza
- Selección natural de cepas del género *Saccharomyces* responsables de la fermentación alcohólica: *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. kudriavzevii* e híbridos, así como de otras especies no convencionales
- Caracterización de propiedades enológicas de cepas mediante microbiología predictiva y modelización
- Mejora genética de levaduras mediante técnicas no generadoras de OMGs tales como evolución dirigida, hibridación intra e inter-específica:
 - incrementar la producción de glicerol
 - disminuir el rendimiento o la tolerancia al etanol
 - mejorar la tolerancia a bajas temperaturas
 - mejorar el crecimiento en condiciones limitantes de nitrógeno
 - mejorar la producción de aromas fermentativos y la liberación de aromas varietales
 - obtención de cepas de *S. cerevisiae* con capacidad fructofílica

➤ **Métodos para monitorizar, e identificar levaduras inoculadas y alternantes en fermentaciones vínicas, sidra y cerveza**

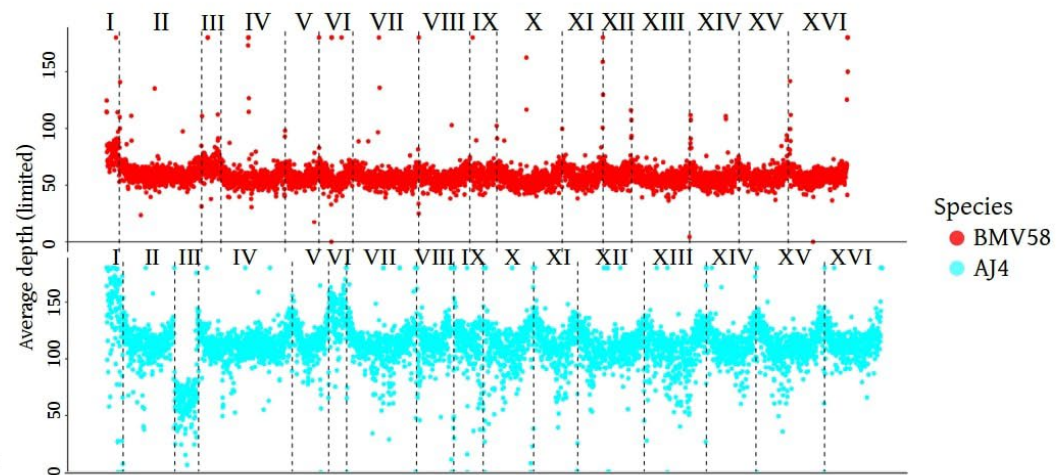
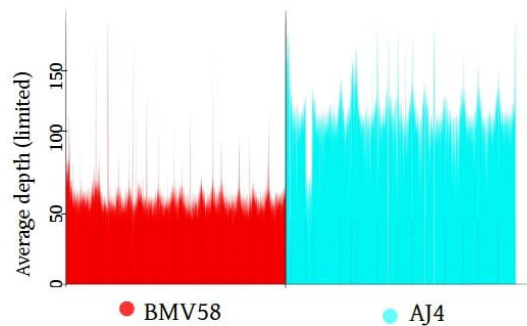
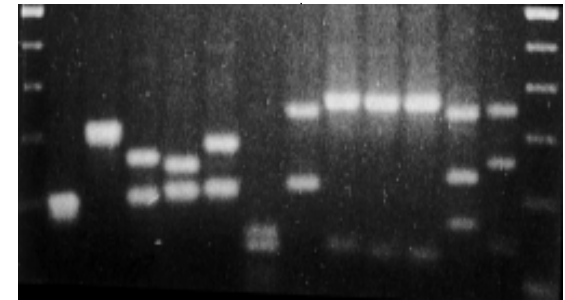
RFLPs mtDNA



Elementos delta

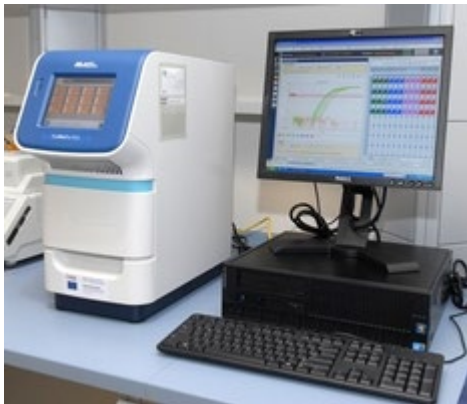


Identificación mediante PCR



➤ **Métodos para monitorizar, y identificar levaduras inoculadas y alternantes en fermentaciones vínicas, sidra y cerveza**

Recuento microorganismos del vino mediante PCR cuantitativa a tiempo real o nuevos métodos en placa



- **Sensibilidad**
- **Rapidez (no cultivo)**
- **Específica**
- **Cuantifica**
- **Compleja técnicamente**

Disponibilidad de sondas (oligonucleótidos) para la mayoría de microorganismos del vino: bacterias y levaduras incluyendo alterantes como *Brettanomyces*

➤ Selección natural de cepas del género *Saccharomyces* responsables de la fermentación alcohólica: *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. kudriavzevii* e híbridos, así como de otras especies no convencionales

6 levaduras vínicas patentadas y comercializadas (**T73**, M69, RV1, CLOS, Monastrell y **VELLUTO BMV58**)



Saccharomyces

S. arboriculus

S. cariocanus

S. eubayanus

S. jurei

S. mikatae

S. kudriavzevii

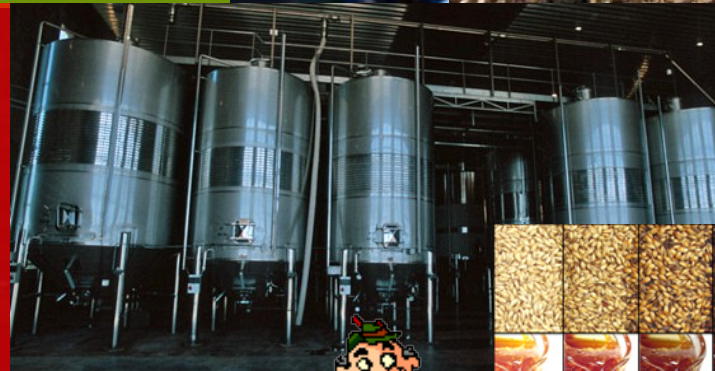
S. bayanus

S. cerevisiae

S. paradoxus

S. pastorianus

S. uvarum



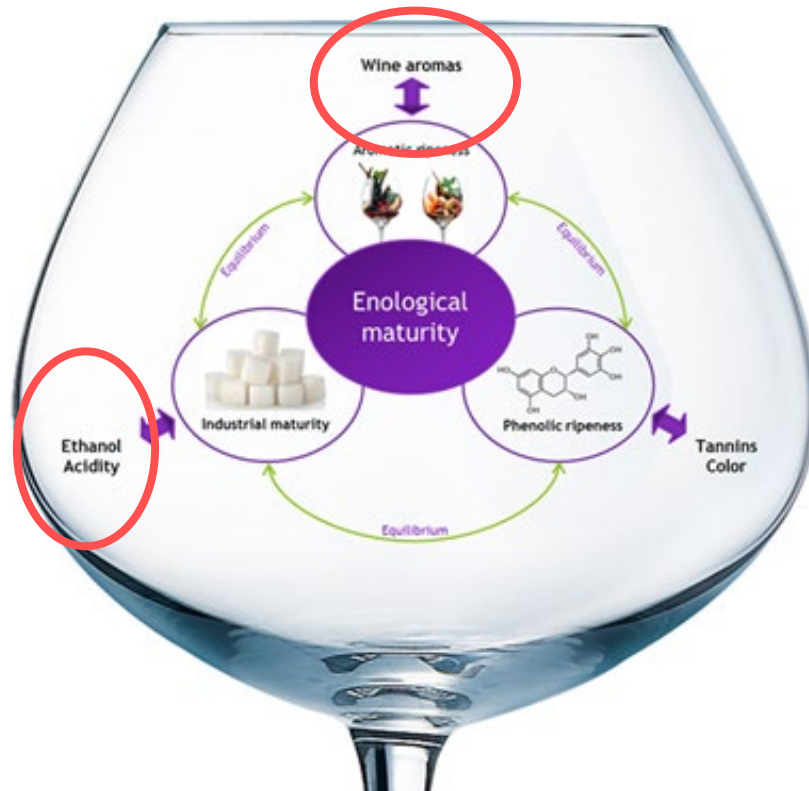
Uso de levaduras no convencionales del género *Saccharomyces* en el sector enológico y cervecero

Adaptarse a los
retos que impone el
cambio climático en
la vinificación

S. eubayanus

S. kudriavzevii

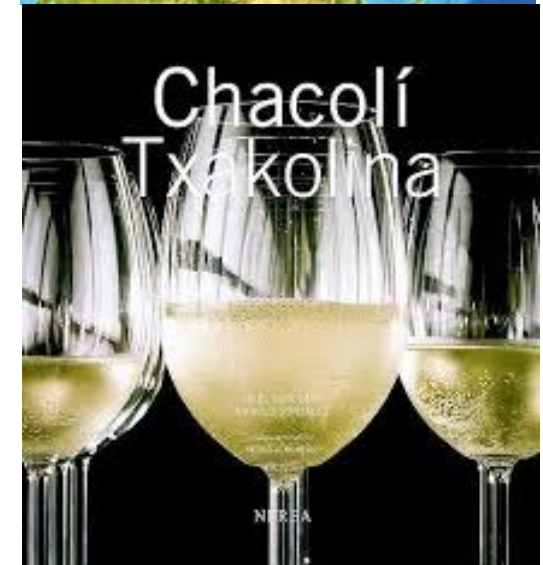
S. kudriavzevii



S. uvarum



Crece a bajas temperaturas



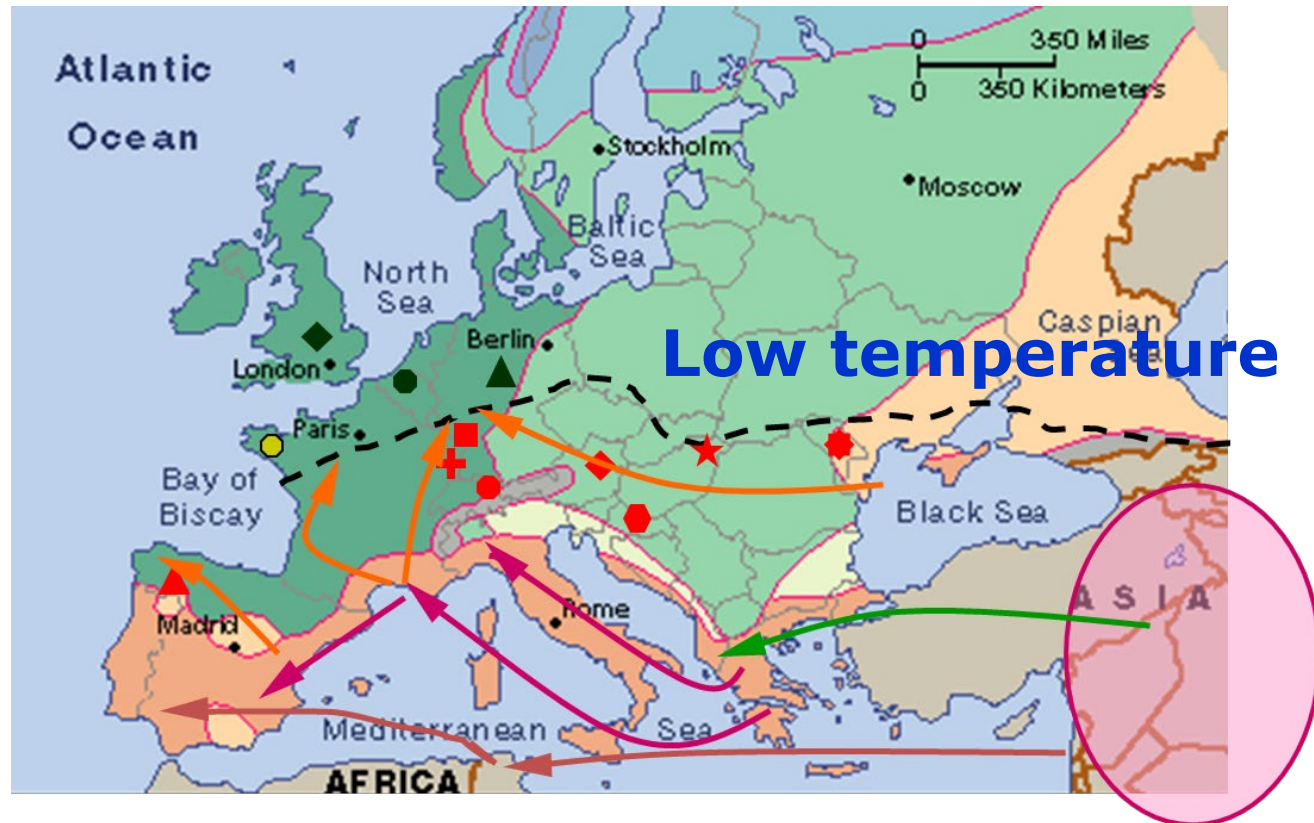
300-400 g/L
azúcar
iata

Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos



Híbridos

- *S. cerevisiae* x *S. uvarum* en vinos y cervezas
- *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* en vino y cerveza lager
- *S. cerevisiae* x *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* en vino y sidra



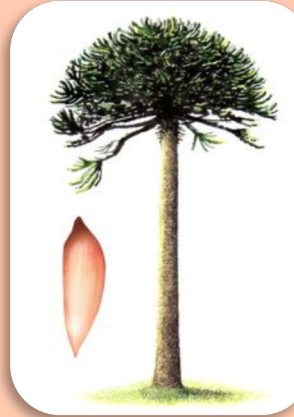
S. eubayanus



PATAGONIA
Chile y Argentina



Araucaria araucacana



- Criotolerante
- Solo en ambientes naturales
- Parental de *Saccharomyces pastorianus* (Hibrido con *S. cerevisiae* cervezas lager)

Nothofagus pumilio



- Origen probable PATAGONIA
- Utilizada para producción de cerveza Heineken H41



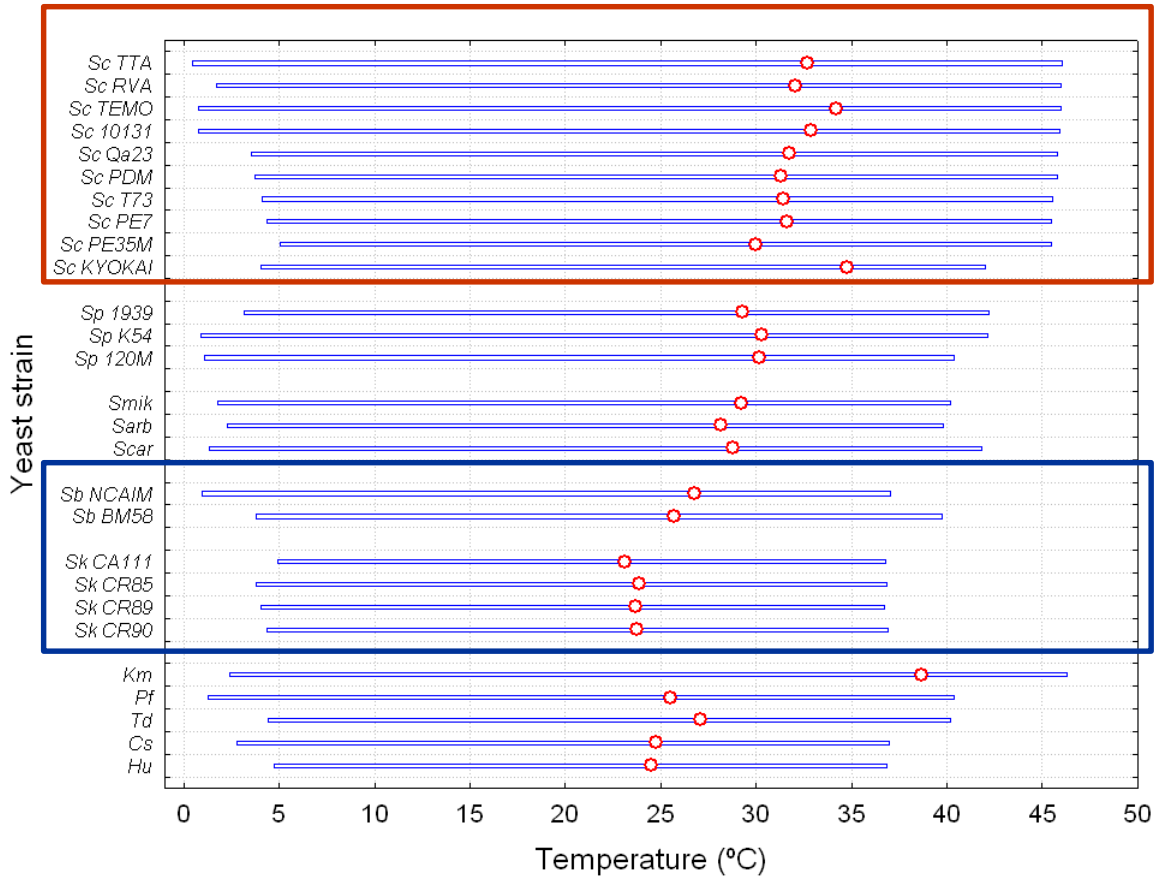
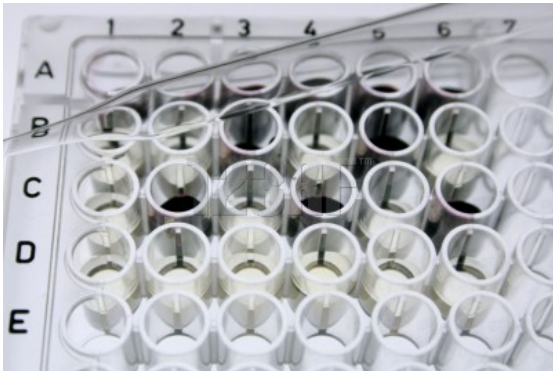
- Selección natural de cepas del género *Saccharomyces* responsables de la fermentación alcohólica: *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. kudriavzevii* e híbridos

Colección de 2.647 cepas de levaduras de los siguientes géneros:

Saccharomyces, *Kluyveromyces*,
Pichia, *Candida*, *Rhodotorula*,
Hanseniaspora, *Torulaspora*,
Metchnikovia, etc.



➤ Caracterización de propiedades enológicas de cepas mediante microbiología predictiva



Tolerancia al etanol, necesidades nutricionales: nitrógeno, fuente orgánica o inorgánica, inhibidores del crecimiento, capacidad fermentar fructosa, etc.

➤ Caracterización de propiedades enológicas de cepas mediante estudio de flujos metabólicos



➤ Caracterización de propiedades enológicas de cepas mediante estudio de flujos metabólicos

Estudio de las diferencias en la regulación del metabolismo fermentativo en las especies del género *Saccharomyces*



Metabolitos extracelulares

→ Cromatografía líquida

HPLC

- Azúcares (Glucosa, fructosa, sacarosa)
- Glicerol
- Etanol
- Ácidos orgánicos (succínico, láctico, cítrico, málico, tartárico, acético)
- Amino ácidos

Aromas

→ Cromatografía gaseosa

GC - FID
SPME-PDMS fiber

- Alcoholes superiores (5 cuantificados)
- Esteres (11 cuantificados)

Metabolitos intracelulares

→ Cromatografía gaseosa

GC - MS
IBMCP / U.P.V.

- Intermediarios de la glicolisis
- Intermediarios del ciclo de Krebs
- Vía de las pentosas
- Amino ácidos

Parámetros fisiológicos

→ Citometría de flujo, UFCs, OD600, DW

Datos de RNA

→ Servicio de secuenciación masiva de la UV

Modelos matemáticos

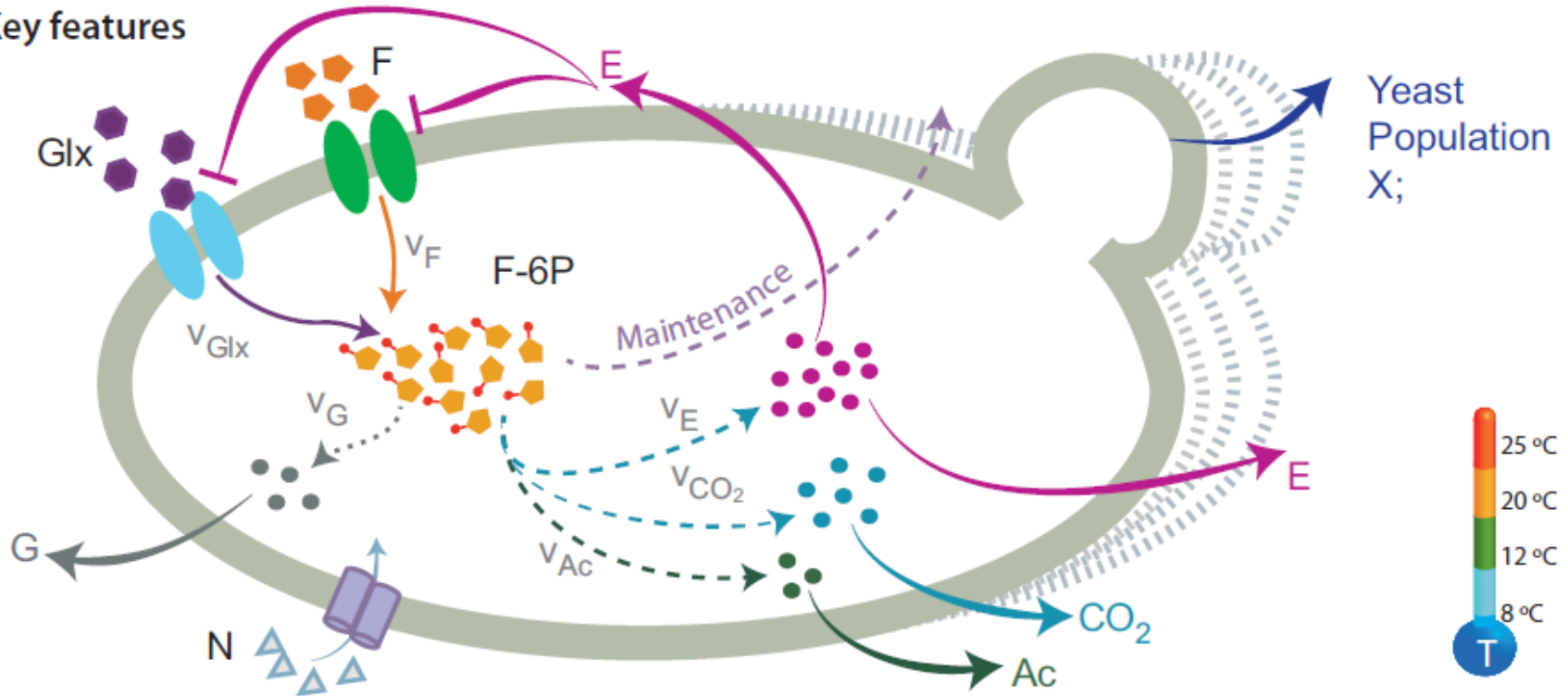
→ **IIM**
Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo



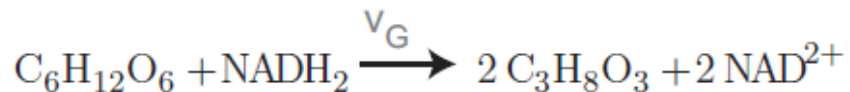
Modelado cinético



a) Key features



b) Stoichiometry

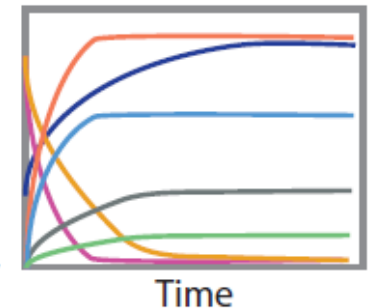


c) Generic model

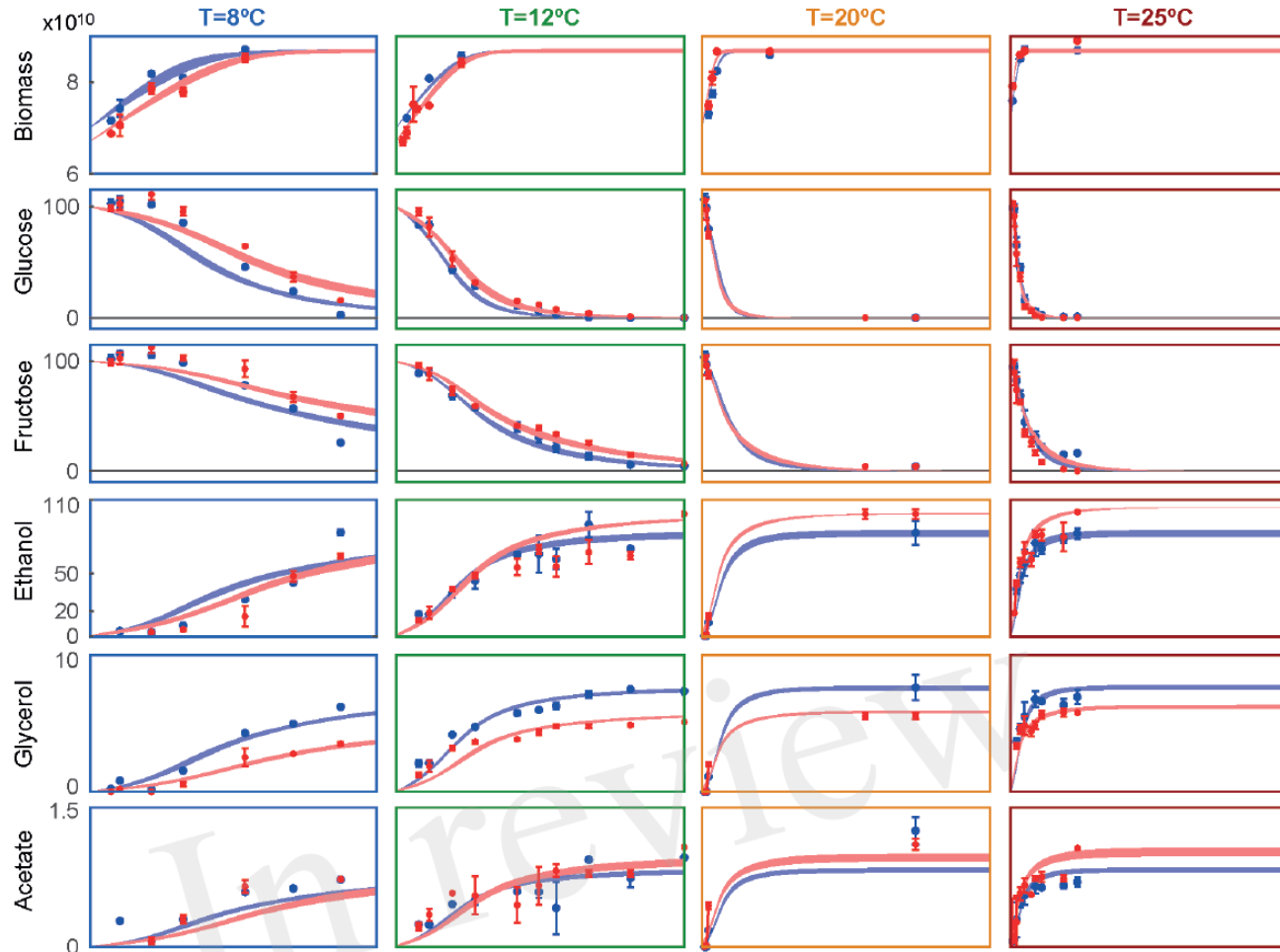
$$\frac{dX}{dt} = \mu(T) \cdot f(X, t) \cdot$$

$$\frac{dC}{dt} = S \cdot v(T, X, C, t)$$

$$C = [\text{Glx} \text{ F F6P E CO}_2 \text{ Ac G}]^T$$



Modelado cinético

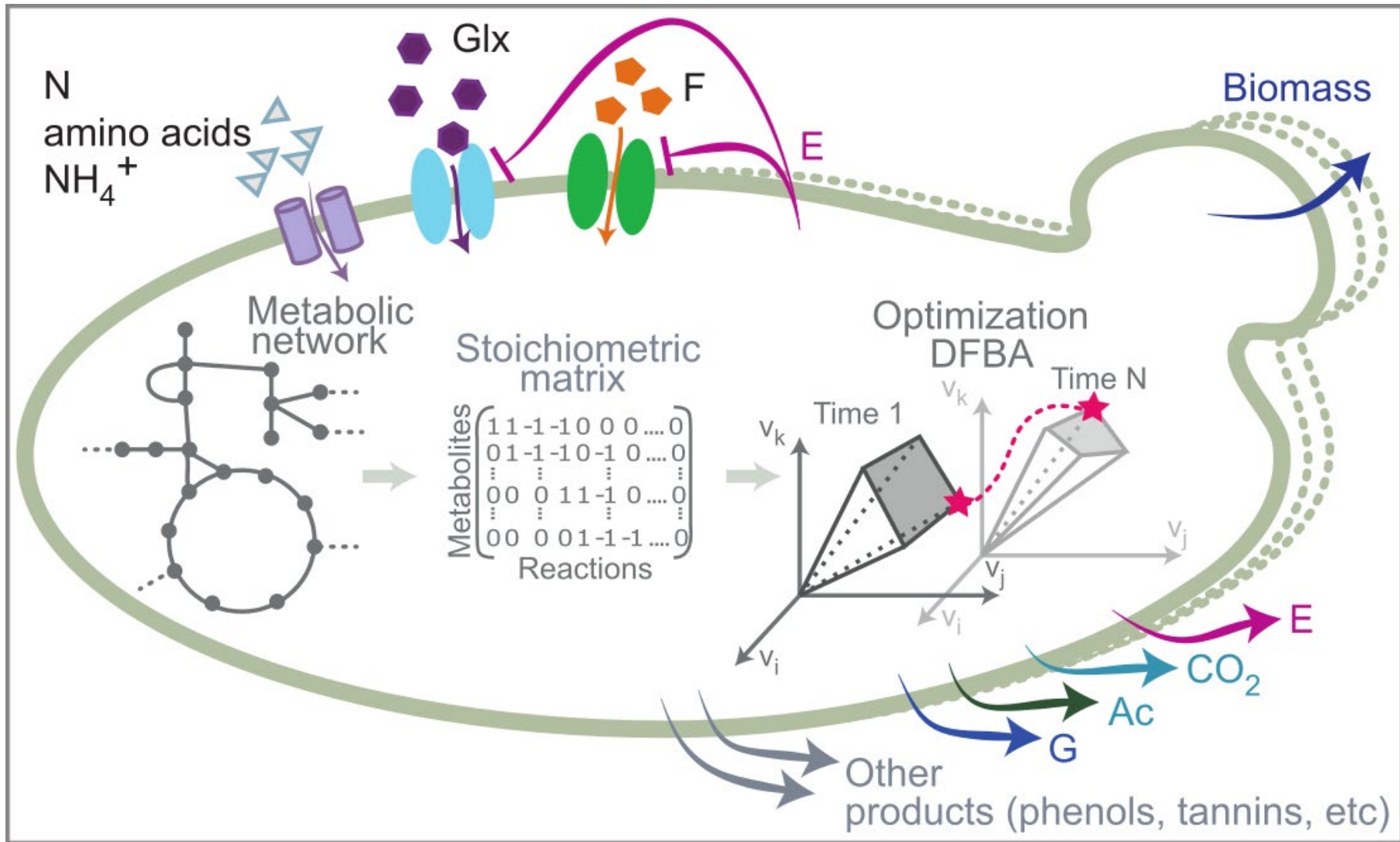


- Biomasa y metabolitos relevantes
- Escala microfermentación

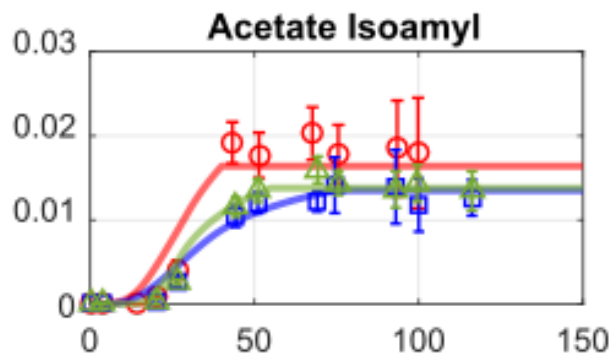
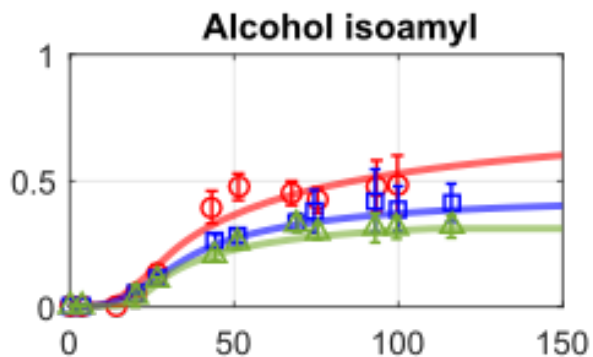
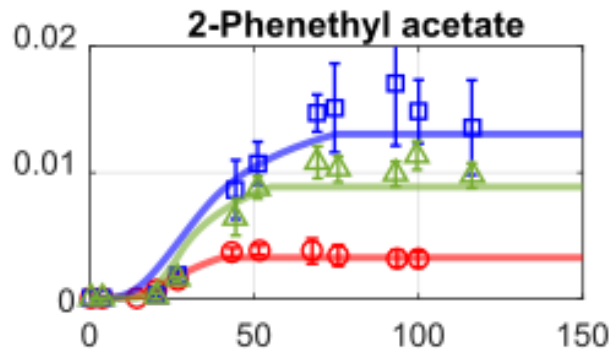
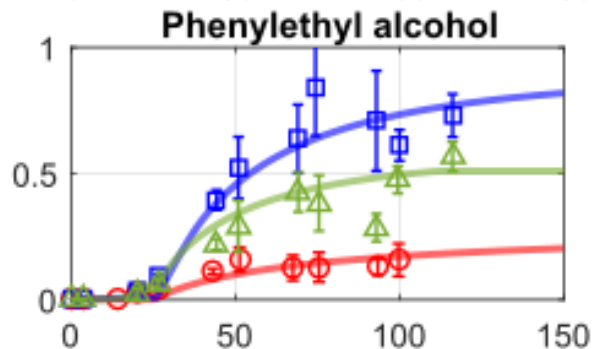
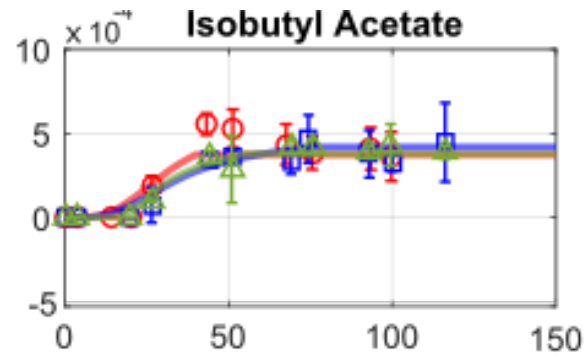
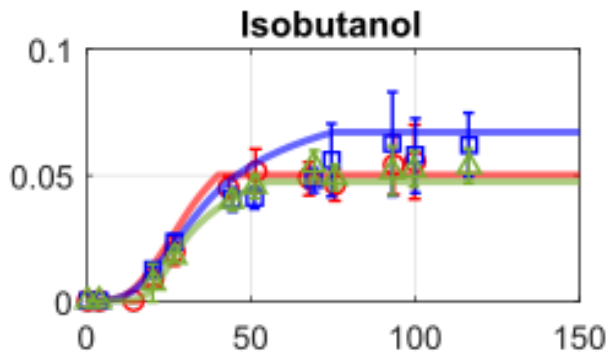
➤ Posibilidades:

- Escala fermentador: distribución espacial de variables relevantes
- Diseño: especie, T, N
- Control automático: optimización en tiempo real

Modelado metabolismo escala genómica

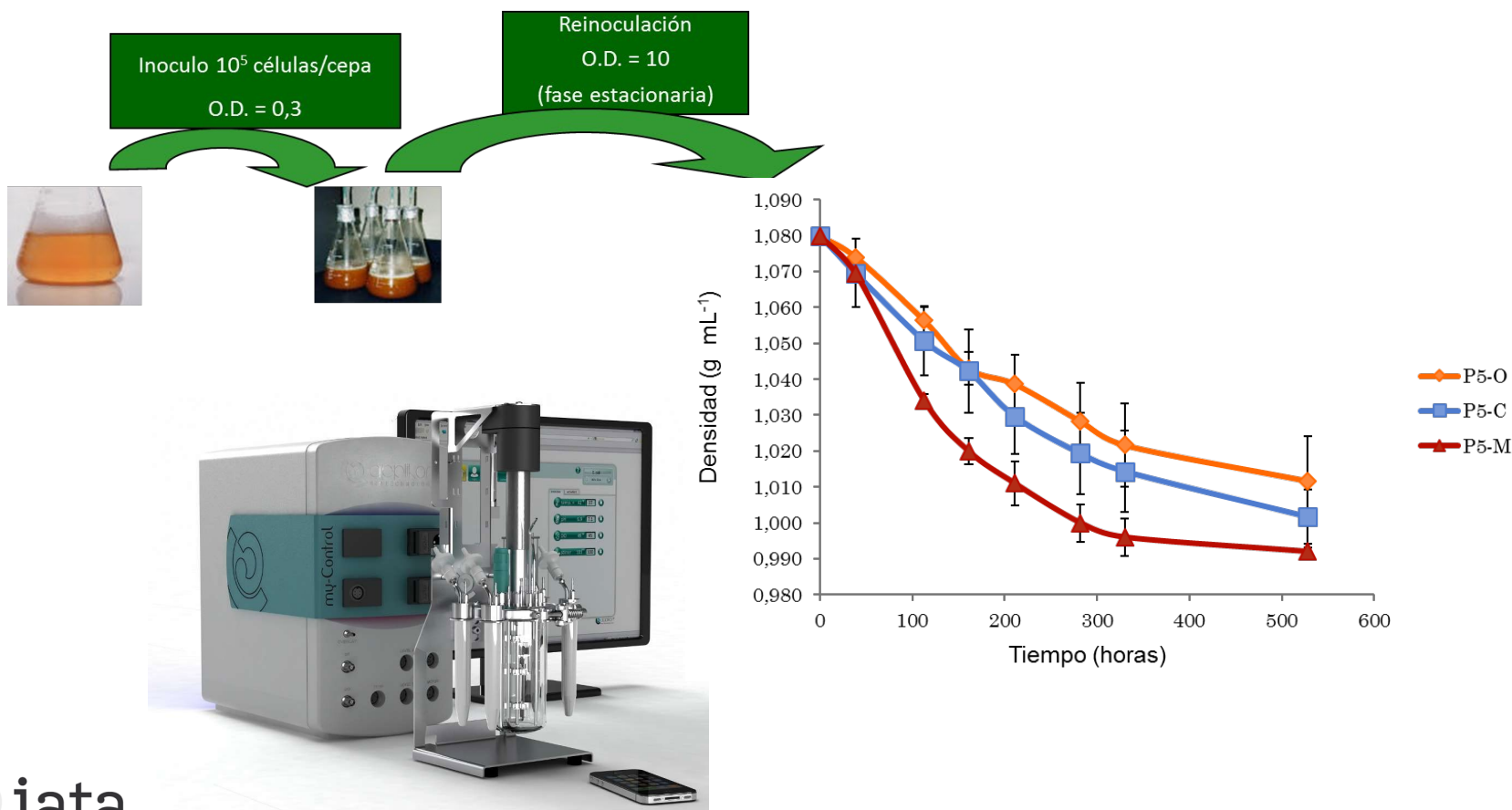


Modelado metabolismo escala genómica

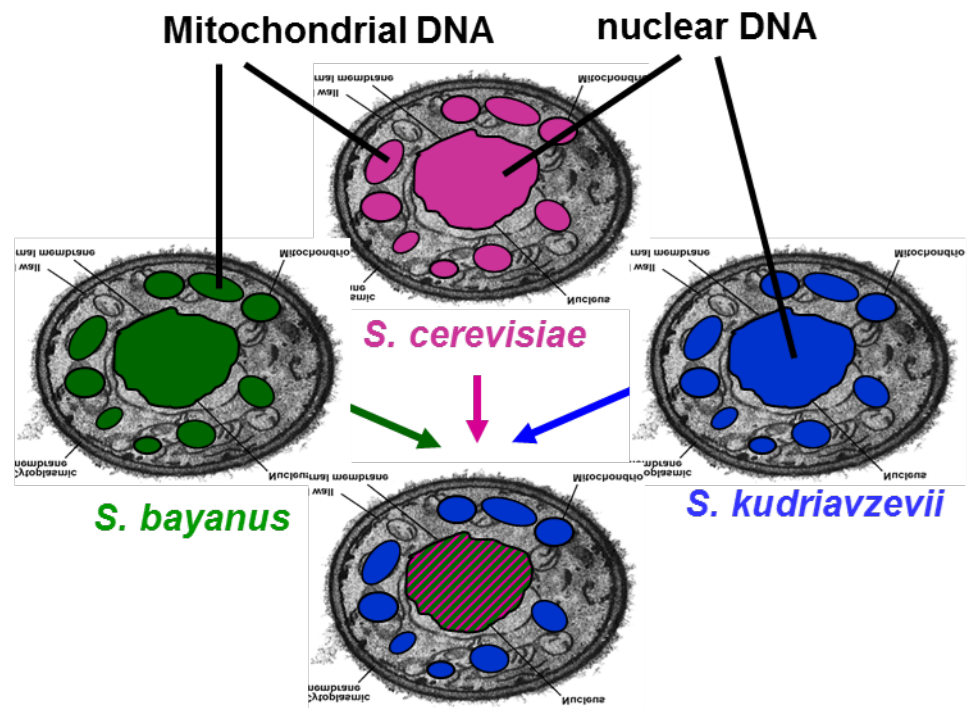
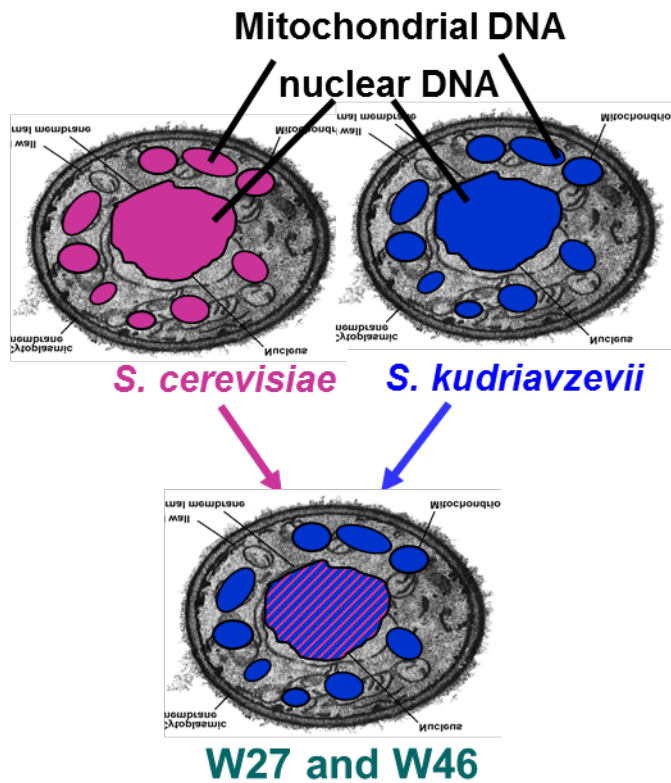


- Predicción producción de aromas
- Posibilidades:
- Diseño de procesos más sostenibles

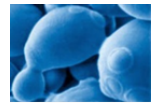
➤ Mejora genética de levaduras mediante técnicas no generadoras de OMGs tales como evolución dirigida, hibridación intra e inter-específica



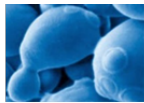
- Mejora genética de levaduras mediante técnicas no generadoras de OMGs tales como evolución dirigida, hibridación intra e inter-específica



➤ Mejora genética de levaduras mediante técnicas no generadoras de OMGs tales como evolución dirigida, hibridación intra e inter-específica



Sc1



Sc2

X

Strain

Sc1 + mano

Sc2

R2 Io

R2 Ilo

R2 IIIa

R2 IIIo

R2 IVo

R2 Vo

R2 Vlo

R8 IIa

R8 Ilo

R8 IIIo

R8 IVo

R8 Vo

R8 Vb

R8 Vlo

R8 VIIo

R8 VIIIo

E2 Io

E2 Ilo

EVK7

t (2g/L)

Glucose (g/L)

Fructose(g/L)

Glycerol (g/L)

Ethanol (%)

49,97±4,416

0,375±0,106^a

9,2±0,778^f

5,175±0,106

12,135±0,057

22,582±0,689

0,00±0,00^a

2,175±0,247^a

5,825±0,106

12,478±0,053

23,478±0,149

0,00±0,00^a

2,025±0,318^a

5,55±0,071

11,78±0,113

27,11±1,031

0,00±0,00^a

2,4±0,495^a

5,45±0,071

12,295±0,078

26,158±2,627

0,00±0,00^a

5,175±0,389^{c,d}

5,55±0,071

12,698±0,018

42,353±19,963

0,00±0,00^a

7±0,424^e

5,2±0,00

12,03±0,064

16,854±2,423

0,00±0,00^a

1,75±0,212^a

5,6±0,00

12,13±0,099

28,876±1,664

0,4±0,566^a

6,5±0,849^{d,e}

4,725±0,46

11,033±0,81

25,534±0,346

0,3±0,424^a

3,18±0,467^b

4,65±0,141

10,565±0,24

27,205±3,491

0,308±0,435^a

2,379±0,303^a

5,633±0,131

11,768±0,413

32,893±2,417

0,00±0,00^a

2,368±0,682^a

5,665±0,071

12,36±0,185

44,038±8,299

0,00±0,00^a

4,581±0,458^{b,c}

5,763±0,138

12,234±0,203

30,226±2,05

0,00±0,00^a

2,653±0,477^a

5,683±0,074

12,326±0,243

31,55±1,823

0,00±0,00^a

2,48±0,113^a

5,125±0,134

12,487±0,008

28,299±0,147

0,00±0,00^a

1,705±0,24^a

5,695±0

11,034±0,019

30,839±1,032

0,00±0,00^a

2,383±0,004^a

5,64±0,332

11,617±0,193

30,216±1,036

0,00±0,00^a

2,00±0,106^a

6,093±0,194

12,234±0,165

33,179±3,89

0,00±0,00^a

2,583±0,619^a

5,363±0,237

11,186±0,297

28,127±0,969

0,00±0,00^a

2,05±0,028^a

5,198±0,166

11,236±0,36

28,813±1,834

0,00±0,00^a

2,265±0,516^a

5,53±0,078

12,289±0,251

25,348±0,383

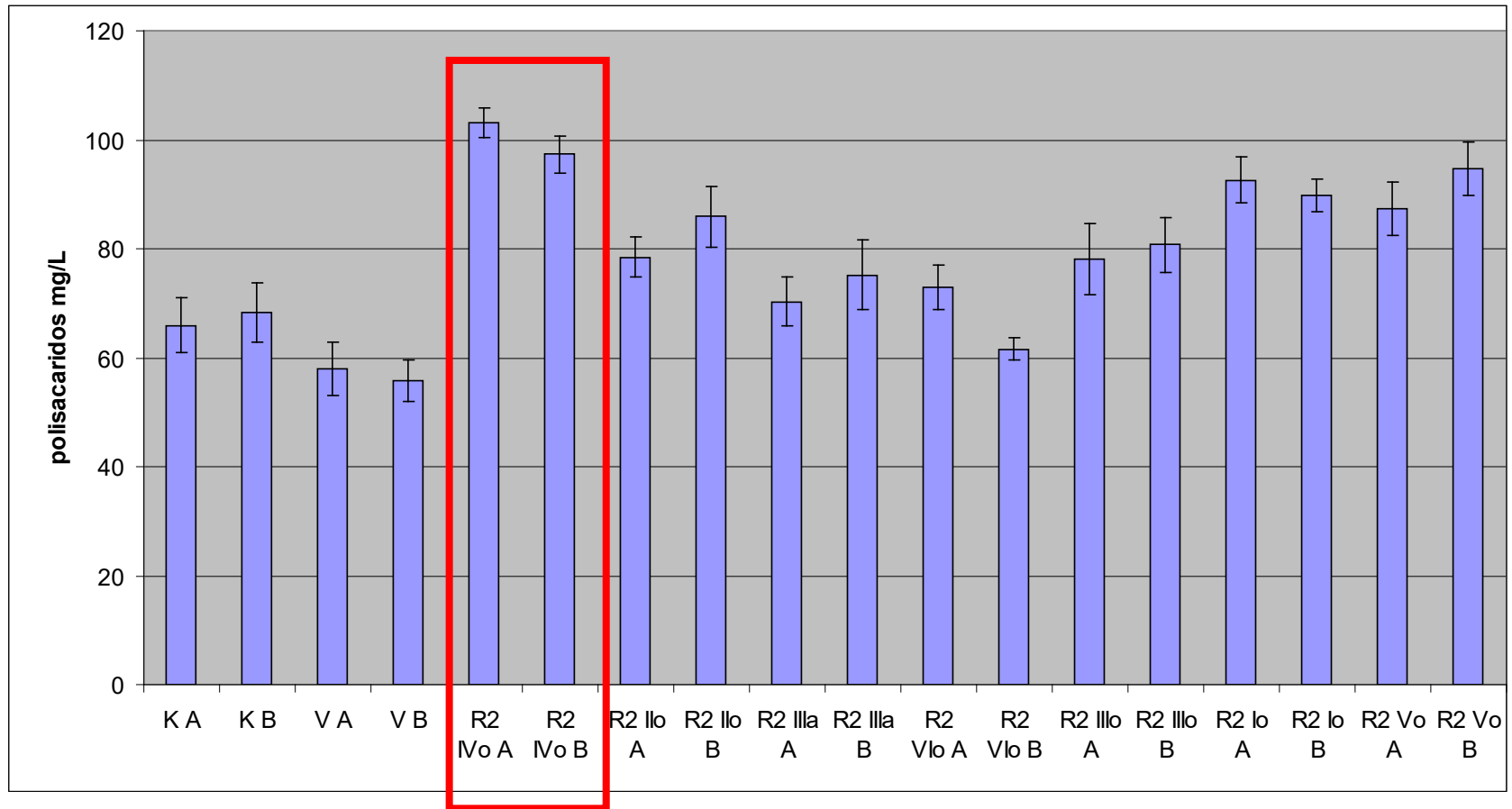
0,00±0,00^a

2,265±0,064^a

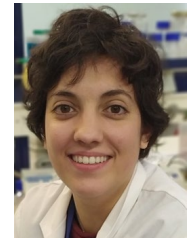
5,55±0,071

11,78±0,113

- Mejora genética de levaduras mediante técnicas no generadoras de OMGs tales como evolución dirigida, hibridación intra e inter-específica



Biología de Sistemas en Levaduras de Interés Biotecnológico



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



GENERALITAT
VALENCIANA



Biología de Sistemas en Levaduras de Interés Biotecnológico



BODEGAS HISPANO+SUIZAS





FRENCH WINES



memBrane

